

ALTERACIÓN DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DEL GLÓBULO ROJO HUMANO POR LA ACCIÓN DE LOS COPOLÍMEROS SINTÉTICOS SEMOB25 Y SEMOB124

ALTERATION OF THE RHEOLOGICAL PROPERTIES OF HUMAN RED BLOOD CELL BY ACTION OF THE SEMOB25 AND SEMOB124 SYNTHETIC COPOLYMERS

M. Delannoy, N. Lerda, L. Triana, A. Fontana, A. Alessi, J. Valverde y B. Riquelme

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario
Óptica Aplicada a la Biología, Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR)
e-mail: briquel@fbioyf.unr.edu.ar, riquelme@ifir-conicet.gov.ar

Se estudió el fenómeno de la adhesión intercelular para suspensiones de GR a distintas concentraciones de los copolímeros codificados SemoB25 y SemoB124 mediante el Eritroagregámetro, el cual se basa en la técnica de láser back scattering, donde la señal registrada es inversamente proporcional al tamaño de los agregados celulares. Se analizaron las alteraciones de la capacidad de agregación de glóbulos rojos tratados con los mismos copolímeros sintéticos estudiando el proceso de agregación y desagregación eritrocitaria. Se analizaron también las posibles alteraciones en los parámetros viscoelásticos de los GR utilizando el Eritrodefórmeter en régimen estacionario: Índice de deformabilidad, viscosidad superficial de membrana y módulo elástico y en régimen dinámico (pérdida dinámica, módulo de almacenamiento y viscosidad compleja). Se realizó el respectivo análisis estadístico de los resultados para evaluar las diferencias significativas con respecto al grupo control. Se puede concluir que el copolímero SemoB124 no produce alteraciones significativas en los parámetros analizados, pero si el SemoB25 cuya estructura difiere en el agregado de PEG, corroborando que este es el que otorga mayor hemocompatibilidad a este grupo de copolímeros sintéticos.

Palabras Claves: policitación, adhesión eritrocitaria, retrodifusión láser, energía específica de adhesión, agregación eritrocitaria

The phenomenon of intercellular adhesion for RBC suspensions was studied at different concentrations of copolymers encoded SemoB25 and SemoB124 using an Eritroagregameter, which is based on the laser backscattering technique, where the recorded signal is inversely proportional to the aggregate size. Changes in the capability of aggregation of RBC treated with the same synthetic copolymers were analyzed by studying the process of erythrocyte aggregation and disaggregation. Possible alterations in the viscoelastic parameters of the RBC were also studied using Erythrodeformeter at steady state: Deformability Index, membrane surface viscosity and elastic modulus in dynamic state (dynamic loss, storage modulus and complex viscosity). Statistical analysis of the obtained results was performed to evaluate significant differences with the control group. Finally we can conclude that SemoB124 copolymer does not produce significant changes in the analyzed parameters, but SemoB25 whose structure differs in the addition of PEG, does produce changes, which proves that this PEG structure addition gives greater hemocompatibility to this synthetic copolymers groups.

Key Words: polycation, erythrocyte adhesion, laser backscattering, specific adhesion energy, erythrocyte aggregation.

I. INTRODUCCIÓN

Los estudios de biocompatibilidad son de indudable importancia para la aplicación de los biomateriales en medicina. 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 tests de hemocompatibilidad constituyen una parte importante en la evaluación de la biocompatibilidad. Los resultados de los screening hemorreológicos muestran que las alteraciones en los parámetros hemorreológicos (viscoelasticidad, agregación, etc.) son indicadores confiables de las características de compatibilidad del biomaterial. En consecuencia, la determinación de los parámetros

viscoelásticos de la membrana eritrocitaria humana (GR), al igual que la caracterización de la agregación eritrocitaria es importante para analizar las alteraciones y para asegurar la estabilidad física de los GR.

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. 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.

El presente trabajo fue realizado en colaboración con el laboratorio de biomateriales de la Universidad de

Lieja (Bélgica), donde el Dr Christian Granfils desarrolló un grupo de copolímeros sintéticos^(1, 2) en base a la estructura del poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato-copolietilenglicol) o P(DMAEMA)-b-P(MAPEG). La estructura y propiedades de los mismos se presentan en la Figura 1. Estos copolímeros fueron desarrollados con fines terapéuticos para interactuar con glóbulos rojos humanos (GR), poseen cargas positivas a pH 7,4 y fueron sintetizados de acuerdo a un nuevo procedimiento controlado de polimerización.




Copolímero "Palmera"	Copolímero Estadístico	Homopolímero
P(DMAEMA)-b-P(MAPEG)	P(DMAEMA)-b-P(MAPEG)	P(DMAEMA)
SemoB124	SemoB86	SemoB25
		
M _n MAPEG: 3050; M _n P(DMAEMA): 16500 M _p /M _n 1.23 Densidad PEG: 48%	M _n MAPEG: 45; M _n P(DMAEMA): ND M _p /M _n : 1.56 Densidad PEG: 74%	M _n th. ^a 14,600; M _n (GPC) ^b : 14,000 ; M _w /M _n 1.19 ; N/g Mmol : 6.3

Figura 1. Arquitectura y propiedades moleculares de los copolímeros sintéticos utilizados.

En trabajos previos^(3, 4, 5) se optimizó el protocolo de tratamiento con estos copolímeros, analizando la influencia del tiempo de incubación de glóbulos rojos humanos (GR) con los copolímeros SemoB86 y SemoB124. Se evaluaron además, las posibles alteraciones que estos copolímeros producen en la viscoelasticidad dinámica de los GR con un Eritrodefórmetro, en su morfología y en las propiedades de agregación (utilizando microscopía convencional y confocal). Se observó que los parámetros viscoelásticos dinámicos se mantuvieron dentro del rango de valores normales al aumentar el tiempo de incubación, para ambos copolímeros, observándose también que los eritrocitos tratados con ambos copolímeros mostraban alteraciones en la distribución del tamaño de los agregados pero no en la morfología eritrocitaria. En todas las determinaciones realizadas se observaron alteraciones en la agregación eritrocitaria, por lo cual se concluyó que este es un parámetro de gran importancia para la evaluación de la biocompatibilidad de este grupo de copolímeros sintéticos.

En este trabajo se estudió la biocompatibilidad con los GR del polication sintético codificado SemoB25, el cual difiere del SemoB124 y SemoB86 analizados anteriormente^(4, 5) en que carece de la estructura de PEG. Las determinaciones se realizaron en paralelo con muestras tratadas con el copolímero SemoB124 con el objeto de utilizarlo como comparación, ya que fue ampliamente estudiado en nuestros trabajos previos.

Los estudios de biocompatibilidad se llevaron a cabo mediante la evaluación de las alteraciones producidas en las propiedades mecánicas y en la agregación de los GR

debido a la interacción con los policationes. Dada la importancia vista anteriormente de analizar los efectos de los policationes sobre la agregación eritrocitaria, en este trabajo se utilizó el Eritroagregámetro⁽⁶⁾, el cual permite realizar un estudio detallado de la cinética de agregación y desagregación eritrocitaria.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Suspensión de GR

Las muestras de sangre provenientes de donadores sanos, fueron recolectadas en recipientes estériles conteniendo EDTA como anticoagulante. Los GR fueron lavados tres veces con buffer fosfato salino (PBS) de pH = 7.4 y osmolaridad = 295 mOsmol/kg.

II.2 Policaciones

Se utilizaron los siguientes copolímeros sintéticos: **SemoB124**: copolímero "palmera" con los segmentos de PEG ubicados específicamente en el extremo de la cadena policationica.

SemoB25: homopolímero DMAEMA; grupos amino terciarios; cuaternizado al 75%.

Se prepararon soluciones de estos policationes a las concentraciones 5, 25 y 50 µg/ml en PBS.

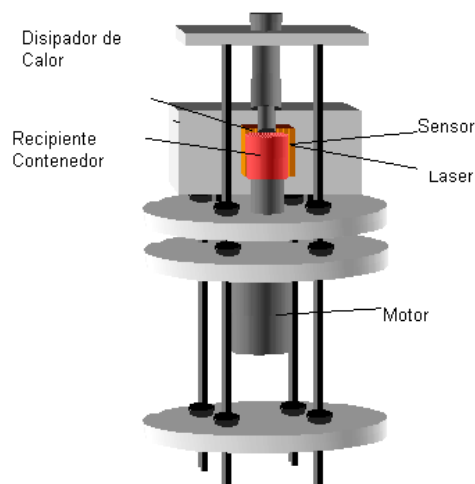


Figura 1. Esquema del Eritroagregámetro.

II.3 Evaluación de la agregación eritrocitaria

Se evaluó la agregación eritrocitaria por la técnica de retrodifusión láser utilizando un Eritroagregámetro⁽⁶⁾. El diseño experimental, permite estudiar el proceso de agregación y desagregación eritrocitaria, resultando de especial interés en aplicaciones clínicas. 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 retrodifusión láser, es inversamente proporcional al tamaño de los agregados y 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.

En la Figura 1 se muestra un Esquema del Eritroagregámetro donde se pueden observar los elementos que lo componen.

II.4 Evaluación de la viscoelasticidad eritrocitaria

Con el Eritrodefórmetro⁽⁷⁾ se determinaron los siguientes parámetros reológicos de la membrana eritrocitaria:

- ID:** Índice de Deformabilidad,
- η_m : viscosidad superficial de membrana
- μ_m : módulo elástico eritrocitario

Se realizó el respectivo análisis estadístico de los resultados para evaluar las diferencias significativas con respecto al control.

II.5 Análisis de la agregación de los eritrocitos

Se suspendieron 0,5 μL de coulot de los GR tratados con los copolímeros y el control en 150 μL de plasma autólogo en un portaobjeto excavado para la observación en un microscopio invertido (40x) acoplado con una CCD (Sony). Se obtuvieron imágenes de las muestras de agregados eritrocitarios a las distintas concentraciones de policaciones y se analizaron para caracterizar la morfología de los agregados y cuantificar su distribución de tamaños, utilizando un programa de análisis digital de imágenes Image-Pro Plus 6.0. Se contaron los agregados de 2, 3 y 4 células y de más de 5 células. En cada uno de ellos se hicieron medidas de área (A) y perímetro (p) obteniéndose el factor de forma de cada agregado mediante la ecuación $ASP = 4\pi A / p^2$

Los agregados globulares presentan un ASP cercano a 1 mientras que los agregados con forma rectangular (*rouleaux*) tienen un $ASP < 1$.

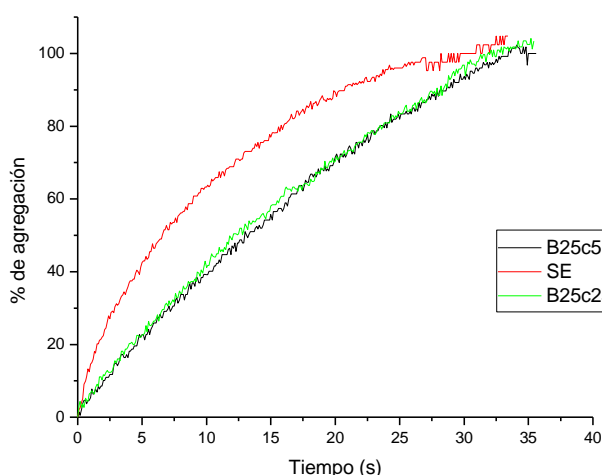


Figura 2. Porcentaje de agregación en función del tiempo para el copolímero B25.

III RESULTADOS Y DISCUSION

En las Figuras 2 y 3 se presentan los porcentajes de agregación en función del tiempo para ambos

copolímeros. Las curvas fueron obtenidas promediando las mediciones realizadas con el Eritroagregámetro para dos muestras diferentes. En estas gráficas, se observan diferencias significativas con relación al control en las cinéticas de agregación a medida que aumenta la concentración del policación SemoB124.

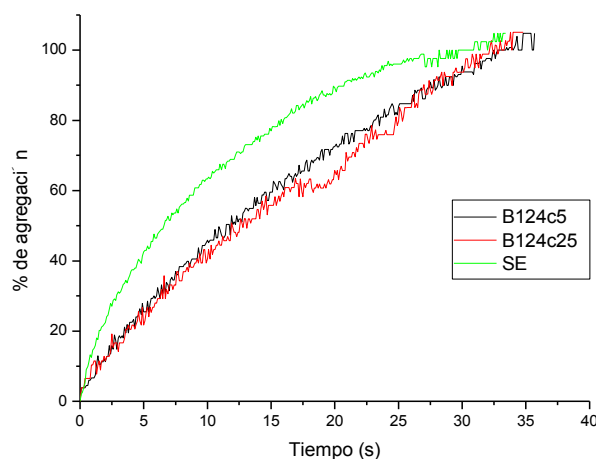


Figura 3. Porcentaje de agregación en función del tiempo para el copolímero SemoB124.

En la Tabla 1 se muestran los tiempos para alcanzar el 50% de agregación y las pendientes correspondientes a los primeros 4 s correspondientes a las curvas de las Figuras 2 y 3. Se observan diferencias significativas con relación al control tanto en el tiempo para el 50% de agregación como en la pendiente para los primeros 4 s en los glóbulos rojos tratados con ambos polímeros. Estas alteraciones son mayores para el SemoB25 y para ambos copolímeros son más pronunciadas al aumentar la concentración del mismo.

TABLA 1: PARÁMETROS DE AGREGACIÓN ERITROCITARIA

MUESTRA	TIEMPO 50% DE AGREGACIÓN [S]	PENDIENTE PRIMEROS 4 S
CONTROL	6.5 ± 0.1	10.31 ± 0.25
B25 - 5 $\mu\text{G/ML}$	13.3 ± 0.1	4.75 ± 0.06
B25 - 25 $\mu\text{G/ML}$	12.1 ± 0.1	4.72 ± 0.10
B124 - 5 $\mu\text{G/ML}$	9.5 ± 0.1	7.02 ± 0.09
B124 - 25 $\mu\text{G/ML}$	12.8 ± 0.1	4.09 ± 0.12

En la Tabla 2 se muestran los parámetros viscoelásticos estacionarios obtenidos con el Eritrodefórmetro para la muestra control y las tratadas con los dos policaciones a las concentraciones de 5 y 25 $\mu\text{g/ml}$. Del análisis de estos parámetros viscoelásticos de los GR, se puede concluir que el copolímero SemoB124 no produce alteraciones significativas en los parámetros analizados, pero si el SemoB25.

TABLA 2: PARÁMETROS VISCOELÁSTICOS ESTACIONARIOS

MUESTRA	μ 10^{-3} DINA/CM	η 10^{-4} Pa.s	ID
CONTROL	8,4 ± 1,6	2,78 ± 0,13	0,655 ± 0,021
B124-5	10,0 ± 2,4	3,47 ± 0,97	0,645 ± 0,023
B124 25	10,1 ± 1,8	3,01 ± 0,62	0,662 ± 0,014
B124-50	14,5 ± 4,8	4,4 ± 0,5	0,633 ± 0,033
B25-5	7,9 ± 2,7	2,84 ± 0,96	0,507 ± 0,338
B25-25	9,7 ± 1,7	3,03 ± 0,76	0,647 ± 0,027
B25-50	12,1 ± 3,5	2,67 ± 0,79	0,601 ± 0,025

En la tabla 3 se muestra la distribución del tamaño de los agregados eritrocitarios. Los mismos fueron contados y clasificados en cuatro categorías: células individuales; agregados de dos, tres y cuatro células; agregados de más de cinco células y AMAS. Se observa que los GR tratados con ambos copolímeros en la concentración de 5 µg/l muestran un aumento en la cantidad de agregados de más de 5 células a expensas de una disminución en el número de células individuales y dobletes. Se observa también la presencia de AMAS, la cual fue más evidente en la concentración de 25 µg/l, confirmando que el efecto del polication sobre la agregación es mayor a medida que aumenta la concentración del polímero.

TABLA 3: DISTRIBUCION DEL TAMAÑO DE LOS AGREGADOS ERITROCITARIOS

MUESTRA	Células aisladas	Grupos 2,3,4	Agregados de > 5	ASP
CONTROL	8 ± 3	12 ± 6	5 ± 1	0.55 ± 0.07
B124 5 µg/ml	7 ± 4	10 ± 4	9 ± 4	0.52 ± 0.09
B124 25 µg/ml	5 ± 3	8 ± 3	7 ± 4	0.56 ± 0.08
B124 50 µg/ml	8 ± 3	7	16 ± 6	0.53 ± 0.09
B25 5 µg/ml	4 ± 2	6 ± 3	9 ± 3	0.57 ± 0.08
B25 25 µg/ml	6 ± 3	9 ± 4	5 ± 3	0.60 ± 0.09
B25 50 µg/ml	16 ± 11	7 ± 1	4 ± 2	0.50 ± 0.09

Sin embargo, según los cálculos de los ASP de los agregados GR tratados con los copolímeros en comparación con los controles, no se observan diferencias significativas en este parámetro de forma, indicando que los copolímeros no alteran significativamente la morfología de los agregados.

III CONCLUSIONES

Se puede concluir que las alteraciones en la agregación eritrocitaria sean mayores en el SemoB25 que en el SemoB124, cuya explicación puede estar dada

en que su estructura difiere en el agregado de PEG, corroborando que este es el que otorga mayor hemocompatibilidad a este grupo de copolímeros sintéticos. A partir de los estudios de distribución de tamaño de los agregados se observa que a elevadas concentraciones de policationes existen alteraciones significativas en la agregación de los eritrocitos con ambos copolímeros empleados, especialmente una disminución del número y tamaño de los agregados con SemoB25 y agregados anormales con SemoB124

El presente estudio contribuye a un mayor conocimiento de la acción de los copolímeros SemoB25 y Semo124 sobre los GR, lo cual brindaría importante información de los mecanismos involucrados en la interacción polication/glóbulos rojos. Estos resultados son de utilidad para optimizar la biocompatibilidad de nuevas policationes para futuras aplicaciones terapéuticas y en transfusión sanguínea.

Referencias

- Grandfils, C., Peulen O., Deloyer, P., Loret, S., and Dandrifosse, G. "Polycations: relationship between chemical structure and biological behavior." In Biologically active amines in food, Luxembourg office of publication of the European Communities 4, 130-137 (2000)
- Pirotton 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).
- Riquelme, B., Foresto, P., Relancio, F., Lebensohn, N., Di Tullio, L., Grandfils, C., Valverde, J. "Evaluación de la acción de nuevas policationes sintéticas sobre las propiedades viscoelásticas de la membrana eritrocitaria". Anales AFA 17:325-327 (2005).
- Danieli V, Fontana A, Alessi A, Foresto P, Valverde J, Grandfils C, Riquelme B. Tratamiento de eritrocitos humanos con copolímeros sintéticos: optimización del tiempo de incubación. Acta Bioquím Clín Latinoam 43 (1) 2009.
- Danieli V., Fontana A., Alessi A., Castellini H., Delannoy M., Foresto P., Grandfils C., Valverde J., Riquelme B. Anales AFA, 19, 226-229 (2007)
- Altube L, A. Marenzana A., Valverde J, Calviño G, Foresto P, Riquelme B. Equipo automatizado para el estudio de la disociación de aglutinados celulares", Anales AFA 17:318-320, 2005
- Riquelme y R. Rasia. "Un material viscoelástico de interés especial: el glóbulo rojo humano". ANALES AFA, Vol. 9, pp. 255-259 (1997)