

# EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE NUEVOS POLICATIONES SINTÉTICOS SOBRE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS Y MORFOLÓGICAS DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA

## EVALUATION OF BIOCOMPATIBILITY OF NOVEL SYNTHETIC POLICATIONS ON MECHANICAL AND MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTE MEMBRANE

M. Relancio\*, M. Delannoy\*, P. Foresto\*\*, C. Grandfils\*, J. Valverde\*\*, B. Riquelme\*\*

- ♦ Área Física, Facultad Cs. Bioq. y Farm., Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina
  - ♣ Grupo de Óptica Aplicada a la Biología, IFIR (CONICET-UNR), Rosario, Argentina
  - ♠ Área Inmunohematología, Facultad Cs. Bioq. y Farm., Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina
  - ♥ Interfaculty Biomaterial Center, Universidad de Lieja, Lieja, Bélgica
- e-mail: bibiana\_riquelme@yahoo.com.ar*

Los policationes son oligómeros o polímeros de origen natural o sintético, portadores de gran cantidad de cargas positivas a pH 7.4. Muchos de estos policationes son utilizados como agentes de vectorización en terapia génica o para promover la resorción de medicamentos a través de barreras biológicas. Sin embargo, no está clara la relación entre sus propiedades macromoleculares y las interacciones con los componentes de la sangre (portadores de cargas superficiales negativas), desconociéndose su mecanismo de bio-interacción. Estudiamos la biorreactividad de dos copolímeros: Semo B86 (estadístico) y Semo B124 (palm-three), seleccionados para tener secuencias cargadas positivamente separadas de segmentos de polietilenglicol en diferentes lugares. La técnica de difracción láser (Eritrodeformetro) fue utilizada para evaluar las alteraciones en las propiedades reológicas de los eritrocitos tratados con estos policationes. Se analizaron las intensidades de Forward Light Scattering (FS) y Side Light Scattering (SS) (citómetro de flujo Coulter EPICS XL-MCL) para analizar la morfología y la granularidad de los eritrocitos. Los resultados muestran que el copolímero palm-three altera en mayor grado algunos de los parámetros reológicos investigados y por citometría de flujo no se evidenciaron cambios en la morfología celular. Estos hallazgos podrían ser de utilidad para entender mejor los mecanismos de la interacción de los policationes con la membrana eritrocitaria humana y perfeccionar su aplicación en Clínica Médica.

Palabras claves: policationes, eritrocito, viscoelasticidad, polietilenglicol, biocompatibilidad, citometría de flujo

Polycations are oligomers or polymers of natural or synthetic origin, which bear a great number of positive charges at pH 7.4. Several of these polycations are nowadays used in medicine for human and veterinary purposes. However, there are no clear relationships between macromolecular features of polycations and their interactions with blood elements (which bear superficial negative charges); their bio-interaction mechanisms are not well known. We study the bioreactivity of two copolymers: Semo B86 (statistic) and Semo B124 (palm-three), selected with the purpose of having positively charged sequences separated from polyethylenglycol segments at different places. The laser diffractometry method (Erythrodeformeter) was used to evaluate the rheological properties of erythrocyte treated with these polycations. Forward Light Scattering (FS) and Side Light Scattering (SS) intensities (Coulter EPICS XL-MCL Flow Cytometer) were analyzed to detect any change in erythrocyte morphology and cellular granularity. Results show that the palm-three copolymer affects some of the rheological parameters investigated significantly. Flow cytometry has not evidenced any change of the morphological parameters of the isolated blood cells after their incubation with the polycations. These findings will be useful to better understand the mechanisms of polycation interaction on human erythrocyte membrane and to enlarge their potential in medicine.

Key Words: polycations, erythrocyte, viscoelasticity, polyethylenglycol, biocompatibility, flow cytometry

### I. INTRODUCCIÓN

Los estudios de biocompatibilidad son de indudable importancia para la aplicación de los biomateriales en biomedicina<sup>(1)</sup>. Este término no sólo significa la ausencia de un efecto citotóxico, sino también un efecto positivo en el sentido de la biofuncionalidad.

Debido a que la sangre es muy sensible a la presencia de sustancias extrañas, los análisis de hemo-compatibilidad constituyen una parte importante en la evaluación de la biocompatibilidad<sup>(2)</sup>. Los resultados de

los estudios hemorreológicos muestran que las alteraciones en estos parámetros son indicadores confiables de las características de no biocompatibilidad del biomaterial<sup>(3)</sup>.

Los policationes son oligómeros o polímeros orgánicos de origen natural o sintético portadores de gran cantidad de cargas catiónicas a pH neutro y tienen pesos moleculares que van desde algunos cientos hasta varios miles de Daltons<sup>(4) (5)</sup>. Habitualmente, se utilizan en clínica como medicamentos o excipientes de formulaciones de principio activo, estudiándose su

nueva aplicación como vector en terapia génica o agente susceptible de aumentar la difusión de medicamentos.

En este trabajo se estudia la biocompatibilidad sobre la membrana del glóbulo rojo (GR) de dos copolímeros: Semo B86 (estadístico) y Semo B124 (palm-three), seleccionados a fin de disponer de una secuencia cargada positivamente separadas por segmentos de polietilenglicol (PEG) destinados a prevenir la opsonización y a asegurar la estabilidad física de los GR<sup>(6)</sup>.

Los estudios de biocompatibilidad se llevaron a cabo mediante la evaluación de las alteraciones producidas en las propiedades mecánicas y en la morfología de los GR debido a la interacción con los policationes. Se analizaron las alteraciones en los distintos parámetros celulares según las características y concentración de los policationes utilizados.

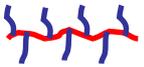
<p><b>Copolímero Estadístico P(DMAEMA)-b- P(MAPEG)</b></p> <p><b>Semo B86</b></p>  <p><math>M_n</math> MAPEG: 455; <math>M_n</math> seq. P(DMAEMA): ND;  <math>F_w</math> DMAEMA: 26.5 %; <math>F^d</math> DMAEMA : 51.1;  <math>M_n</math> (GPC): 29 100; <math>M_w/M_n</math> : 1.56</p>
<p><b>Copolímero palm-three P(DMAEMA)-b-P(MAPEG)</b></p> <p><b>Semo B124</b></p>  <p><math>M_n</math> MAPEG: 3 050; <math>M_n</math> seq.; P(DMAEMA): 16 500  <math>F_w</math> DMAEMA: 52.0 %; <math>F^d</math> DMAEMA 95.0 %;  <math>M_n</math> (GPC)<sup>b</sup>: 30 700; <math>M_w/M_n</math> 1.23</p>

Figura 1: Arquitectura y propiedades macromoleculares de los policationes.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1 Suspensión de glóbulos rojos

Las muestras de sangre provenientes de donadores sanos, fueron recolectadas en recipientes estériles conteniendo EDTA como anticoagulante, almacenadas a 4°C y analizadas dentro de las 24 hs. La muestra fue centrifugada (1100g, 25 °C, 5 min) y luego de descartar el plasma, los GR fueron lavados tres veces con buffer fosfato salino (PBS) ( $K_2HPO_4$  1.4mM, KCl 2.7mM,  $Na_2HPO_4$  10 mM, NaCl 137 mM, pH = 7.4,  $295 \pm 8$  mOsmol/kg). Finalmente, se preparó una suspensión de GR al 12 % (v/v) en PBS.

### II.2 Policationes estudiados

Se utilizaron soluciones de los policationes Semo B86 y Semo B124<sup>(7) (8) (9)</sup>, cuya estructura y propiedades se muestran en la Fig. 1. Dichas soluciones fueron preparadas a las concentraciones 2, 50 y 250  $\mu$ g/ml en PBS.

**Semo B86** es un copolímero de P(DMAEMA)-b-P(MAPEG) con estructura estadística, donde las secuencias PEG están insertadas en forma aleatoria a lo largo de la cadena del policatione.

**Semo B124** es un copolímero de P(DMAEMA)-b-P(MAPEG) con una estructura “palm-three”, donde las secuencias PEG están específicamente insertadas en la extremidad de la cadena del policatione.

### II.3 Interacción entre los policationes y los GR

Se incubó 1 ml de la solución del policatione (2, 50 y 250  $\mu$ g/mL) con 1 ml de una suspensión de GR en PBS al 12% (v/v) a una temperatura de  $(25.0 \pm 0.5)$  °C bajo agitación lateral durante 45 minutos. Finalmente se lavaron los GR 3 veces en PBS para la evaluación de la biocompatibilidad.

### II.4 Estudio hemorreológico

Las determinaciones reológicas se realizaron utilizando el Eritrodefómetro en régimen estacionario y dinámico<sup>(10) (11)</sup>. Para ello, 50  $\mu$ l de GR tratados fueron suspendidos en 4.5 ml de un medio isotónico de alta viscosidad ( $22 \pm 0.5$  cp a 25°C), constituido por una solución al 5% w/v de polivinil-pirrolidona (PVP.360 Sigma MW 360 kDa) en PBS. Una capa delgada de la suspensión de GR se colocó entre los dos discos horizontales y concéntricos del Eritrodefómetro. Se determinaron los siguientes parámetros reológicos:

$\mu$ : módulo elástico de la membrana

$\eta_m$ : viscosidad superficial

ID: índice de deformabilidad

$d_{1Hz}$ : desfase entre la tensión aplicada y la respuesta del GR a 1 Hz

$t_r$ : tiempo de relajación

$G'$ : módulo de almacenamiento

$G''$ : pérdida dinámica

$\eta'$ ,  $\eta''$ : componentes de la viscosidad compleja

### II.5 Citometría de Flujo

La morfología de las células se analizó utilizando un citómetro de flujo, el cual permite registrar las intensidades de luz dispersadas lateralmente Side Light Scattering (SS) y hacia delante Forward Light Scattering (FS) para miles de células de una misma muestra. Los valores de FS dependen del tamaño de las células, mientras que los de SS dependen de la granularidad y transparencia de las mismas<sup>(12)</sup>.

Se preparó una suspensión diluida de GR en PBS al 0.05 % (v/v) y se introdujo en un citómetro de flujo Coulter Epics XL-MCL, midiéndose los valores de FS y SS para 100.000 células de cada muestra. Los datos fueron analizados con el programa WinMDI (Versión 2.8), determinándose los valores de la media geométrica correspondientes al pico principal y al pico secundario.

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las figuras 2, 3, 4 y 5 se observa una diferencia en la alteración producida sobre la membrana del GR por los dos policationes estudiados. En la tabla 1 se muestra un resumen de las alteraciones de los parámetros reológicos estacionarios y dinámicos para el tratamiento con cada policatione.

Los análisis hemorreológicos demuestran que los dos policaciones estudiados, producen alteraciones de las propiedades mecánicas de la membrana ligeramente diferentes: el policación Semo B124 muestra una mayor citotoxicidad demostrada en la alteración de la viscosidad superficial de la membrana del GR, en el módulo de almacenamiento y en los valores del desfase entre la tensión de corte aplicada y la respuesta del GR.

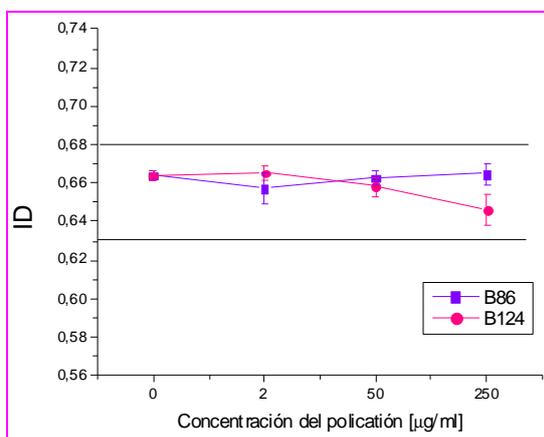


Figura 2: Índice de deformabilidad eritrocitaria.

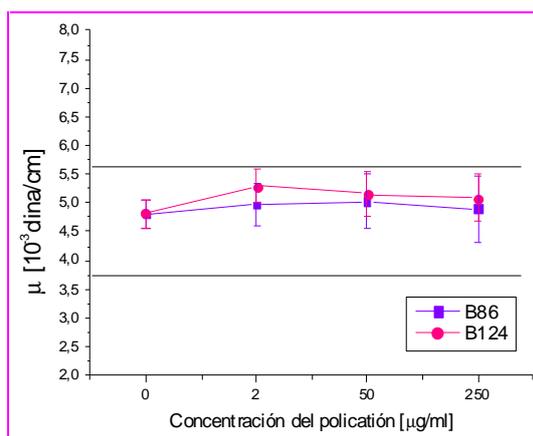


Figura 3: Módulo elástico de la membrana eritrocitaria.

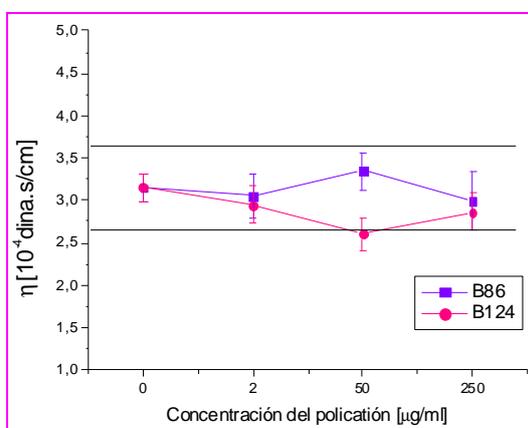


Figura 4: Viscosidad superficial de la membrana eritrocitaria

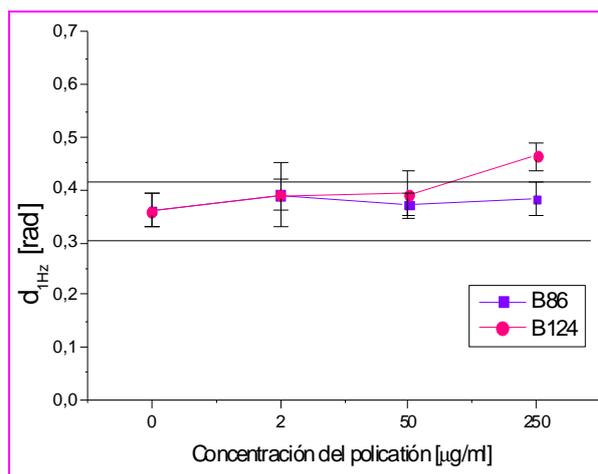


Figura 5: Desfase entre la respuesta del GR y la tensión de corte oscilante obtenidas en régimen dinámico para 1 Hz de frecuencia.

Los resultados muestran que los GR incubados con el policación Semo B86 presentan un aumento de los valores de FS en forma proporcional con la concentración del policación respecto del control. En cambio, para el policación Semo B124 la mayor variación se observa para las concentraciones extremas (Fig. 6). Estos aumentos en el valor medio del pico principal (GMean) en el histograma de FS estarían relacionados con un aumento en el número de microagregados (dobletes) de dimensiones levemente superiores a las de la célula individual. Para el caso del Semo B86, estaría claramente de acuerdo con un aumento de la agregación debido a la disminución de la carga superficial del GR por la unión del policación. En cambio, para el Semo B124, esta misma relación no se puede establecer claramente ya que no hay una correlación en el aumento de FS con la concentración del policación.

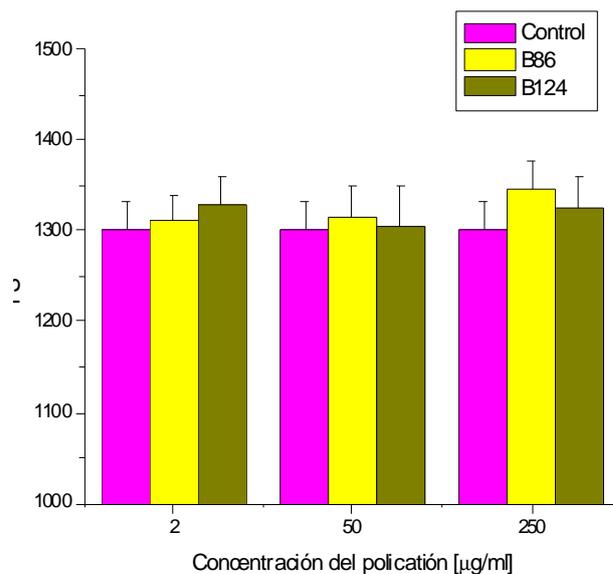


Figura 6: Valores medios del pico principal del histograma correspondiente a los valores de FS obtenidas mediante citometría de flujo.

TABLA 1: PARÁMETROS REOLÓGICOS

Características del Policación	Alteración de Parámetros Reológicos. Comparación con los valores normales								
	Régimen Estacionario			Régimen Dinámico					
	ID	$\mu$	$\eta$	$d_{1Hz}$	$t_r$	$G'$	$G''$	$\eta'$	$\eta''$
<b>Copolímero "Aleatorio" B86</b> - 74 % de densidad de PEG por cadena polimérica - masa de cadenas de PEG: 455	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto Cc $\neq$ 50 $\mu$ g/ml	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto Cc $\neq$ 50 $\mu$ g/ml
<b>Copolímero "Palm three" B124</b> - 48 % de densidad de PEG por cadena polimérica - masa de cadenas de PEG: 3050	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto Cc < 50 $\mu$ g/ml	Sin efecto Cc < 250 $\mu$ g/ml	Sin efecto	Si	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto Cc > 2 $\mu$ g/ml

Cc: concentración del policación ;  $\neq$ : excepto

#### IV. CONCLUSIONES

Los resultados reológicos muestran un diferente nivel de biocompatibilidad de los politaciones Semo B86 y Semo B124 con los glóbulos rojos humanos.

Las determinaciones por citometría de flujo muestran que el policación Semo B86 produce una mayor alteración en el FS comparada con la que produce el tratamiento con el Semo B124 donde el comportamiento aún no estaría claro. Este aumento en los valores de FS podría deberse a la presencia de una población de dobletes celulares mayor que la normal.

El presente estudio contribuye a un mayor conocimiento del efecto de los politaciones sobre los GR, lo cual brindaría importante información de los mecanismos involucrados en la interacción policación/glóbulo rojo. Estos resultados son de utilidad para optimizar la biocompatibilidad de nuevos politaciones para futuras aplicaciones terapéuticas y en transfusión sanguínea.

Estos estudios brindan un mejor conocimiento de la acción de los politaciones sobre los GR, lo que podría aportar una mayor información acerca de los mecanismos de interacción involucrados.

#### Referencias

- 1- Emonds, J. Alt. Optimisation de nanovecteurs destinés à la thérapie génique. Graduate thesis in chemistry, CEIB, Faculty of Sciences, University of Liège, 2004.
- 2- Moreaou, E., Ferrari, I., Drochon, A., Chapon, P., Vert, M., Domurado, D. J of Controlled Release, **64**, 115-128 (2000).
- 3- Gautam SK, Kamat MV, Basu S. Biomed Mater Eng; **5**(3):141-149(1995).
- 4- Grandfils, C., Peulen O., Deloyer P., Loret S., Dandrifosse G. In "Biologically active amines in food" (2000).
- 5- Wouters F., et al. Cell Biology **11**, 203-211 (2001).
- 6- Riquelme, B; Dumas, D; Fontana, A.; Alessi, A.; Foresto, P; Grandfils C, Stoltz, J; Valverde, J. In *Biophotonics and New Therapy Frontiers*, **6191** (2006).

- 7- Pantoustier N., Moins S., Wautier M., Degée P., Dubois P. Chem Comm **3**, 340-1 (2003).
- 8- Ydens S., Moins F., Botteman P., Degée P., Dubois P. E-Polymer **39**, 1-7 (2004).
- 9- Piroton S., Muller C., Pantoustier N., Botteman F., Collinet S., Grandfils C., Dandrifosse G., Degée P., Dubois P., Raes M. Pharm. Res. **21**, 1471-1479 (2004).
- 10- Riquelme B, Valverde J., Rasia RJ. Biorheology, **35**(4,5), (1998).
- 11- Riquelme B., Rasia R.J. ANALES AFA **9**, 255-259 (1997).
- 12- Wagner, F., Flegel, W.A. Infusion therapy and transfusion Medicine **25** 342-346 (1998).