

Modificación de la superóxido dismutasa para mejorar sus propiedades biofarmacéuticas

Amalia Domínguez

Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"
Autopista de Varadero km 3 1/2, CP 44740, Matanzas, Cuba
Fax (53)(45)253101; E-mail: amalia.dominguez@umcc.cu

RESUMEN

La superóxido dismutasa (SOD) destruye el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) lo que contribuye al mantenimiento del equilibrio fisiológico antioxidante-prooxidante. Sin embargo, debido a su rápida eliminación de la circulación sanguínea y a su inactivación, como resultado de la interacción con el propio producto (H_2O_2) de la reacción que ella cataliza, su uso terapéutico está limitado. La aplicación terapéutica de la SOD podría aumentarse por modificación química o mediante el uso de hidrogeles a base de polímeros para la liberación controlada de SOD. En este artículo se reportan varias estrategias que se han desarrollado para resolver estas dificultades, incluyendo la encapsulación de la proteína en liposomas, así como la modificación química de enzimas por otras macromoléculas, sobre todo la modificación química de la SOD por carboximetilcelulosa (CMC) y la absorción en hidrogeles de CMC. Estas transformaciones incrementaron el tiempo de vida media de la SOD en la circulación sanguínea para esta enzima y mejoraron sus propiedades farmacológicas.

Palabras claves: superóxido dismutasa, enzima modificada, propiedades biofarmacéuticas

Biotecnología Aplicada 2006;23:11-16

REVISIÓN

ABSTRACT

Modifying superoxide dismutase for improved biopharmaceutical properties. Superoxide dismutase (SOD) destroys superoxide free radical ($O_2^{\cdot-}$) contributing to the maintenance of physiological antioxidant-prooxidant balance. However, due to its rapid elimination from the blood circulation and its inactivation as a result of its interaction with its own reaction product (H_2O_2), the therapeutic use of superoxide dismutase is limited. The therapeutic applicability of SOD could be increased by chemical modification or by means of the use of polymeric hydrogels for the controlled releases of SOD. This paper deals various strategies have been developed for solving these difficulties, including: liposomal encapsulation of the protein, as well as the chemical modification of the enzyme by other macromolecules. Especially chemical modification of SOD with carboxymethylcellulose (CMC) and absorption into hydrogel of CMC. This transformation enhanced the circulatory half-life time for this enzyme and improved pharmacological properties.

Key words: superoxide dismutase, modified enzyme, pharmacological properties

Introducción

Los estudios sobre agentes antioxidantes se encuentran entre las principales investigaciones en el campo de las ciencias médicas, debido a su amplia aplicación en la reducción de los daños causados por los radicales libres [1]. Los radicales libres se producen a partir del oxígeno molecular, comenzando por el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y del peróxido de hidrógeno, y su conversión en potentes oxidantes, tales como el radical hidroxilo, el ácido hipocloroso y el peroxinitrito [2]. Cuando la generación de radicales libres del oxígeno sobrepasa las numerosas barreras de defensas antioxidantes del organismo, se produce un elevado aumento del daño de las estructuras biológicas por lesión química. A este proceso se le denomina estrés oxidativo [3]. Este se define como un desbalance las defensas antioxidantes contra la producción incrementada de los radicales libres anteriormente mencionados [3], los cuales intervienen en diferentes situaciones patofisiológicas, tales como hipertensión, trombosis, diabetes, isquemia a reperfusión, distrés agudo respiratorio, edema pulmonar, pancreatitis aguda, procesos inflamatorios, procesos de mutagénesis, carcinogénesis, envejecimiento y desórdenes neurológicos [4, 5]. Algunas de estas enfermedades crónicas no transmisibles, como el cáncer y la diabetes, se encuentran

entre las principales causas de muerte en países desarrollados; así también la artritis, las nefropatías, las demencias y el proceso biológico del envejecimiento, las cuales se aceleran según la magnitud del estrés oxidativo [6]. Por ello, las defensas antioxidantes del organismo humano son indispensables para preservar la salud.

En algunas afecciones (isquemia, inflamación), la generación de radicales libres puede estar elevada, de forma tal que sobrepase la capacidad neutralizante de las superóxido dismutasas y la catalasa; el radical superóxido puede seguir reduciéndose secuencialmente y dar lugar a otros radicales libres más reactivos y peligrosos como es el hidroxilo, de ahí la importancia de neutralizar el superóxido [7]. Por consiguiente, la interceptación y degradación (detoxificación) del anión $O_2^{\cdot-}$ y del H_2O_2 constituyen una estrategia terapéutica, por lo que la SOD (enzima que convierte el $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2) y la catalasa (enzima que cataliza la conversión de H_2O_2 en agua) se han considerado posibles fármacos antioxidantes. Los resultados de diversos estudios en animales y seres humanos sugieren que la SOD y la catalasa ofrecen una leve protección contra el estrés oxidativo vascular [8], siendo la enzima superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) la más promisoría. Sin

1. Salvemini D, Cuzzocrea S. Therapeutic potential of superoxide dismutase mimetics as therapeutic agents in critical care medicine. *Crit Care Med* 2003;31(1): 29-38.

2. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108:652-9.

3. Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 2000;17:871-90.

4. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305:761-70.

5. Méthy D, Bertrand N, Prigent-Tessier A, Stanimirovic D, Beley A, Marie C. Differential MnSOD and HO-1 expression in cerebral endothelial cells in response to sublethal oxidative stress. *Brain Research* 2004; 1003:151-8.

6. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science* 1996;273:59-63.

embargo, la efectiva aplicación de esta proteína como medicamento se dificulta por las razones siguientes: la enzima posee un tiempo de vida media muy corto en la circulación sanguínea (aproximadamente 5 minutos), por lo que su efecto farmacológico se puede obtener solo mediante la aplicación de varias dosis [9]. Además, esta oxidoreductasa tiende a ser inactivada por su propio producto de reacción, el H_2O_2 , y produce especies radicálicas muy tóxicas para el organismo [10].

Dos estrategias fundamentales se han empleado para el mejoramiento de las propiedades funcionales de la SOD. Una de ellas comprende la modificación covalente de la SOD con macromoléculas hidrosolubles [11, 12]. Los biocatalizadores, así modificados, se pueden emplear como fármacos de efecto prolongado tras la administración parenteral en animales y seres humanos [13]. Por ello, un gran número de polímeros naturales y sintéticos se han usado como agentes modificadores para las enzimas antioxidantes [14-16].

Alternativamente, la efectividad terapéutica de las enzimas se puede incrementar mediante el uso de sistemas de liberación controlada de fármacos sintetizados con hidrogeles, obtenidos a partir de polímeros hidrofílicos, los cuales por lo general poseen una alta biocompatibilidad [17-19]. Estos biomateriales pueden promover, además, la adhesión y proliferación de células que participan en la reparación y regeneración de tejidos [20, 21].

Superóxido dismutasa. Interés médico

Las superóxido dismutasas (SOD, superóxido-superóxido oxidoreductasas, 1.15.1.1) son un grupo de metaloenzimas presentes frecuentemente en organismos aeróbicos, aerotolerantes y en algunos anaeróbicos obligados, esenciales para la defensa contra la toxicidad, causada por los metabolitos parcialmente reducidos que se generan durante la reducción biológica normal del oxígeno molecular.

Al destruir los radicales superóxidos libres, la SOD contribuye al mantenimiento del balance fisiológico entre prooxidantes y antioxidantes [1]. En su forma farmacéutica, Orgotein, la SOD es un potente agente antiinflamatorio; la mejor caracterizada es la extraída del eritrocito bovino, constituida por dos subunidades con un átomo de Cu^{+2} y Zn^{+2} en cada una (CuZn-SOD) [24, 25].

La SOD es una enzima con relevancia médica, por su potencialidad como agente terapéutico en las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y por su función en la moderación de los daños causados por estos procesos [26].

Se conocen tres formas de SOD según el metal que utilizan como cofactor: CuZn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD. Entre ellos no existe homología de secuencias y estructuras de orden superior, lo que indica que evolucionaron independientemente como respuesta a una presión evolutiva común: la presencia del oxígeno y la amenaza de su toxicidad. La Fe-SOD se encuentra generalmente en procariontes [27]. En las células eucariotas existen tres tipos de SOD, cuya localización es diferente: Mn-SOD mitocondrial, CuZn-SOD citosólica y CuZn-SOD extracelular [26]. En el sistema de defensa, estas enzimas tienen la función de eliminar el radical superóxido (O_2^-) antes de que reaccione con

moléculas biológicas susceptibles o que originen otros agentes tóxicos [28].

Todas estas enzimas catalizan la reacción de transformación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno:



Como las concentraciones del O_2^- son normalmente bajas, la reacción depende de su difusión; sin embargo, la asociación de la enzima con su sustrato no se reduce a la simple difusión y colisión.

Aunque el empleo de la enzima nativa ha mostrado resultados alentadores como agente antiinflamatorio, tanto en estudios preclínicos como clínicos [2, 13], su corto tiempo de vida media y la baja resistencia a la inactivación por su propio producto (H_2O_2), es una desventaja que limita su uso como agente terapéutico [3], por lo que resulta de interés la obtención de nuevas formulaciones que permitan mejorar sus propiedades farmacocinéticas.

Formulaciones de SOD. Modificación con polímeros

En los últimos años ha habido un incremento del uso de fármacos de naturaleza proteica, tales como enzimas, hormonas, anticuerpos monoclonales, factor de crecimiento epidérmico [29], entre otros. Sin embargo, su rápida eliminación, su alta inmunogenicidad y antigenicidad, y baja estabilidad en condiciones fisiológicas, representan limitaciones que frecuentemente afectan la administración sistémica de estos agentes terapéuticos [2].

Se han desarrollado métodos que atrapan físicamente estas sustancias bioactivas en estructuras artificiales o naturales, tales como liposomas, microesferas, eritrocitos y otros que tratan de solucionar las dificultades antes mencionadas [29-31]. La modificación química de la superficie de proteínas por la conjugación covalente a polímeros solubles y no tóxicos, ha demostrado ser una técnica eficiente que permite solucionar el problema [32-34]. Este método ha permitido mejorar las propiedades farmacológicas, farmacocinéticas e inmunológicas de las enzimas con aplicaciones terapéuticas, como son las peroxidases [11], la catalasa [12] y la superóxido dismutasa [13, 35], entre otras muchas.

Actualmente, se ha reportado la utilidad de diferentes polímeros en la modificación química de proteínas, como dextrana, polivinil pirrolidona, ácido hialurónico, entre otros [39-41]; el polietilenglicol fue el primero en utilizarse [36-38].

La catalasa y la SOD se modificaron químicamente con poli (etilen) glicol (PEG) por Beckman y col., 1988 [42]. Estos observaron que al adicionar las enzimas modificadas a un cultivo de células endoteliales, estas aumentaban su resistencia a los efectos oxidantes de las especies reactivas del oxígeno, ya que se fortalecía la asociación de la enzima con la membrana celular y con ello la penetración a la célula. Ello se comprobó por un aumento de la actividad enzimática de estas enzimas antioxidantes en las células antes mencionadas, después de la incubación durante un periodo con las enzimas conjugadas. También se ha probado que al modificarse la SOD con PEG mejora sus propiedades antiinflamatorias y el tiempo de vida

7. Lu R-H, Chang TM, Yen MH, Tsai LM. Involvement of Superoxide Anion in the Pathogenesis of Simple Mechanical Intestinal Obstruction. *J Surg Res* 2003;115:184-90.

8. Muzykantor VR. Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *Journal of Controlled Release* 2001;71:1-21

9. Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Kamada H, Sato K, Okamoto T, Mukai Y, et al. Poly(vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic acid) as a novel renal targeting carrier. *Journal of Controlled Release*; 2004.

10. Jewett SL, Rocklin AM, Ghanevati M, Abel JM, Marach JA. A new look at a fireworn system: oxidation of CuZn-SOD by H_2O_2 . *Free Radic Biol Med* 1999;26:905-18.

11. Darias R, Villalonga R. Functional stabilization of cellulase by covalent modification with chitosan. *J Chem Technol Biotechnol* 2001;76:489-93.

12. Gómez L, Ramírez HL, Villalonga R. Chemical modification of α -amylase by sodium alginate. *Acta Biotechnol* 2001, 21:162-8.

13. Veronese FM, Caliceti P, Schiavon O, Sergi M. Polyethylene glycol-superoxide dismutase, a conjugate in search of exploitation. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:587-606.

14. Morawski B, Lin Z, Cirino P, Joo H, Bandara G, Arnold FH. Functional expression of horseradish peroxidase in *S. cerevisiae* and *P. pastoris*. *Protein Eng* 2000;13:377-84.

15. Costa SA, Tzanov T, Carneiro AF, Para A, Gübitz GM, Cavaco-Paulo A. Studies of stabilization of native catalase using additives. *Enzyme Microb Technol* 2000; 30:387-91.

16. Sonmez K, Demirogullari B, Turkyilmaz Z, Karabulut BS, Kale N, Basaklar AC. Effects of polyethyleneglycol-superoxide dismutase (PEG-SOD) and pentoxifylline on small intestinal anastomoses established in the 24th hours of reperfusion: an experimental study in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001;110:97-106.

17. Barbucci R, Magnani A, Rappuoli R, Lamponi S, Consumi M. Immobilisation of sulphated hyaluronan for improved biocompatibility. *J Inorg Biochem* 2000; 79:119-25.

18. Barbucci R, Magnani A, Consumi M. Swelling Behaviour of Carboxymethylcellulose hydrogels in relation to cross-linking, pH and charge density. *Macromol* 2000;33:7475-80.

19. Chupa J, Foster A, Sumner S, Madhally S, Matthew H. Vascular cell responses to polysaccharide materials in vitro and in vivo evaluations. *Biomaterials* 2000;21:2315-22.

20. Sandeman SR, Faragher RGA, Allen MCA, Liu C, Lloyd AW. Novel materials to enhance keratoprosthesis integration. *Br J Ophthalmol* 2000;84:640-4.

21. Dinga Z, Chena J, Gaoa S, Changa J, Zhanga J. Immobilization of chitosan onto poly-L-lactic acid film surface by plasma graft polymerization to control the morphology of fibroblast and liver cells. *Biomaterials* 2004;25:1059-67.

media en la sangre [36, 43]. El aumento del tiempo de permanencia en la circulación sanguínea puede estar relacionado con la filtración renal, la cual disminuye como consecuencia de la disminución de la carga positiva en la molécula de SOD, producto de la modificación química, ya que en este proceso participan los grupos amino de la enzima, que se convierten en grupos amida con la consecuente disminución de esta carga [44]. Existe una correlación entre la elevación del peso molecular, debido a la conjugación con el polímero, y el tiempo de vida en la sangre después de la administración endovenosa de estos conjugados [43, 45]. El mejoramiento de la actividad antiinflamatoria puede explicarse por el aumento del tiempo de circulación de la enzima en la sangre, al estar en forma de conjugado.

La modulación de la farmacocinética y de la farmacodinámica de proteínas conjugadas con PEG se ha estudiado *in vivo* e *in vitro* incluyendo la SOD [46], así como la disminución de la inmunogenicidad y la antigenicidad, con el empleo de diferentes vías de administración. Se ha constatado que la aplicación de la SOD modificada en los vasos sanguíneos provoca una disminución de la peroxidación lipídica. El PEG-SOD en el corazón resultó ser por lo menos tan eficaz como la SOD nativa en el tratamiento de arritmias por reperfusión e isquemia del miocardio. En el pulmón, parece disminuir la toxicidad del oxígeno y el daño de lesiones por infecciones provocadas por *Escherichia coli*. En la isquemia renal y hepática, atenuó los daños ocasionados por reperfusión [10].

El conjugado polianiónico, producto de la modificación covalente de la SOD con el copolímero de éter divinilo y anhídrido maleico (conocido como DIVEMA), retuvo una buena actividad SOD [47], con un aumento del tiempo de vida media, una mayor captación por los receptores hepáticos y un potente efecto inhibitorio a la producción de especies reactivas del oxígeno en el hígado de ratas. Ello favoreció la disminución de los procesos inflamatorios intrahepáticos, ya que la rápida eliminación del plasma y la limitada captación de la SOD por el hígado dificultó la efectividad antiinflamatoria de esta enzima en las enfermedades hepáticas [48].

En el tratamiento del edema de pulmón en ratas, causado por reperfusión del bronquio después de estar tres días ligado, este conjugado polianiónico mostró una efectiva protección contra el edema al ser comparado con la SOD nativa y el DIVEMA. El análisis a través del microscopio electrónico corroboró esta diferencia. La superficie celular de los vasos sanguíneos de los animales tratados con SOD-DIVEMA no mostró una elevada adhesión de leucocitos, lo que sí ocurrió con la de los animales tratados con SOD [49]. Esta observación indicó que SOD-DIVEMA detiene el proceso inflamatorio desde su primera etapa, el de adhesión y el de expansión de los leucocitos.

También la SOD ha sido modificada con la sal sódica del ácido hialurónico (HA). Grupos amino de la enzima se acoplaron con grupos carboxilo de la molécula de hialuronato con el empleo de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, y el conjugado SOD-HA retuvo el 70% de la actividad de la SOD no modificada. En ratones, tuvo una respuesta no inmunogénica y

presentó una elevada actividad antiinflamatoria, al compararlo con los resultados obtenidos por la SOD y el HA en los modelos biológicos que semejan enfermedades inflamatorias: el modelo del edema de la pata inducido por la carragenina y el de la artritis adyuvante en ratas [41].

También en los tejidos dañados por quemaduras se manifiestan los rasgos del proceso inflamatorio mencionados antes, donde la superproducción de mediadores bioquímicos, la activación de leucocitos y de células endoteliales tienen consecuencias en zonas locales y distantes [50].

Como consecuencia del daño celular en tejido isquémico por especies oxidantes reactivas (ERO), se ha reportado la utilidad de CuZn superóxido dismutasa recombinante (Rc-CuZn-SOD). Esta también se ha empleado en tejidos de animales dañados por quemaduras (como en la piel del lomo del conejo). Hay evidencias de que el tratamiento local de heridas por quemaduras con los eliminadores de radicales libres enzimáticos como el Rc-CuZn-SOD encapsulada en liposomas, tiene un efecto beneficioso al disminuir la magnitud del daño tisular posquemaduras [51]. Al aplicar este tratamiento en diferentes estadios posquemadura se corroboró una reducción del edema, las lesiones se hicieron más pequeñas, y la necrosis del tejido fue menor al compararlo con los grupos control no tratados, lo cual desarrolló una reepitelialización significativamente más rápida a las tres semanas, de modo que se constataron los efectos beneficiosos sobre la disminución de los procesos inflamatorios [53]. Ello puede estar relacionado con la acción de la SOD al reducir los niveles de anión superóxido, y evitar que ocurra la peroxidación de fosfolípidos, componente fundamental de las membranas celulares, que aumentan considerablemente cuando la piel se inflama o se quema, lo cual trae como consecuencia la modificación de la permeabilidad de estas [53].

La artritis reumatoidea, enfermedad autoinmune que afecta las articulaciones, se caracteriza por una infiltración de la articulación afectada por células de la sangre [54] que generan las especies reactivas del oxígeno y provocan una situación de estrés oxidativo. Esta puede ser neutralizada con el uso de antioxidantes como agentes terapéuticos. Por ejemplo, la SOD es eliminadora de radicales libres, pero su rápida eliminación de la circulación sanguínea es una gran limitación [55]. Algunos estudios han demostrado la utilidad de liposomas de polietilenglicol (PEG-liposomas) para la liberación controlada de SOD a los sitios artríticos, lo que evidencia que puede ser eficazmente portada a los sitios inflamados por pequeños liposomas de PEG [54]. Por otra parte, las inyecciones de CuZn-SOD bovina han actuado promoviendo inmunorregulación en ratas con poliartritis inducida por adyuvante [55].

La SOD también se ha encapsulado en liposomas preparados con el empleo de lecitina de soya, estearilamina, fosfatidilglicerol y colesterol, cubiertos de quitosana que actúan como un mucoadhesivo. Ello no ha mostrado ninguna pérdida significativa de la actividad enzimática de un mes a 4 °C o en dos días a 37 °C. Por ello, estos liposomas cargados de SOD y cubiertos de quitosana pudieran ser muy útiles en el transporte y descarga de este fármaco y otros a las mucosas [31].

22. Hough MA, Hasnain SS. Crystallographic structures of bovine copper-zinc superoxide dismutase reveal asymmetry in two subunits: functionally important three and five coordinate copper sites captured in the same crystal. *J Mol Biol* 1999;287: 579-92.

23. Banci L, Bertini I, Cramaro F, Del Conte R, Viezzoli MS. The solution structure of reduced dimeric copper zinc superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 2002;269: 1905-15.

24. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1600-19.

25. Venereo JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 2002;31:126-33.

26. Céspedes M, Ela M. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar radicales libres. *Rev Cubana Inv Biomed* 1996;15:75-8.

27. Orive G, Hernández RM, Rodríguez A, Domínguez A, Pedraza JL. Drug delivery in biotechnology: present and future. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:659-64.

28. Kitao T, Hattori K. Urokinase immobilized on erythrocytes. *Thromb Haemost* 1980;43:70-6.

29. Galovic R, Rengel K, Barisic Z, Pavelic T, Grubisic Z, Cepelak I, Filipovic-Grcic J. High efficiency entrapment of superoxide dismutase into mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Eur J Pharm Sci* 2002; 15:441-8.

30. Veronese FM, Morpurgo M. Bioconjugation in pharmaceutical chemistry. *Il Farmaco* 1999;54:497-516.

31. Pluta J, Karolewicz B. New possibilities of application of multifunctional polymers and polymer conjugates. *Acta Pol Pharm* 2003;60:211-4.

32. Mehvar R. Recent trends in the use of polysaccharides for improved delivery of therapeutic agents: pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives. *Curr Pharm Biotechnol* 2003;4:283-302.

33. Valdivia A, Pérez Y, Domínguez A, Caballero J, Gómez L, Schacht E, Villalonga R. Improved anti-inflammatory and pharmacokinetic properties of superoxide dismutase by chemical glycosidation with carboxymethylchitin. *Macromol Biosci* 2005;5:118-23.

34. Veronese FM, Boccà E, Schiavon O, Velo GP, Conforti A, Franco L, Milanino R. Anti-inflammatory and pharmacokinetic properties of superoxide dismutase derivatized with polyethylene glycol via active esters. *J Pharm Pharmacol* 1983;35: 757-8.

35. Veronese FM, Caliceti P, Pastorino A, Schiavon O, Sartore L. Preparation, physico-chemical and pharmacokinetics characterization of monomethoxypoly(ethylene glycol) derivatized superoxide dismutase. *J Control Release* 1989;10: 145-54.

36. Veronese FM, Monfardini C, Caliceti P, Schiavon O, Scraven MD, Beer D. Improvement of pharmacokinetic, immunological and stability properties of asparaginase to linear and branched monomethoxypoly(ethylene glycol). *J Control Release* 1996;40:199-206.

Teniendo en cuenta el concepto básico de que al eliminar el radical superóxido se modula el proceso inflamatorio, se han diseñado superóxidos dismutasa artificiales de bajo peso molecular, las cuales pueden emplearse como agentes terapéuticos en enfermedades de diferentes orígenes [56].

Otra forma mediante la cual se ha logrado incrementar la aplicación terapéutica de péptidos y proteínas farmacéuticamente activas, es con el empleo de sistemas de liberación controlada de fármacos sintetizados a base de hidrogeles [57]; pero no tenemos conocimiento de que otros autores hallan usado esta formulación para portar a la SOD.

Hidrogeles y su aplicación

Muchos son los materiales que se aplican en la fabricación de dispositivos médicos: metales, cerámicas, polímeros y diferentes materiales biológicos (entre ellos, los geles) que recientemente han adquirido una función importante en la ciencia de los biomateriales [58].

Los geles son estados particulares de la materia, intermedios entre sólido y líquido, constituidos de una matriz sólida polimérica reticulada, permeable al agua [59, 60]. Técnicamente, los geles son sistemas semisólidos, formados por pequeñas porciones de sólidos, dispersos en cantidades relativamente grandes de líquido.

Estos biomateriales se emplean como soporte para la proliferación celular, proveen una red tridimensional para la formación de un tejido nuevo, y ayudan al mantenimiento de la estructura y las funciones [61, 62].

En realidad, los hidrogeles son una red formada por entrecruzamientos de polímeros hidrofílicos, que poseen la propiedad de absorber gran cantidad de agua (más del 20% de su peso) o fluidos biológicos e hincharse, manteniendo su estructura tridimensional [63].

Las primeras aplicaciones de los hidrogeles datan de más de 30 años, cuando Wichterle y Lim, 1960 [64] sugirieron su utilización en la medicina, por su semejanza, desde el punto de vista físico, con las matrices celulares. Ellos propusieron el uso de la red hidrofílica de poli (2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA) en la construcción de lentes de contacto, vigentes hasta nuestros días [17]. Desde entonces, el empleo de hidrogeles se ha extendido a diferentes aplicaciones biomédicas [64] y farmacéuticas [66]: se usan en la ingeniería tisular como matrices extracelulares [67], en el revestimiento de la piel (quemaduras) [68] y en los sistemas de liberación controlada de fármacos [69], entre otras.

La literatura cita diversos ejemplos de síntesis y caracterizaciones de hidrogeles, sobre todo partiendo de polisacáridos naturales reticulados, los cuales se han usado para aplicación médica y farmacéutica en forma de hidrogeles [62, 70].

Algunos hidrogeles obtenidos por entrecruzamiento de polímeros hidrofílicos, representan un importante grupo de biomateriales en biotecnología y medicina. Muchos de estos tienen una excelente biocompatibilidad [71] al causar daños mínimos por trombosis, respuesta inflamatoria y otras lesiones. Esto se debe a que pueden absorber grandes cantidades de agua por su composición hidrofílica y estructura enrejada, ya

que tienen una elevada permeabilidad para el oxígeno, nutrientes y otros metabolitos solubles [72].

El desarrollo de sistemas liberadores de fármaco ha sufrido una revolución en los últimos años, con el advenimiento de nuevos sistemas a base de hidrogel, lo que ha motivado que muchos de ellos hayan elevado su beneficio terapéutico [66].

Algunos polímeros de fuentes naturales, sintéticas o semisintéticas pueden ser utilizados para la preparación de hidrogeles. Generalmente se emplean polímeros que contienen grupos hidroxilo, amino, amida, éter, carboxilato y sulfonato como grupos funcionales en sus cadenas.

Muchos de estos hidrogeles hidrofílicos están integrados por polisacáridos naturales como hialuronato, alginato y carboximetilcelulosa [73]. Una de las características más sobresalientes de estos geles poliónicos es la de absorber agua por un valor de cientos de veces su propio peso, y conservar su integridad y elasticidad.

Se han realizado estudios *in vitro* en los que el ácido hialurónico (Hyal) se ha modificado por inserción de grupos sulfato a sus grupos hidroxilo. Algunos ensayos *in vitro* con células endoteliales y condrocitos mostraron que estas células manifestaban una buena adhesión y un crecimiento celular en presencia de estos geles sulfatados, lo que hace pensar que este biomaterial pudiera utilizarse para reparar cartílagos y para la endotelización de los vasos [14], aunque su alto costo sería una limitación.

En un reporte reciente se compara la conducta de varias matrices de alginato de sodio, y muestra que estas fueron un eficaz soporte cuando se usaron en cirugía reconstructiva de injerto de hueso [74].

La carboximetilcelulosa (CMC) también se ha utilizado para la preparación de geles con fines médicos [19]. Ella es un éter aniónico, derivado de la celulosa, ampliamente comercializado. La CMC es un polisacárido soluble, que se usa en el campo farmacéutico como agente emulsificante, en la producción de cosméticos y en la industria alimentaria. En el campo biomédico, se emplea para prevenir adherencias pos-operatorias y cicatrices epidurales [75]. Se reporta una experiencia quirúrgica de 15 años con implantes de geles de CMC en cirugía de mamas, los cuales por su atoxicidad y su viscoelasticidad se hacen cada vez más confiables para el revestimiento de injertos [19]. Valeriani y cols., 2002 [20] reportaron una experiencia similar.

Sannino y cols., 2003 [75] proponen utilizar hidrogeles sintetizados a base de carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa como sistemas eliminadores de agua en el tratamiento de edemas, lo cual pudiera ser una alternativa en la terapia diurética en afecciones que lleven al edema.

Nuestro grupo de trabajo desarrolló métodos de síntesis de conjugados enzimáticos por modificación química de la superficie proteica de la SOD con los polisacáridos iónicos como carboximetil quitina [35], manano [77] y con CMC [78]. La glicosidación con la CMC se realizó mediante dos métodos: alquilación reductiva con el derivado polialdehídico de la CMC y con carbodiimida como agente acoplante en la formación de uniones amida [79]. Se sintetizaron hidrogeles a base de este polímero, con diferentes grados de entre-cruzamiento -54 y 91% -, por adición

37. Fujita T, Yasuda Y, Takakura Y, Hashida M, Sezaki H. Alteration of biopharmaceutical properties of drugs by their conjugation with water-soluble macromolecules: Uricase-dextran conjugate. *J Control Release* 1990; 11:149-56.

38. Caliceti P, Shivano O, Morpurgo M, Sartore L, Ranucci E, Ferrutini P, Veronese FM. Physico-chemical and biological properties of monofunctional hydroxyl terminating poly(N-Vinylpyrrolidone) conjugated superoxide Dismutase. *J Bioactive Compat Polym* 1995;10:103-19.

39. Sakurai K, Miyazaki K, Koderia Y, Nishimura H, Shingu M, Inada Y. Anti-inflammatory activity of superoxide dismutase conjugated with sodium hyaluronate. *J Glycoconj* 1997;14: 723-8.

40. Beckman JS, Minor RL, White CW, Repine JE, Rosen GM, Freeman BA. Superoxide Dismutase and Catalase Conjugated to Polyethylene Glycol Increase Endothelial Enzyme Activity Oxidant Resistance. *J Biol Chem* 1988;263:6884-92.

41. Nakaoka R, Tabata Y, Yamaoka T, Ikada Y. Prolongation of the serum half-life period of superoxide dismutase by poly(ethylene glycol) modification. *J Control Release* 1997;46:253-61.

42. Veronese FM. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* 2001;22:405-17.

43. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci* 1994;83:601-6.

44. Mehvar R. Modulation of the pharmacokinetic and pharmacodynamic of proteins by polyethylene glycol conjugation. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2000;3: 125-36.

45. Hirano T, Todoroki T, Kato S, Yamamoto H, Caliceti P, Veronese FM, Maeda H, Ohashi S. Synthesis of the conjugate of superoxide dismutase with the copolymer of divinyl ether and maleic anhydride retaining enzymatic activity. *J Control Release* 1994;28:203-9.

46. Swart PJ, Hirano T, Kuipers ME, Ito Y, Smit C, Hashida M, Nishikawa M, et al. Targeting of superoxide dismutase to the liver results in anti-inflammatory effects in rats with fibrotic livers. *J Hepatol* 1999; 31:1034-43.

47. Hirano T, Todoroki T, Morita R, Kato S, Ito Y, Kim K, Shukla PG, Veronese F, Maeda H, Ohashi S. Anti-inflammatory effect of the conjugate of superoxide dismutase with the copolymer of divinyl ether and maleic anhydride against rat re-expansion pulmonary edema. *J Control Release* 1997;48:131-9.

48. Sánchez R, Llopiz N, Leyva L, Albuerno, Y, Broche F, Peña M, González Y, García JC. Caracterización de indicadores bioquímicos de estrés oxidativo en pacientes quemados muy graves. *Rev Cubana Invest Biomed* 2000;19:164-7.

49. Vorauer-Uhl K, Furnschief E, Wagner A, Ferko B, Kattinger H. Reepithelialization of experimental scalds effected by topically applied superoxide dismutase: controlled animal studies. *Wound Repair Regen* 2002;10:366-71.

estequiométrica de 2-cloro-1-metilpiridin ioduro (CMP-I), según describen Magnani y cols., 2000 [59]. La enzima se incorporó en el hidrogel por absorción, con el objetivo de sintetizar sistemas controlados de liberación de SOD, y se obtuvieron dos formulaciones: conjugados SOD-CMC y sistemas SOD@CMC hidrogel [78]. Se realizó la caracterización química y biológica de los conjugados obtenidos y de los sistemas SOD@CMC hidrogel sintetizados. Ello dio como resultado una enzima modificada que contenía 1.2-1.8 moles de polímero por mol de proteína, además, la SOD retuvo valores aceptables de actividad específica (método xantina oxidasa), tanto en los sistemas SOD@CMC hidrogel como en las formas de conjugados SOD-CMC [78]. Estos nuevos preparados enzimáticos mejoraron las propiedades biológicas y farmacológicas de la enzima al compararla con la enzima nativa, lo cual elevó la posibilidad de aplicación médica. Los conjugados enzimáticos presentan un mayor tiempo de vida media que la enzima nativa, mayor actividad antiinflamatoria y resistencia a la inactivación frente al peróxido de hidrógeno [79, 80]. Además, se realizó la cinética de liberación de la enzima de los sistemas SOD@hidrogel, y se observó que la máxima cantidad de SOD liberada fue del 50% después de las 72 horas [81].

Los efectos de los conjugados de SOD-CMC y de los sistemas de SOD@CMC hidrogel sobre el crecimiento de fibroblastos humanos se evaluaron, midiendo el índice de inhibición de la proliferación celular (IIPC) *in vitro*, como un indicador de biocompatibilidad, y la morfología de la célula en términos de área y perímetro. En general, la adición de SOD a CMC polímero e hidrogeles reduce su IIPC. El sistema de CMC hidrogel con 54% de entrecruzamiento, mostró un menor índice (IIPC = 4.4 ± 2.4) [78].

Teniendo en cuenta la función de las células endoteliales y de los fibroblastos en la reparación y regeneración de tejidos lesionados por diferentes causas, entre ellas, el estrés oxidativo [82], se estudió la cinética de proliferación de estas células en presencia de los hidrogeles con 54 y 91% de entrecruzamiento y los correspondientes sistemas SOD@CMC_{hidrogel}. Las curvas de proliferación celular, tanto de los fibroblastos como de las células endoteliales, muestran que la presencia de los sistemas SOD@CMC_{hidrogel} no afecta la proliferación de estas células; al contrario, las células que crecieron en presencia del sistema SOD-CMC con 54% de reticulación alcanzaron resultados significativamente mejores. Estos resultados se deben a la morfología del gel: el hidrogel actúa como una matriz o soporte que favorece la proliferación de los fibroblastos, en particular el sistema SOD-CMC 54%, el cual presenta una estructura más esponjosa que los geles de SOD-CMC con 91% de entrecruzamiento, verificado por análisis con microscopio electrónico (Figura 1a, b, c y d). Esta estructura porosa y esponjosa, proporciona un ambiente que favorece el crecimiento celular, al facilitar el intercambio de nutrientes de sustancias gaseosas y de metabolitos. Tal intercambio se hace más difícil en los geles con 91% de reticulación de estructura más compacta (Figura 1b y d).

La sisa del poro del soporte esponjoso es importante para el crecimiento y la extensión de las células, así como para la vascularización después del trasplante [83].

También se ha demostrado que el tratamiento con Cu/Zn SOD recombinante encapsulada en liposomas a tejidos de animales dañados por quemaduras, reduce el edema más rápido, las lesiones se hacen más pequeñas y la necrosis del tejido es menor al compararlos con los grupos control, pues se percibe una reepitelización significativamente más rápida a las tres semanas [50].

Todo lo anterior evidencia que la síntesis de sistemas SOD@hidrogel por absorción de la enzima en hidrogeles sintetizados a base de CMC es una estrategia correcta para portar la SOD a tejidos u órganos lesionados, en los que, por diferentes causas, se está desarrollando un incremento de radicales superóxidos a zonas donde sea necesario estimular la proliferación celular, como vía para ayudar a la regeneración tisular.

La utilización de CMC como portador de SOD queda demostrada en las nuevas formulaciones obtenidas de la SOD con carboximetilcelulosa, derivado de un producto natural, de bajo costo, ampliamente usado en la producción de alimentos y en la industria farmacéutica, lo cual avala su atoxicidad, se mejoran importantes propiedades como el tiempo de vida media, el efecto antiinflamatorio y cicatrizante, sin afectar la biocompatibilidad y, sobre todo, mejora la resistencia a la inactivación frente al peróxido de hidrógeno, lo cual no se ha logrado cuando se modifica con otros polímeros. Los resultados al hacer interactuar la enzima con este polímero, sientan las bases para futuros ensayos clínicos y servirán como metodología para estudios con SOD obtenidas de otras fuentes, como la vegetal, o para modificar otras proteínas de interés clínico.

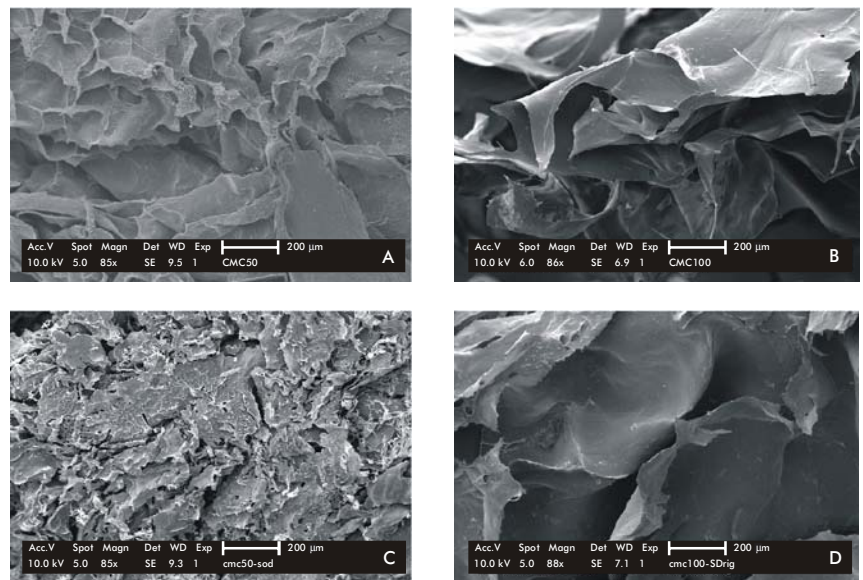


Figura 1. Imágenes examinadas al microscopio electrónico

50. Vorauer-Uhl K, Furnschliel E, Wagner A, Ferko B, Katinger H. Topically applied liposome encapsulated superoxide dismutase reduces postburn wound size and edema formation. *Eur J Pharm Sci* 2001;14:63-7.

51. Niwa Y. Lipid peroxides and superoxide dismutase (SOD) induction in skin inflammatory diseases, and treatment with SOD preparations. *Dermatologica* 1989; 179:101-6.

52. Corvo ML, Boerman OC, Oyen WJ, Van Bloois L, Cruz ME, Crommelin DJ, Storm G. Intravenous administration of superoxide dismutase entrapped in long circulating liposomes. II. In vivo fate in a rat model of adjuvant arthritis. *Biochim Biophys Acta* 1999;1419:325-34.

53. Zhou C, Fang Y, Jiang D, Yang S, Lu X, Sui J, Li P, Ren J. Preclinical trials of human erythrocyte superoxide dismutase injection. *J Chin Med* 2000;113:654-6.

54. Muscoli C, Cuzzocrea S, Riley DP, Zweier JL, Thiemermann C, Wang ZQ, Salvemini D. On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. *Br J Pharmacol* 2003;140:445-60.

55. Michailova V, Titeva S, Kotsilkova R, Krusteva E, Minkov E. Water uptake and relaxation processes in mixed unlimited swelling hydrogels. *Int J Pharm* 2000; 209: 45-56.

56. Griffith LG. Polymeric biomaterials. *Acta Mater* 2000;48:263-77.

57. Magnani A, Rappuoli R, Stefania LY, Barbucci R. Novel polysaccharide Hydrogels: Characterization and properties. *Polym Adv Technol* 2000;11:488-95.

58. Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002;23:4307-14.
59. Ohya S, Nakayama Y, Matsuda T. Thermo-responsive artificial extracellular matrix for tissue engineering: hyaluronic acid bioconjugated with poly(N-isopropylacrylamide) grafts. *Biomacromolecules* 2001; 2:856-63.
60. Risbud M, Bhonde M, Bhonde R. Chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel does not activate macrophages: potentials for transplantation applications. *Cell Transplant* 2001;10:195-202.
61. Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *DDT* 2002;7:5695-78.
62. Wichterle O, Lim, D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* 1960;185:117-8.
63. Hoffman AS. Hydrogels for medical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:3-12.
64. Peppas NA. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50:27-46.
65. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 2001;101:1869-79.
66. Vogt PM, Hauser J, Rossbach O, Bosse B, Fleischer W, Steinau HU, Reimer K. Polyvinyl pyrrolidone-iodine liposome hydrogel improves epithelialization by combining moisture and antiseptics. A new concept in wound therapy. *Wound Repair Regen* 2001;9:116-22.
67. Luo Y, Kirker KR, Prestwich GD. Crosslinked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *J Control Rel* 2000; 69:169-84.
68. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically cross-linked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;57:19-34.
69. Cadee JA, Van Luyn MJA, Van Wachem PB, Brouwer LA, de Groot CJ, Den Otter W, Hennink WE. *In vivo* biocompatibility of dextran-based hydrogels. *J Biomed Mater Res* 2000;50:397-404.
70. Zheng XS, Liu Y, Palumbo FS, Luo Y, Prestwich GD. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25:1339-48.
71. Barbucci R, Leone G. Formation of defined microporous 3D structures starting from crosslinked hydrogels. *J Biomed Mater Res* 2004;68B:117-26.
72. Vogelín E, Jones NF, Lieberman JR, Baker JM, Tsingotjidou AS, Brekke JH. Prefabrication of one by use of a vascularized periosteal flap and bone morphogenetic protein. *Plast Reconstr Surg* 2002;109:190-8.
73. Arion H. Carboxymethylcellulose hydrogel-filled breast implants. Our experience in 15 years. *Ann Chir Plast Esthet* 2001;46:55-9.
74. Sannino A, Madaghiele M, Conversano F, Mele G, Maffezzoli A, Netti PA, Ambrosio L, Nicolais L. Cellulose Derivative-Hyaluronic Acid-Based Microporous Hydrogels Crosslinked through Divinyl Sulfone (DVS) To Modulate Equilibrium Sorption Capacity and Network Stability. *Biomacromolecules* 2004; 5:92-6.
75. Valeriani M, Mezzana P, Madonna S, Terracina F. Carboxy-methyl-cellulose hydrogel mammary implants: our experience. *Acta Chir Plast* 2002;44:71-6.
76. Sannino A, Esposito A, De Rosa A, Cozzolino A, Ambrosio L, Nicolais L. Biomedical application of a superabsorbent hydrogel for body water elimination in the treatment of edemas. *J Biomed Mater Res* 2003;67A:1016-24.
77. Valdivia A, Domínguez A, Pérez Y, Caballero J, Hernández Y, Villalonga R. Improved pharmacological properties for superoxide dismutase modified with Mannan. Correspondent to *Macromol Biosci*, 2005.
78. Domínguez A, Valdivia A, Hernández J, Villalonga R. Biocompatibilidad *in vitro* de Superóxido dismutasa interactuando con polímero e hidrogeles de carboximetilcelulosa ensayado con fibroblastos humanos. *Revista de Biotecnología Aplicada* 2004; 21:218-23.
79. Domínguez A, Valdivia A, Caballero J, Martínez G, Hernández Y, Schacht E, Villalonga R. Improved pharmacological properties for superoxide dismutase modified with carboxymethylcellulose. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 2005;20:557-70.
80. Domínguez A, Pérez Y, Villalonga R, Chiumento A, Lamponi S, Barbucci R. Cu, Zn-SOD into hydrogels of carboxymethylcellulose improves its stability and the repair of wounds opened up in rats. Manuscript is in press in the magazine *Biochemistry (Moscow)*; 2006.
81. Barbucci R, Magnani A, Lamponi S, Chiumento A, Domínguez A, Villalonga R. Biological activity of Superoxide Dismutase interacting with Carboxymethylcellulose polymer and hydrogel. Correspondent to *Journal of Material Science, materials in Medicine* 2006.
82. Contran RS, Kumar V, Collins T, Robbins. *Patología estructural y funcional*. 6ta edición McGraw-Hill Interamericana de España. 2000:53-119.
83. Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, Orgill DP. Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. *Science* 1982;215:174-6.

Recibido en junio de 2005. Aprobado en diciembre de 2005.