

EFFECTO DE LOS COPOLÍMEROS SEMO B86 Y SEMO B124 SOBRE LA VISCOELASTICIDAD DINÁMICA Y LA CAPACIDAD DE AGREGACIÓN DE ERITROCITOS HUMANOS

EFFECT OF THE COPOLYMERS SEMO B86 Y SEMO B124 ON DYNAMIC VISCOELASTICITY AND AGGREGATION ABILITY OF HUMAN ERYTHROCYTES

V. Danieli^{♦♥}, A. Fontana[♦], A. Alessi[♦], H. Castellini[♣], M. Delannoy[♦], P. Foresto^{♥♥},
C. Grandfils[♣], J. Valverde^{♥♥} y B. Riquelme^{♥♥}

♦Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario ♥Grupo de Óptica Aplicada a la Biología - Instituto de Física de Rosario (CONICET - UNR) ♣Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura, Universidad Nacional de Rosario ♣Centre Interfacultaire des Biomatériaux (CEIB), Universidad de Lieja, Bélgica
e-mail: briquel@fbioyf.unr.edu.ar

Se analizaron las posibles alteraciones que los copolímeros sintéticos polication-PEG Semo B86 y Semo B124 producen en la viscoelasticidad dinámica de los eritrocitos humanos con un Eritrodefórmeter y en su morfología y propiedades de agregación utilizando microscopía convencional y confocal. Además, se estudió la influencia del tiempo de incubación de las células con estos compuestos a fin de obtener el más adecuado para futuras experiencias. Los resultados mostraron que los parámetros viscoelásticos dinámicos analizados se mantuvieron dentro del rango de valores normales al aumentar el tiempo de incubación, para ambos copolímeros. Por otra parte se observó que los eritrocitos tratados con ambos copolímeros muestran alteraciones en la distribución del tamaño de sus agregados. Estos resultados ayudan a comprender los mecanismos de interacción de estos copolímeros con la membrana eritrocitaria, brindando herramientas útiles para asegurar su biocompatibilidad con los componentes sanguíneos y su optimización para fines terapéuticos, ampliándose además el conocimiento actual sobre la dinámica de la membrana celular.

Palabras Claves: policationes, polietilenglicol, viscoelasticidad, agregación eritrocitaria, biocompatibilidad, procesamiento de imágenes

The potential disturbances in dynamic viscoelastic properties of human erythrocytes produced by the synthetic copolymers polycation-PEG Semo B86 y Semo B124 were analyzed using an Eritrodeformeter, as well as erythrocyte aggregation properties and morphology through conventional and confocal microscopy. Moreover, the influence of incubation time of cells with these compounds was studied so as to obtain the most suitable one for future experiences. The dynamic viscoelastic parameters analyzed for samples treated with either copolymers did not show any significant alterations compared to control sample, for all incubation times studied. On the other hand, modifications in the size distribution of erythrocyte aggregates for treated samples were observed. These results will help to understand the interaction mechanisms of these copolymers with the erythrocyte membrane, providing useful tools to ensure their biocompatibility with blood components and to optimize them for therapeutic purposes, as well as extending the current knowledge about cellular membrane dynamics.

Keywords: polycations, polyethylene glycol, viscoelasticity, erythrocyte aggregation, biocompatibility, image processing

I. INTRODUCCIÓN

Los policationes son oligómeros o polímeros de origen natural o sintético, portadores de gran cantidad de cargas positivas⁽¹⁾. En colaboración con el Centro de Biomateriales de la Universidad de Lieja (Bélgica) se desarrollan policationes sintéticos de características específicas con el objetivo de enmascarar sitios antigénicos de la membrana eritrocitaria humana para disminuir el riesgo de

aloimmunización en transfusiones sanguíneas. En trabajos previos⁽²⁻⁶⁾ se demostró que el recubrimiento con polímeros como el polietilenglicol (PEG) y sus derivados, podría atenuar el reconocimiento antigénico e inmunogenicidad de las células transfundidas modificadas. Es condición necesaria que los polímeros utilizados para tal fin sean biocompatibles, es decir, no tóxicos, no inmunogénicos y biodegradables.

Se diseñaron copolímeros ramificados en los cuales la secuencia central es un polication capaz de unirse al glicocáliz por interacción iónica. Las secuencias laterales están compuestas por segmentos flexibles de PEG, los cuales actuarían como barrera, impidiendo el reconocimiento y opsonización y asegurando la hemocompatibilidad y la estabilidad física de los eritrocitos ⁽⁷⁾.

Teniendo en cuenta que la mayoría de las superficies celulares se encuentran negativamente cargadas, se espera que estos policationes una vez liberados al torrente sanguíneo formen complejos polielectrolíticos con las mismas. El enmascaramiento debe permitir la libre difusión de oxígeno y pequeñas moléculas para mantener el normal funcionamiento y metabolismo celular. Además, es necesario profundizar el conocimiento existente de la relación entre las propiedades macromoleculares de los policationes (peso molecular, densidad de carga, coeficiente de reparto, flexibilidad, etc.) y su influencia sobre las células sanguíneas.

La agregación eritrocitaria es una interacción célula-célula, considerada de crucial importancia en la microcirculación ya que influye en la viscosidad sanguínea *in vivo* ⁽⁸⁾. *In vivo* e *in vitro*, los eritrocitos se agregan naturalmente en presencia de macromoléculas plasmáticas que actúan como puentes intercelulares, formando agregados lineales conocidos como *rouleaux* ⁽⁹⁻¹¹⁾ (ver Figura 1). Cuando estos *rouleaux* se unen lateralmente forman redes filamentosas conocidas como *amas*. El estudio de posibles influencias de diferentes copolímeros sobre la agregación eritrocitaria es de gran importancia ya que aportaría más información para caracterizar la biocompatibilidad de los mismos con los eritrocitos.

Por otra parte, las alteraciones en los parámetros hemorreológicos son también indicadores confiables que caracterizan la biocompatibilidad de estos polímeros ⁽¹²⁾.

En trabajos previos ⁽¹⁵⁾, se analizó el efecto de los copolímeros sintéticos polication-PEG llamados Semo B86 y Semo B124 sobre diferentes propiedades eritrocitarias mediante distintos métodos y variando la concentración de dichos policationes, con el fin de caracterizar la hemocompatibilidad de los mismos. El presente trabajo es una continuación en el cual se analizaron las posibles alteraciones que estos copolímeros producen sobre la viscoelasticidad dinámicas de los eritrocitos, mediante difracción láser utilizando un Eritrodefórmetro ^(13,14), así como también en la agregación y morfología celular, mediante microscopía convencional y confocal. Además

se analizó la influencia del tiempo de incubación de las células con estos compuestos, a fin de obtener el más adecuado para los tratamientos con estos copolímeros.

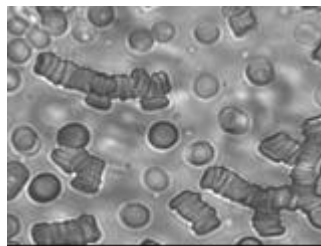


Figura 1. Imagen microscópica registrada de agregados eritrocitarios normales (*rouleaux*)

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Suspensiones eritrocitarias

Las muestras sanguíneas humanas provenientes de donadores sanos ($n = 4$) fueron anticoaguladas con EDTA y centrifugadas a 2000 rpm y 25 °C durante 5 min. Luego de descartar el plasma y la capa leuco-plaquetaria, los eritrocitos fueron lavados tres veces en buffer fosfato salino isotónico (PBS) de pH 7.4 y osmolaridad 295 mOsm/kg. Finalmente, los eritrocitos de cada muestra sanguínea fueron resuspendidos al 12% en el mismo buffer.

II.2 Soluciones de copolímeros

Para este estudio se utilizaron los copolímeros sintéticos Semo B86 y Semo B124, cuya estructura y propiedades fueron reportados en trabajos previos ⁽¹⁵⁾. Las soluciones de dichos copolímeros fueron preparadas a partir de droga sólida a 50 µg/ml en PBS.

II.3 Interacción de los copolímeros con la membrana eritrocitaria

Se incubó 1 ml de suspensión eritrocitaria con 1 ml de cada solución de copolímeros a diferentes tiempos (10, 60, 120 y 150 minutos) bajo agitación lateral continua de 100 rpm y a una temperatura de (25.0 ± 0.5) °C. Como control se utilizó 1 ml de suspensión eritrocitaria incubado con 1 ml de PBS. Concluida la incubación, los eritrocitos fueron lavados 3 veces en PBS. Finalmente, para cada muestra sanguínea se obtuvieron 9 suspensiones diferentes de eritrocitos: la suspensión control y las tratadas con ambos copolímeros a los 4 tiempos diferentes de incubación.

II.4 Determinación de los parámetros viscoelásticos dinámicos

Se aplicó el método de difracción láser utilizando un Eritrodefórmetro en régimen dinámico a 0,5 Hz. Para ello, 50 µl de eritrocitos

tratados y control fueron suspendidos en 4.5 ml de un medio viscoso isotónico ($\eta = 22$ cp, pH = 7.4, 295 mOsmol/kg a 25 °C) y posteriormente introducidos en el dispositivo para su estudio. La metodología utilizada en esta experiencia se encuentra ampliamente descrita en trabajos

anteriores⁽¹⁵⁾. Los parámetros viscoelásticos dinámicos analizados fueron:

δ : Desfasaje entre la tensión de corte aplicada y la respuesta del eritrocito

G' : Módulo de almacenamiento o elasticidad dinámica.

TABLA 1. PARÁMETROS VISCOELÁSTICOS DINÁMICOS A 0,5 HZ VERSUS TIEMPO DE INCUBACIÓN DE LOS ERITROCITOS CON LOS COPOLÍMEROS SEMO B86 Y SEMO B124

Tiempo de incubación [min]	$\delta_{0,5 \text{ Hz}}$ [radianes]			$G'_{0,5 \text{ Hz}}$ [10 ⁻³ dinas/cm]		
	Control	B86	B124	Control	B86	B124
10	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,04	0,19 ± 0,05	6 ± 2	5 ± 2	3,4 ± 0,6
60		0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,05		7,4 ± 0,5	4,5 ± 0,8
120		0,19 ± 0,04	0,21 ± 0,08		5 ± 1	4,9 ± 0,1
150		0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,05		5,1 ± 0,8	4,9 ± 0,08

II.5 Análisis de la distribución de tamaños de los agregados eritrocitarios

Los eritrocitos tratados y control fueron suspendidos en plasma autólogo al 2% de hematocrito y mantenidos en reposo durante 15 minutos (para inducir agregación) en un portaobjetos excavado, el cual fue ubicado sobre la platina de un Microscopio Óptico Invertido (Union Optical). Las imágenes de las diferentes poblaciones de agregados fueron obtenidas con una lente de 20x y una cámara CCD (Sony XC-75). Se registraron tres imágenes para cada muestra eritrocitaria.

Utilizando los programas *IPlab* e *IPPlus*, se realizó un conteo de agregados que fue dividido en cuatro categorías:

- células individuales,
- agregados de 2, 3 o 4 células,
- agregados de 5 o más células
- *amas* (redes de agregados de gran tamaño).

Posteriormente se calculó un porcentaje correspondiente a cada categoría para cada muestra eritrocitaria y finalmente estos porcentajes fueron promediados para todas las muestras sanguíneas estudiadas.

TABLA 2. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LOS AGREGADOS ERITROCITARIOS. VALORES PROMEDIO DE PORCENTAJES PARA CADA CATEGORÍA VERSUS TIEMPO DE INCUBACIÓN DE LOS ERITROCITOS CON LOS COPOLÍMEROS SEMO B86 Y SEMO B124

Tiempo de incubación [min]	Células individuales %	Agregados de 2, 3 o 4 células %	Agregados de 5 o más células %	Amas (grandes redes de agregados) %
CONTROL	37 ± 6	21 ± 4	37 ± 6	5 ± 1
B86 10'	86 ± 4	10 ± 2	3 ± 1	0,4 ± 0,3
B86 60'	86 ± 3	10 ± 2	4 ± 2	0,07 ± 0,07
B86 120'	93 ± 4	7 ± 2	0,2 ± 0,2	0
B 86 150'	91 ± 1	7 ± 1	1,9 ± 0,5	0
B124 10'	67 ± 7	21 ± 6	10 ± 5	2 ± 1
B124 60'	67 ± 7	21 ± 5	10 ± 5	2 ± 1
B124 120'	75 ± 7	19 ± 4	6 ± 4	0,3 ± 0,2
B124 150'	97 ± 3	3 ± 2	0,6 ± 0,4	0

II.6 Análisis de la morfología eritrocitaria

Las muestras eritrocitarias control y tratadas fueron incubadas con el marcador fluorescente DiI3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate (2.15 mM, Molecular Probes, λ_{ex} =549, λ_{em} =565) y posteriormente observadas en un microscopio confocal (Nikon) con el fin de determinar si hubo o no alteraciones en la morfología eritrocitaria luego del tratamiento con ambas soluciones de copolímeros.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Viscoelasticidad dinámica

Los resultados muestran que los parámetros viscoelásticos dinámicos de los eritrocitos humanos analizados (δ y G') se mantienen dentro del rango de valores normales (control) al aumentar el tiempo de incubación, para ambos polimeros (ver Tabla 1). Las variaciones observadas no son significativas,

coincidiendo así con el análisis previo de los parámetros estacionarios⁽¹⁶⁾.

III.2 Distribución de tamaño de los agregados eritrocitarios

A partir de la Tabla 2, se observa que respecto a las muestras control, las tratadas con policationes han sufrido alteraciones en la distribución de los agregados eritrocitarios, evidenciado principalmente en el aumento del porcentaje de células individuales y en la disminución en el porcentaje de grandes agregados. Se observa que este efecto es mayor con Semo B86, y que va en aumento a medida que aumenta el tiempo de incubación. A partir de este análisis, se sugiere 60 minutos como tiempo óptimo de incubación, dado que a partir de allí las alteraciones son cada vez más significativas.

III.3 Morfología Celular

Se observó que la morfología de las células eritrocitarias no se alteró luego del tratamiento con los copolímeros (ver Figura 2).

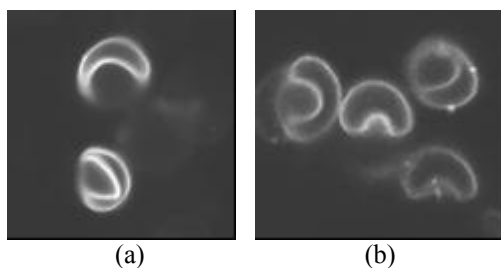


Figura 2. Imagen obtenida con un microscopio confocal: (a) eritrocitos control; (b) eritrocitos tratados con SEMO B124.

IV. CONCLUSIONES

Estos estudios brindan un mejor conocimiento de la acción de estos copolímeros sobre los eritrocitos, lo que aportaría mayor información acerca de los mecanismos de interacción involucrados. A partir de estos resultados se obtienen herramientas útiles para asegurar su biocompatibilidad con los componentes sanguíneos y su optimización para futuros fines terapéuticos, ampliándose además el conocimiento actual sobre la dinámica de la membrana celular.

Referencias

- 1- Grandfils, C., Peulen O., Deloyer, P., Loret, S., and Dandrfosse, 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)
- 2- Garratty, G. Progress in modulating the RBC membrane to produce transfusable universal/stealth donor RBC. *Transfusion Medicine Reviews* 18(4), 245-256 (2004)
- 3- Scott, M.D., Murad, K.L., Koumporouras, F., Talbot, M., Eaton, J.W. Chemical camouflage of antigenic determinants: Stealth erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 7566 (1997)
- 4- Murad, K., Mahany, K., Brugnara, C., Kuypers, F., Eaton, J. and Scott, M. Structural and functional consequences of antigenic modulation of red blood cells with methoxypoly(Ethylene glycol). *Blood* 93(6), 2121-2127 (1999)
- 5- Bradley, A., Murad, K., Regan, K. and Scott, M. Biophysical consequences of linker chemistry and polymer size on stealth erythrocytes: size does matter. *Biochimica et Biophysica Acta* 1561, 147-158 (2002)
- 6- Blackall, D.P., Armstrong, J.K., Meiselman, H.J. and Fisher, T.C. Polyethylene glycol-coated red blood cells fail to bind glycophorin A specific antibodies and are impervious to invasion by the *Plasmodium falciparum* malaria parasite. *Blood* 97(2), 551-556 (2001)
- 7- Elbert, D.L. and Hubbell, J.A. Self-assembly and steric stabilization at heterogeneous, biological surfaces using block copolymers, *Chemistry & Biology* 5, 177-183 (1998)
- 8- Bishop, J.J., Nance, P.R., Popel, A.S., Intaglietta, M. and Johnson, P.C. Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, 222-236 (2001)
- 9- Ponder, E. On sedimentation and rouleaux formation-II. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 12(2), 173-194 (1926)
- 10- Jan, K.M, Chien, S. Influence of the Ionic Composition of Fluid Medium on Red Cell Aggregation. *Journal of general physiology* 6, 655-668 (1973)
- 11- Derganc, J., Bozic, B., Svetina, S. and Zeks, B. Equilibrium Shapes of Erythrocytes in Rouleau Formation. *Biophysical Journal* 84, 1486-1492 (2003)
- 12- Gautam, S.K., Kamat, M.V., Basu, S. Is there a case for haemorheological screening in the haemocompatibility testing of materials? *Biomed Mater Eng* 5(3):141-149 (1995)
- 13- Riquelme y R. Rasia. "Un material viscoelástico de interés especial: el glóbulo rojo humano". *ANALES AFA*, Vol. 9, pp. 255-259 (1997)
- 14- Riquelme, B., Valverde, J. and Rasia, R. Complex viscoelasticity of normal and lectin treated erythrocytes using laser diffractometry. *Biorheology* 35(4,5) (1998)
- 15- Riquelme, B., Foresto, P., Relancio, F., Lebensohn, N., Di Tullio, L., Grandfils, C., Valverde, J. "Evaluación de la acción de nuevas policationes sintéticos sobre las propiedades viscoelásticas de la membrana eritrocitaria". *Anales de la Asociación de Física Argentina*, Vol. 17, pp 325-327 (2005)