



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de

Buenos Aires

Argentina

Danieli, Virginia; Fontana, Alicia Beatriz; Alessi, Adriana Cecilia; Foresto, Patricia Gladis; Valverde, Juana Rosa; Grandfils, Christian; Riquelme, Bibiana Doris

Tratamiento de eritrocitos humanos con copolímeros sintéticos: optimización del tiempo de incubación

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 43, núm. 1, marzo, 2009, pp. 43-48

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires

Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53516745008>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Tratamiento de eritrocitos humanos con copolímeros sintéticos: optimización del tiempo de incubación

Treatment of human erythrocytes with synthetic copolymers: optimization of the incubation time

► Virginia Danieli^{1*,**, Alicia Beatriz Fontana^{2*}, Adriana Cecilia Alessi^{2*}, Patricia Gladis Foresto^{3*,**}, Juana Rosa Valverde^{4*,**}, Christian Grandfils^{5***}, Bibiana Doris Riquelme^{6*,**}}

-
1. Licenciada en Biotecnología
 2. Bioquímica
 3. Doctora de la Universidad Nacional de Rosario – Prof. Adj. Área Inmunohematología
 4. Doctora de la Universidad Nacional de Rosario – Prof. Titular Área Inmunohematología
 5. Doctor en Química
 6. Doctora en Física – Prof. Adj. Área Física

* Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 535, 2000 Rosario, Argentina (e-mail: briquel@fbioyf.unr.edu.ar)

** Grupo de Óptica Aplicada a la Biología, Instituto de Física de Rosario (CONICET - UNR), Boulevard 27 de Febrero 210 bis, 2000 Rosario, Argentina (e-mail: riquelme@ ifir.edu.ar)

*** Centro de Biomateriales de la Universidad de Lieja (Bélgica)

Resumen

Los copolímeros policación-polietilenglicol Semo B86 y Semo B124 fueron desarrollados con fines terapéuticos, en particular, el enmascaramiento de sitios antigenicos de eritrocitos humanos para disminuir el riesgo de aloinmunización en transfusiones sanguíneas. El objetivo de este trabajo fue optimizar el protocolo de tratamiento de los eritrocitos humanos con estos dos copolímeros para mejorar su hemocompatibilidad. Para ello se estudió la influencia del tiempo de incubación de eritrocitos humanos con los dos copolímeros, analizándose las alteraciones producidas sobre la morfología y la capacidad de agregación eritrocitaria, utilizando técnicas de microscopía y análisis digital de imágenes. Se observó que los eritrocitos tratados con ambos copolímeros, si bien no sufrieron cambios en su morfología celular, presentaron alteraciones en la distribución del tamaño y en la estructura de sus agregados. En particular se observó un aumento del porcentaje de células individuales y una disminución del porcentaje de grandes agregados. Este efecto fue más significativo con el aumento del tiempo de incubación, siendo mayor para el Semo B86. Estos resultados permiten comprender mejor la interacción policación/membrana y optimizar el protocolo de tratamiento de eritrocitos con estos compuestos, pudiéndose extender a otros copolímeros de estructuras similares con diferentes aplicaciones terapéuticas.

Palabras clave: policación * polietilenglicol * agregación eritrocitaria * hemocompatibilidad * biocompatibilidad * análisis digital de imágenes

Summary

Polycation – polyethyleneglycol copolymers (Semo B86 and Semo B124) were developed for therapeutic uses, especially for the masking of antigenic sites of human erythrocytes to decrease the risk of aloimmunization in blood transfusions. The aim of this work was to optimize the protocol for treating human erythrocytes using these two copolymers in order to improve their

hemocompatibility. The influence of the incubation time of human erythrocytes with both copolymers and the alterations produced to the morphology and erythrocyte aggregation capacity were studied using microscopy techniques and digital image analysis. Erythrocytes treated with both copolymers showed no changes in their cellular morphology but alterations in the size distribution and structure of aggregates, which were revealed by an increase in the individual cell percentage and a decrease in the percentage of large aggregates. These effects became more marked as the incubation time increased and were greater for Semo B86. These results enable a better understanding of membrane-polycation interactions and the optimization of the protocol to treat erythrocytes using these compounds. This finding may also be applied to the study of copolymers of similar structure and different therapeutic uses.

Keywords: *polycation * polyethylene glycol * erythrocyte aggregation * hemocompatibility * biocompatibility * digital image analysis*

Introducción

En colaboración con el Centro de Biomateriales de la Universidad de Lieja (Bélgica) se desarrollaron polímeros sintéticos de características específicas con fines terapéuticos, en particular, el enmascaramiento de sitios antigenicos de la membrana eritrocitaria humana para disminuir el riesgo de aloinmunización en transfusiones sanguíneas (1). Los copolímeros analizados en el presente trabajo fueron diseñados con ramificaciones sobre una secuencia central de un polímero poliacidógeno capaz de unirse al glicocálix de la membrana eritrocitaria por interacción iónica. Las ramificaciones laterales están compuestas por segmentos flexibles de polietilenglicol (PEG), los cuales actuarían como barrera, impidiendo el reconocimiento y la opsonización, mejorando la hemocompatibilidad y asegurando la estabilidad física de los eritrocitos (2).

En trabajos previos (3-7) se ha demostrado que el recubrimiento con polímeros como el PEG y sus derivados, disminuye el reconocimiento antigenico y la inmunogenicidad de las células transfundidas modificadas. Esta disminución en el reconocimiento antigenico, o enmascaramiento de los sitios antigenicos por los polímeros, no debe interferir la libre difusión de oxígeno y de pequeñas moléculas para mantener el normal funcionamiento y metabolismo celular, siendo de suma importancia, además, que no se produzcan alteraciones significativas en la capacidad de agregación de los eritrocitos, ya que esto influenciaría la microcirculación.

La agregación eritrocitaria es una interacción célula-célula que influye en el flujo sanguíneo *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) y cuando estos *rouleaux* se unen lateralmente forman grandes redes conocidas como *amas*. En consecuencia, el estudio de las posibles influencias sobre la agregación eritrocitaria de los copolímeros desarrollados, permitirá evaluar la bio-

compatibilidad de los mismos con los eritrocitos para futuras aplicaciones como por ejemplo el enmascaramiento de sitios antigenicos (10), como vehículos transportadores de fármacos, en terapia génica, etc.

Los parámetros hemorreológicos son indicadores confiables que pueden caracterizar la biocompatibilidad de estos polímeros (11). En trabajos previos (12), se analizó el efecto de tres copolímeros sintéticos poliacidógeno-PEG llamados Semo B22, Semo B86 y Semo B124, sobre las alteraciones en las propiedades viscoelásticas eritrocitarias con un eritrodefórmetro, variando la concentración de los mismos. Se observó que los 3 polímeros alteran levemente, pero de diferente manera, las propiedades reológicas de la membrana eritrocitaria, siendo el B22 y el B86 los que producían mayor alteración, evidenciada tanto en el índice de deformabilidad, como en el parámetro dinámico correspondiente al desfasaje entre la respuesta eritrocitaria y la tensión de corte aplicada.

El objetivo del presente trabajo fue optimizar el protocolo de tratamiento de los eritrocitos humanos con los copolímeros Semo B86 y Semo B124, a fin de mejorar su biocompatibilidad con los componentes sanguíneos para su uso con fines terapéuticos. Para ello se analizaron las alteraciones que estos copolímeros produjeron sobre la agregación y la morfología eritrocitaria, mediante microscopía convencional y confocal, y el análisis digital de imágenes. Se analizó en particular la influencia del tiempo de incubación de las células con estos compuestos, a fin de obtener el más adecuado para la utilización de los mismos.

Materiales y Métodos

SUSPENSIONES ERITROCITARIAS

Las muestras sanguíneas humanas provenientes de donadores sanos ($n = 4$) fueron anticoaguladas con EDTA y centrifugadas a 2000 rpm a 25 °C durante 5 min. Lue-

go de descartar el plasma y la capa leuco-plaquetaria, los eritrocitos fueron lavados tres veces con *buffer* fosfato salino pH 7,4 y osmolaridad 295 mOsm/kg (PBS). Finalmente, los eritrocitos de cada muestra sanguínea fueron resuspendidos al 12% en el mismo *buffer*.

SOLUCIONES DE COPOLÍMEROS

Para este estudio se utilizaron dos copolímeros sintéticos desarrollados en base a la estructura del poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato-co-polietileneglicol) o P(DMAEMA)-b-P(MAPEG), llamados Semo B86 y Semo B124. Dichos copolímeros poseen cargas positivas a pH 7,4 y fueron sintetizados de acuerdo con un nuevo procedimiento controlado de polimerización (13-15). La estructura y propiedades de los mismos se presentan en la Figura 1.

Se prepararon soluciones de droga sólida a 50 µg/mL en PBS, según el procedimiento descrito por Grandfils y Emonds-Alt (16).

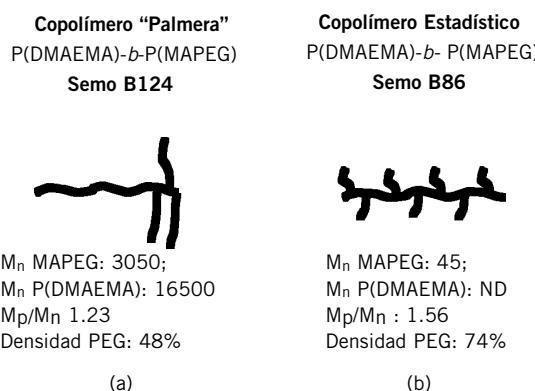


Figura 1. Arquitectura y propiedades moleculares de los copolímeros sintéticos policatión-PEG utilizados en este trabajo. (a) Semo B124: copolímero "palmera" con los segmentos de PEG ubicados específicamente en el extremo de la cadena policatiónica. (b) Semo B86: copolímero estadístico con los segmentos de PEG ubicados al azar a lo largo de la cadena policatiónica.

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 min) bajo agitación lateral continua de 100 rpm y a una temperatura de $(25,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Como control se incubó 1 mL de suspensión eritrocitaria con 1 mL de PBS. Concluida la incubación, los eritrocitos fueron lavados 3 veces con PBS. Las experiencias fueron realizadas por duplicado. Finalmente, para cada muestra sanguínea se obtuvieron 9 suspensiones eritrocitarias: la suspensión control y las tratadas con

ambos copolímeros a los 4 tiempos diferentes de incubación.

ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LOS AGREGADOS ERITROCITARIOS

Los eritrocitos tratados y control fueron suspendidos en plasma autólogo al 2% y mantenidos en reposo durante 15 min para inducir la agregación. Cada suspensión fue examinada en un portaobjetos excavado ubicado sobre la platina de un Microscopio Óptico Invertido (Union Optical, Japón). Las imágenes de las diferentes poblaciones de agregados fueron obtenidas por triplicado con un objetivo de 40X y una cámara CCD (Sony XC-75, Japón) para cada suspensión eritrocitaria. Utilizando los programas *IPLab* e *IPPlus*, se realizó un conteo de agregados, clasificándolos de acuerdo con las siguientes cuatro categorías: células individuales; agregados de 2, 3 ó 4 células; agregados de 5 ó más células y *amas* (redes de agregados de gran tamaño). Posteriormente se calculó el porcentaje correspondiente a cada categoría para cada suspensión eritrocitaria y finalmente estos porcentajes fueron promediados para todas las muestras sanguíneas estudiadas.

ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA ERITROCITARIA

Las muestras de eritrocitos control y tratados fueron incubadas con el marcador lipofílico fluorescente DiI 3,3'-dioctadecil-oxacarbocianina perclorato (2,15 mM, $\lambda_{\text{ex}} = 549 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 565 \text{ nm}$) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor (Molecular Probes, Internacional Invitrogen). Posteriormente fueron observadas en un microscopio confocal (Nikon, Japón) con el fin de evaluar las posibles alteraciones en la morfología eritrocitaria luego del tratamiento con las soluciones de ambos copolímeros.

Resultados

Se estudió el efecto de los copolímeros B86 y B124 sobre la agregación y la morfología eritrocitaria. En la Figura 2 se presentan imágenes de agregados eritrocitarios control y los correspondientes a incubaciones durante 60 min con los copolímeros estudiados, donde se puede observar que tanto la forma como la distribución de tamaño de los agregados ha sido modificada por la acción de los copolímeros.

Se observa además, que para los eritrocitos tratados con Semo B86, los agregados presentaron forma de *rouleaux* pero fueron más pequeños que para el control, en cambio, para los tratados con Semo B124, la forma de los agregados fue diferente de la del *rouleaux* normal.

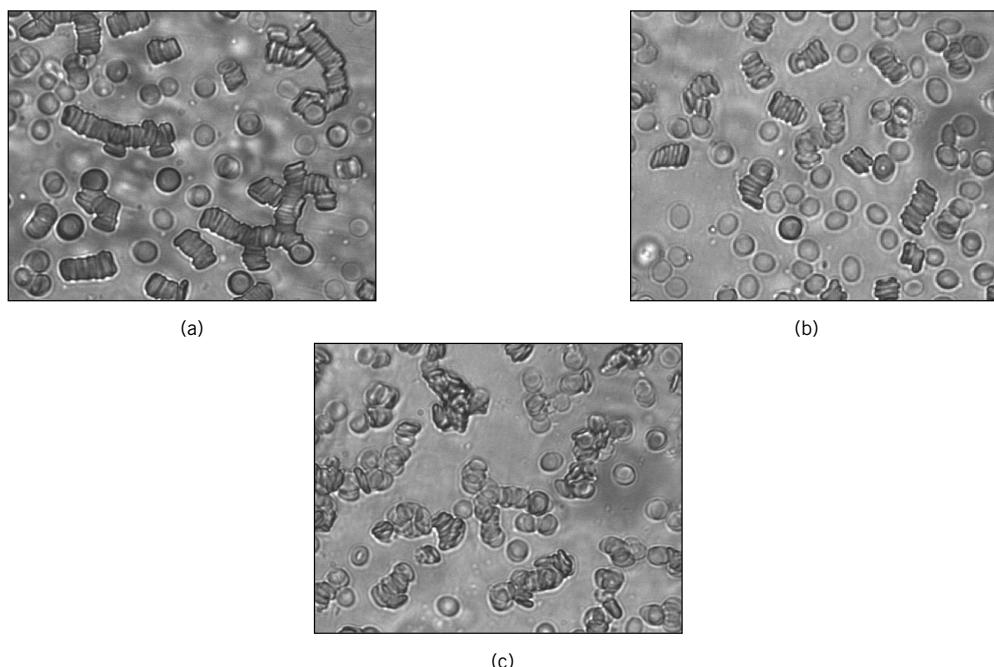


Figura 2. Efecto de los copolímeros B86 y B124 sobre la agregación de eritrocitos humanos (imágenes obtenidas en un microscopio invertido con un objetivo de 40X y una cámara CCD Sony XC-75): (a) agregados eritrocitarios normales (rouleaux) correspondientes a la muestra control; (b) rouleaux pequeños correspondientes a los eritrocitos incubados durante 60 min con el copolímero B86; (c) agregados correspondientes a los eritrocitos incubados durante 60 min con el copolímero B124.

En la Tabla I se muestra la distribución de tamaño de los agregados eritrocitarios obtenidos, presentando los valores promedio de los porcentajes para cada categoría en función del tiempo de incubación. Se observa claramente que aumentó el porcentaje de células individuales en las muestras tratadas con los copolímeros, y disminuyó el porcentaje de grandes agregados (de 5 o más células) y de *amas*.

Los estudios de morfología eritrocitaria realizados mediante microscopía confocal, no mostraron altera-

ciones de los eritrocitos por el tratamiento con los copolímeros en ninguno de los tiempos de incubación ensayados (datos no mostrados).

Discusión y Conclusiones

Se estudió la influencia de dos copolímeros sintéticos sobre la morfología y agregación eritrocitaria. Se observó que la acción de los mismos sobre los eritroci-

Tabla I. 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. Los resultados son presentados como media \pm desvío estándar ($n=4$).

Tiempo de incubación [min]		Células individuales %	Agregados de 2, 3 ó 4 células %	Agregados de 5 ó más células %	Amas %
CONTROL		37 \pm 6	21 \pm 4	37 \pm 6	5 \pm 1
B86	10'	86 \pm 4	10 \pm 2	3 \pm 1	0,4 \pm 0,3
B86	60'	86 \pm 3	10 \pm 2	4 \pm 2	0,07 \pm 0,07
B86	120'	93 \pm 4	7 \pm 2	0,2 \pm 0,2	0
B86	150'	91 \pm 1	7 \pm 1	1,9 \pm 0,5	0
B124	10'	67 \pm 7	21 \pm 6	10 \pm 5	2 \pm 1
B124	60'	67 \pm 7	21 \pm 5	10 \pm 5	2 \pm 1
B124	120'	75 \pm 7	19 \pm 4	6 \pm 4	0,3 \pm 0,2
B124	150'	97 \pm 3	3 \pm 2	0,6 \pm 0,4	0

tos, si bien no produjo cambios en la morfología celular, indujo alteraciones en la composición de los agregados eritrocitarios. Estas alteraciones se evidenciaron principalmente por un aumento del porcentaje de células individuales y una disminución del porcentaje de grandes agregados (*amas*). Este efecto resultó ser mayor con el Semo B86, haciéndose más significativo a medida que aumentó el tiempo de incubación. A partir de estos resultados, se adoptó 60 min como tiempo óptimo de incubación, dado que a partir de allí las alteraciones fueron cada vez más significativas.

Estos resultados muestran que el efecto del tiempo de incubación es un parámetro importante que debe ser considerado para el tratamiento de los eritrocitos humanos con copolímeros, tal como fuera señalado recientemente por Li (21) para el enmascaramiento de sitios antígenicos. Sugieren, además, que los dos copolímeros estudiados difieren en su mecanismo de interacción con la membrana celular. Tal como fue las glicoforinas (10)(17), estas diferencias podrían deberse no sólo a la diferencia de densidad de PEG por cadena del polímero, sino también debido a la menor masa molecular del PEG del Semo B86 (Fig. 1).

Estos estudios brindan un mejor conocimiento de la acción de los copolímeros policación-PEG (Semo B86 y Semo B124) sobre los eritrocitos, en lo que respecta a su influencia en la morfología celular y la agregación eritrocitaria. La evaluación de estas características hemorreológicas es de gran importancia en la microcirculación, evidenciándose en particular en diversas patologías vasculares (8) (18-20).

Se puede concluir también que las técnicas presentadas en este trabajo son herramientas útiles para evaluar la biocompatibilidad desde el punto de vista hemorreológico de policaciones sintéticos que interactúan con eritrocitos humanos, pudiendo extenderse al estudio de la hemocompatibilidad de otros polímeros sintéticos diseñados para futuras aplicaciones con diversos fines terapéuticos (terapia génica, nuevos antibióticos, etc.) como también en transfusión sanguínea (enmascaramiento de antígenos eritrocitarios).

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por el apoyo económico brindado mediante el PICT 03-14483 dentro del marco del proyecto "Investigación de policaciones destinados a enmascarar antígenos eritrocitarios. Caracterización mecanobiológica y de hemocompatibilidad de eritrocitos modificados por las interacciones policaciones-membrana eritrocitaria".

CORRESPONDENCIA

DRA. BIBIANA RIQUELME
Pasaje Salamanca 1021
2000 ROSARIO, Argentina

Referencias bibliográficas

1. Grandfils C, Emonds-alt J. Optimization of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-co-poly(ethylene glycol)/DNA complexes designed for cell transfection. *Minerva Biotec* 2005; 17: 237-43.
2. Elbert DL, Hubbell JA. Self-assembly and steric stabilization at heterogeneous, biological surfaces using block copolymers. *Chem Biol* 1998; 5: 177-83.
3. Garratty G. Progress in modulating the RBC membrane to produce transfusible universal/stealth donor RBC. *Trans Med Rev* 2004; 18(4): 245-56.
4. Scott MD, Murad K, Kouporouras F, Talbot M, Eaton JW. Chemical camouflage of antigenic determinants: Stealth erythrocytes, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7566.
5. Murad K, Mahan K, Brugnara C, Kuypers F, Eaton J, Scott M. Structural and functional consequences of antigenic modulation of red blood cells with methoxypoly(Ethylene glycol). *Blood* 1999; 93(6): 2121-7.
6. Bradley A, Murad K, Regan K, Scott M. Biophysical consequences of linker chemistry and - polymer size on stealth erythrocytes: size does matter. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1561: 1427-58.
7. Blackall DP, Armstrong JK, Meiselman HJ, Fisher TC. Polyethylene glycol-coated red blood cells fail to bind glycoporphin A specific antibodies and are impervious to invasion by the Plasmodium falciparum parasite. *Blood* 2001; 97(2): 551-6.
8. Bishop JJ, Nance PR, Popel AS, Intaglietta M, Johnson PC. Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: 222-36.
9. Berga L, Vives-Corrons J, Feliu E, Woessner S, Rozman C. Hemorreología. Bases teóricas y aplicaciones clínicas. Barcelona: Salvat; 1983.
10. Relancio MF, Riquelme B, Dumas D, Fontana A, Alessi A, Foresto P, et al. Funcionalidad de policaciones sintéticos para el enmascaramiento de sitios antígenicos mediante métodos ópticos. *An Asoc Fis Argent* 2006; 18: 272-4.
11. Gautam SK, Kamat MV, Basu S. Is there a case for haemorheological screening in the haemocompatibility testing of materials? *Biomed Mater Eng* 1995; 5 (3):141-9.
12. Riquelme B, Foresto P, Relancio F, Lebensohn N, Di Tullio L, Grandfils C, et al. Evaluación de la acción de nuevos policaciones sintéticos sobre las propiedades viscoelásticas de la membrana eritrocitaria. *An Asoc Fis Argent* 2005; 17: 325-7.
13. Pantoustier N, Moins S, Wautier M, Degée P, Dubois P. Solvent-free synthesis and purification of poly (2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) by atom transfer radical polymerization. *Chem Comm* 2003; 3: 340-1.
14. Ydens S, Moins F, Botteman P, Degée P, Dubois P. Removal of copper-based catalyst in atom transfer radical polymerization using different extraction techniques. *Polymer* 2004; 39: 1-7.
15. Pirotton S, Muller C, Pantoustier N, Botteman F, Collinet S, Grandfils C, et al. Enhancement of transfection effi-

- ciency through rapid and noncovalent post-PEGylation of poly (dimethylaminoethyl methacrylate)/DNA complexes. *Pharm Res* 2004; 21: 1471-9.
16. Grandfils C, Peulen O, Deloyer P, Loret S, Dandrifosse G. Polycations: relationship between chemical structure and biological behavior. *Biologically active amines in food*. Luxembourg office of publication of the European Communities 2000; 4: 130-7.
 17. Riquelme B, Dumas D, Relancio F, Fontana A, Alessi A, Foresto P, *et al.* Study of polycation effects on erythrocyte agglutination mediated by anti-glycophorins using microscopic image digital analysis. In: Romualda Grzymala, Olivier Haeberle, editors. *Biophotonics and New Therapy Frontiers*. Washington: SPIE; 2006. p. 132-6.
 18. Carrera L, Etchepare R, D'Arrigo M, Vaira SM, Valverde J, D'Ottavio AE, *et al.* Hemorrhologic changes in type 2 diabetic patients with microangiopathic skin lesions A linear discriminant categorizing analysis. *J Diab Compl* 2008; 22 (2): 132-6.
 19. Foresto P, D'Arrigo M, Carrera L, Etchepare R, Valverde J, Rasia R. An approach of red cell aggregation by computerized imagen in diabetes. *Medicina* 2000; 60: 570-2.
 20. Foresto P, D'Arrigo M, Racca L, Filippini F, Gallo R, Valverde J, *et al.* Comparative analysis of aggregate shapes by digitized microscopic images. *Aplications to hypertension*. *Clin Hemorrhol Microcircul* 2002; 26: 137-44.
 21. Li Z. The affection factors on Rh antigen mask with maleimidophenyl polyethylene glycol. *Vox Sanguinis* 2008; 95 (S1): 3-73.

Aceptado para su publicación el 17 de febrero de 2009