

EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE NUEVAS POLICACIONES SINTÉTICAS SOBRE LAS PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA

EVALUATION OF NOVEL SYNTHETIC POLYCATION ACTION ON VISCOELASTIC PROPERTIES OF ERYTHROCYTE MEMBRANE

B. Riquelme^{♦♦}, P. Foresto^{♦♦}, F. Relancio^{*}, N. Lebensohn[▲], L. Di Tullio[▲], C. Grandfils[♥], J. Valverde^{♦♦}

♦ Área Física, Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario ♣ Grupo de Óptica Aplicada a la Biología, IFIR (CONICET-UNR) ▲ Área Inmunohematología, Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario ♥ Interfaculty Biomaterial Center, Universidad de Lieja, Bélgica

Los policationes son oligómeros o polímeros orgánicos de origen natural o sintético, portadores de gran cantidad de cargas positivas con pH 7,4. 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. Hasta el momento no existen estudios detallados de la interacción de policationes con componentes sanguíneos (portadores de cargas superficiales negativas), desconociéndose además su mecanismo de bio-interacción. En este trabajo se estudia la interacción sobre la membrana del glóbulo rojo (GR) de 3 policationes sintéticas (B22, B86 y B124) seleccionados a fin de disponer de una secuencia cargada positivamente y de segmentos de polietilenglicol de estructura ramificada destinados a prevenir la opsonización y a asegurar la estabilidad física de los GR. Se analizaron las posibles alteraciones en las propiedades viscoelásticas estacionarias y dinámicas de los GR mediante la técnica de difracción láser y en la agregación eritrocitaria mediante el análisis digital de imágenes microscópicas. Los resultados brindan un mejor conocimiento de la acción de los policationes sobre los GR, lo que podría aportar una mayor información acerca de los mecanismos de interacción involucrados. Este estudio es de gran interés para la optimización de estas policationes para futuras aplicaciones con diversos fines terapéuticos (terapia génica, nuevos antibióticos, etc.) como también en transfusión sanguínea (enmascaramiento de antígenos eritrocitarios).

Palabras claves: policationes, eritrocito, viscoelasticidad, polietilenglicol, biocompatibilidad, hemocompatibilidad

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 clinics for human and veterinary purposes. New applications of polycations are investigated in the development of new drug delivery systems, amongst other in order to promote the absorption of drugs through the gastro-intestinal and blood brain barriers. However, still now, there aren't studies about the interaction of these polycations with blood elements (which bear superficial negative charges), unknowing bio-interaction mechanisms. The interaction on the red blood cell membrane of three synthetic polycations (coded B22, B86 and B124) from polyethylene glycol segments with branched structures and positive charged sequences was studied. The alterations over stationary and dynamic viscoelastic properties of erythrocyte membrane were analyzed through laser diffractometry. Image digital analysis was used to study erythrocyte aggregation. Results show different behaviors in the polycation effect on the erythrocyte. These findings could provide more information about the mechanisms of polycation interaction on erythrocyte membrane. We consider that this work could afford useful tools to understand and improve the haemocompatibility of polycations and enlarge their potential clinical applications.

Keywords: polycations, erythrocyte, viscoelasticity, polyethylene glycol, biocompatibility, haemocompatibility

I. Introducción

Los distintos grupos de ionización presentes en la superficie externa de la membrana plasmática son responsables de que la superficie externa de todas las células vivas tengan globalmente una carga negativa expuesta al medio acuoso que las rodea. Este potencial local negativo es entre otros, responsable de la estabilidad física de la célula en la circulación sanguínea, y afecta la conformación /orientación de los compuestos polares insertos en la membrana y en consecuencia influirá en las propiedades reológicas.

Los policationes son compuestos oligoméricos o poliméricos portadores de gran cantidad de cargas catiónicas a pH neutro. Esta amplia familia de

productos puede ser de origen natural o sintético y tienen pesos moleculares que van desde algunos cientos hasta varios miles de Daltons. El interés de estudiar la interacción de estos policationes con material vivo resulta de la acción de tales interacciones sobre las propiedades de dichos sistemas vivientes. Estos últimos están organizados a nivel molecular y supramolecular donde existe un predominio de compuestos policationicos (como por ejemplo proteínas) y complejos aniónicos (como por ejemplo ribosomas o cromatinas). Este ambiente eléctrico negativo local influye ampliamente en la conformación y orientación de los compuestos polares asociados con las estructuras biológicas, tales como las membranas, pero también es responsable de la

estabilidad física de las células en circulación sanguínea.

En este trabajo se estudia la interacción sobre la membrana del glóbulo rojo (GR) de 3 policonjugados sintéticos de una secuencia cargada positivamente y de segmentos de polietilenglicol de estructura ramificada (B22, B86 y B124) seleccionados a fin de asegurar la estabilidad física de los GR. Se analizan las posibles alteraciones de las propiedades viscoelásticas estacionarias y dinámicas de los GR mediante la técnica de difracción láser, y la agregación eritrocitaria mediante el análisis digital de imágenes microscópicas.

II. Materiales y métodos

II.1 Policonjugados en estudio




La arquitectura y las propiedades macromoleculares de los policonjugados estudiados están representadas en la tabla 1, siendo sus características principales:

- B22: Todos los grupos amino son grupos amino terciarios por lo que a pH neutro al menos el 50 % de los grupos amino tendrán cargas positivas.

- B124: Las secuencias PEG están específicamente insertadas en la extremidad de la cadena del policonjugado.

- B86: Las secuencias PEG están insertadas en forma aleatoria a lo largo de la cadena del policonjugado.

TABLA 1: POLÍMEROS SINTÉTICOS UTILIZADOS

Homopolímero P(DMAEMA)
B22

M_n th. ^a 14,600 ; M_n (GPC) ^b : 14,000 ; M_w/M_n 1.19 ; N/g Mmol : 6.3 - No cuaternizado
Copolímero Estadístico P(DMAEMA)-b- P(MAPEG)
B86

M_n MAPEG : 455 ; M_n seq. P(DMAEMA) : ND ; F_w DMAEMA : 26.5 % ; F^d DMAEMA : 51.1 ; M_n (GPC) : 29 100 ; M_w/M_n : 1.56
Copolímero palm-three P(DMAEMA)-b-P(MAPEG)
B124

M_n MAPEG: 3 050; M_n seq. ; P(DMAEMA) : 16 500 F_w DMAEMA: 52.0 % ; F^d DMAEMA 95.0 % ; M_n (GPC) ^b : 30 700 ; M_w/M_n 1.23

II.2 Suspensión de eritrocitos

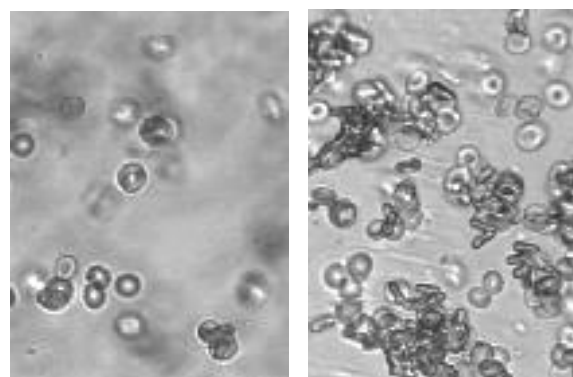
Sangre entera anticoagulada suspendida en un medio viscoso isotónico, constituido por una solución al 5% w/v de polivinil-pirrolidona (PVP 360 Sigma, PM 360 kDa) en buffer fosfato salino (PBS: 0.150 M NaCl, y 0.005 M; pH 7.4±0.05; 295±8 mOsmol/kg). La viscosidad del medio fue ajustada a 22 ± 0.5 cp a 25°C.

II.3 Tratamiento de los GR con los Policonjugados

Los GR lavados fueron incubados durante 30 minutos a 22 °C bajo agitación lateral continua. El hematocrito fue del 40 % y se utilizaron dos concentraciones diferentes de solución de policonjugado: 0.5 y 0.25 mg/ml, indicadas en las gráficas y en la tabla 2 como puro y al ½ respectivamente. Una vez finalizada la incubación, los GR fueron lavados 3 veces con PBS.

II.4 Sistema de medición

Una capa delgada de la suspensión de eritrocitos es colocada entre los dos discos horizontales y concéntricos del Eritrodefómetro. El disco superior es fijo y el inferior es móvil. Una fuente de poder ajustable provee al motor de un voltaje estacionario o con un voltaje sinusoidal oscilatorio. En régimen estacionario el disco inferior rota a velocidad constante. En régimen dinámico el disco inferior rota a velocidades oscilatorias sinusoidales a seis frecuencias preestablecidas: 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, y 3 Hz. Un rayo láser atraviesa la muestra perpendicularmente a la suspensión de eritrocitos produciendo un patrón de difracción que es circular para los glóbulos rojos en reposo y elíptico para los glóbulos rojos deformados. Con la medida del eje mayor y el eje menor de la elipse de difracción se puede calcular el índice de deformabilidad eritrocitaria y con las curvas de crecimiento de la deformación y recuperación de la forma el resto de los parámetros reológicos.



a)

b)

Figura 1: Imágenes obtenidas con un microscopio óptico invertido (National) y una cámara CCD "frame grabber" (Sony XC-75): a) control de GR sin tratar con policonjugado; b) GR tratados con el policonjugado B22.

III. Resultados

En los estudios inmunológicos tradicionales (aglutinación en placa) no se observaron alteraciones en las muestras tratadas con los distintos policonjugados con respecto al control sin tratar. Durante la incubación, se observó un aumento de la agregación y sedimentación de los GRs únicamente para el caso del policonjugado B22 a la máxima concentración.

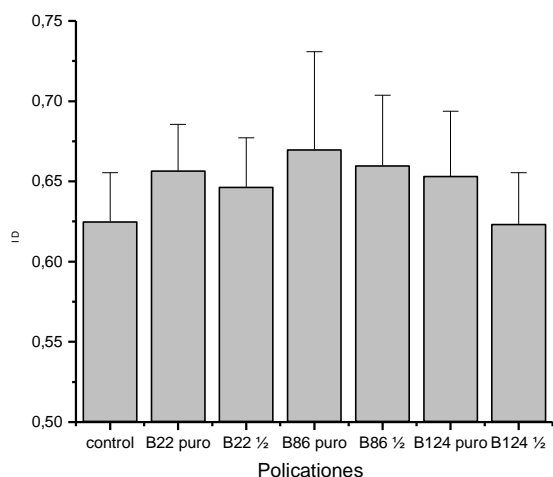


Figura 2: Índice de deformabilidad

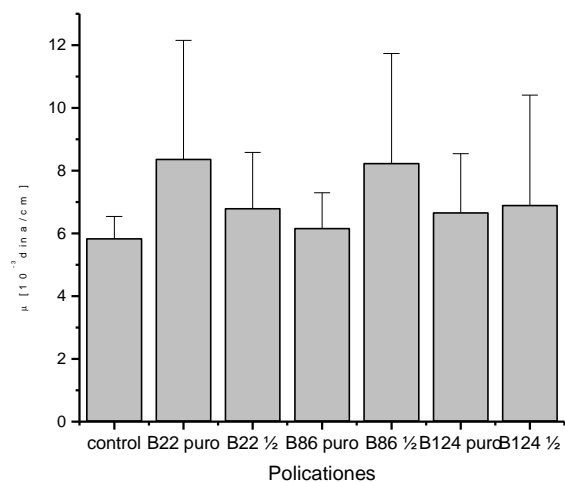


Figura 3: Módulo elástico de la membrana eritrocitaria

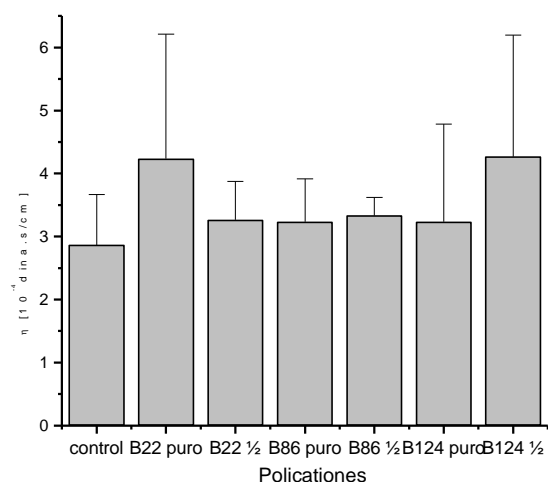


Figura 4: Viscosidad superficial de la membrana eritrocitaria

IV. Discusión y conclusiones

El aumento en la agregación de los GR observada para el caso del policación B22 podría explicarse debido a que al no poseer PEG en su estructura resulta ser el menos biocompatible de los 3 politaciones estudiados. Se observa que los 3 politaciones alteran levemente, pero de diferente manera, las propiedades reológicas de la membrana eritrocitaria, siendo el B22 y el B86 los que mostrarían mayor alteración, evidenciada tanto en el índice de deformabilidad, como en el parámetro dinámico correspondiente al desfase entre la respuesta eritrocitaria y la tensión de corte aplicada. Estos resultados podrían aportar un mejor conocimiento de la acción de los politaciones sobre los GR, lo que aportaría una mayor información acerca de los mecanismos de interacción involucrados. Este estudio es de gran interés para la optimización de estos politaciones para futuras aplicaciones con diversos fines terapéuticos (terapia génica, nuevos antibióticos, etc.) como también en transfusión sanguínea (enmascaramiento de antígenos eritrocitarios).

Tabla 2

Muestra	Desfase 0.5Hz
control	0,25 ± 0,01
B22 puro	0,28 ± 0,01
B22 1/2	0,29 ± 0,01
B86 puro	0,30 ± 0,01
B86 1/2	0,28 ± 0,01
B124 puro	0,27 ± 0,01
B124 1/2	0,25 ± 0,01

Referencias

- 1 – Salmon, C., Cartron, J., Rouger, P. "Les groupes sanguins chez l'homme". 2^{da} edición (1991).
- 2 – Chen S. et al. Biorheology, 32(4), 487-496 (1995).
- 3 – N. Pantoustier, S. Moins, M. Wautier, P. Degée et P. Dubois. Solvent-free synthesis and purification of poly (2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) by atom transfer radical polymerization. Chem Comm 3: 340-1 (2003).
- 4 – I. Ydens, S. Moins, F. Botteman, P. Degée et P. Dubois. Removal of copper-based catalyst in atom transfer radical polymerization using different extraction techniques. e-Polymer (2004) 039, 1-7)
- 5 – S. Piroton, C. Muller, N. Pantoustier, F. Botteman, S. Collinet, C. Grandfils, G Dandrifosse, P. Degée, P. Dubois et M. Raes. Enhancement of transfection efficiency through rapid and noncovalent post-PEGylation of poly(dimethylaminoethyl methacrylate)/DNA complexes. Pharm. Res. (2004) 21, 1471-1479.
- 6 – J. Emonds Alt, « Optimisation de nanovecteurs destinés à la thérapie génique » Graduate thesis in chemistry, CEIB, Faculty of Sciences, University of Liège, 2003-2004.