

Título: Proceso de Relajación Magnética del Deuterio durante la polimerización de la Hemoglobina S.

Autores: Lic. Yunior Cabrales Fontela, yunior@cbm.uo.edu.cu,

Dr. Manuel A. Lores Guevara, Lic. Yurisel Machado Batista,

Centro de Biofísica Médica. Patricio Lubumba s/n. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, 90500. Cuba.

Introducción

Como se ha publicado en artículos recientes [1, 2], el proceso de polimerización de la Hemoglobina S (Hb S) [3, 4] es el proceso molecular básico de la Anemia Drepanocítica (AD) [5]. Por otro lado la patofisiología de esta enfermedad esta relacionada con los cambios de la forma y las propiedades físicas de los glóbulos rojos [6]. Por esta razón puede existir una conexión entre la aglutinación macromolecular y la membrana del eritrocito: una modificación de la interacción Hb S-membrana. La interacción entre la HbS desoxigenada (desoxHbS) y la membrana de glóbulos rojos incluye interacciones electrostáticas [7], las que pueden cambiar si se modifica la distribución de cargas dentro de la solución de Hb como resultado de la polimerización. En este caso los gradientes de campo eléctrico de la solución de Hb pueden ser modificados.

Parámetros físicos tales como: tiempos de relajación magnética del protón [1], movilidad macromolecular y microviscosidad [2] dentro de la solución de Hb han sido caracterizados mostrando cambios significativos y dando nueva información de la polimerización de la HbS bajo condiciones de desoxigenación espontánea.

La sensibilidad de la relajación magnética del deuterón (d) a los cambios de los gradientes de campo eléctricos en torno al núcleo, en contraste con la relajación magnética del protón (p) [1], puede dar nueva información acerca de los cambios de los gradientes de campo eléctrico interno, y la alteración de la distribución de cargas dentro de la solución de HbS bajo condiciones de desoxigenación espontánea.

Un rápido intercambio es establecido entre las moléculas de agua libre dentro del solvente (F) y las enlazadas a la Hb (B) en soluciones de Hb deuteradas bajo temperatura,

concentración y pH fisiológicos. Entonces, el tiempo de relajación espín – espín (T_2) medido tanto para el protón [9-13], como para el deuterón [14-17], pueden ser expresadas como:

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)^p = \left(\frac{PB}{T_2B}\right)^p + \left(\frac{PF}{T_2F}\right)^p$$

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)^d = \left(\frac{PB}{T_2B}\right)^d + \left(\frac{PF}{T_2F}\right)^d$$

donde PF y PB representan las poblaciones de agua libre y enlazada respectivamente. Como ha sido demostrado [1:82], el cociente correspondiente al agua enlazada a la Hb dominara la relajación:

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)^p = \left(\frac{PB}{T_2B}\right)^p$$

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)^d = \left(\frac{PB}{T_2B}\right)^d$$

Para la evaluación de los cambios de gradientes de campo eléctricos internos, se analiza la alteración de la distribución de carga dentro de la solución de Hb S como resultado de la polimerización bajo condiciones de desoxigenación espontánea. Con este objetivo, se compara el comportamiento temporal del T_2 del protón y del deuterón determinados simultáneamente en muestras de Hb parcialmente deuteradas.

Materiales y Métodos

Preparación de las muestras de Hb. Las muestras de sangre fueron obtenidas a partir de sangre total venosa donadas por individuos voluntarios y pacientes [1, 18]. Para la obtención de la solución de Hb deuterada, los glóbulos rojos fueron incubados en una solución de Buffer fosfato salino deuterado (PBSD) durante 2 h, lavados 3 veces con PBSD, hemolizado por congelación y centrifugado (2000 rpm, 10 min) para remover el sobrenadante [1]. Las soluciones de hemoglobina A (Hb A) y Hb S no deuteradas fueron obtenidas por procedimiento clásico [1, 2]. Luego de esto, se prepararon 20 muestras de 350 μ l mezclando 80% y 20 % de solución de Hb deuteradas y no deuteradas,

respectivamente, para ser usadas en experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Método de relajación magnética Protónica. El T_2 fue determinado en el Giromag 01 (4 MHz) usando la serie de pulsos de Hahn, a 36 °C, y con un error menor del 5%. Las mediciones fueron realizadas durante 8 h de desoxigenación espontánea.

Análisis estadístico. Para comparar los valores principales de los parámetros físicos analizados, se usa un test de student ($\alpha=0.05$). Antes de esto, se demuestra la distribución normal de la data y se usa el test de Fisher ($\alpha=0.05$) para el análisis variacional.

Resultados

El comportamiento temporal del T_2 del protón y el deuterón en muestras parcialmente deuteradas de HbA y HbS se muestra en la Figura 1. La explicación y descripción detallada del comportamiento del T_2 del protón ha sido publicado [1]. En la HbA tiene lugar el comportamiento temporal constante del T_2 del deuterón. Sin embargo, en la HbS, se observan las tres regiones en el comportamiento temporal sigmoideal: la región I y III, donde la efectividad de la relajación es parcialmente constante; y en la región II, T_2 disminuye en un tiempo promedio de 2.68 ± 0.35 h. El comienzo de este decrecimiento se define por el tiempo de demora (t_d) [1, 2, 18].

Haciendo una comparación, teniendo en cuenta diferentes parámetros que caracterizan la relajación magnética espín – espín a lo largo del proceso de polimerización de la HbS, tales como los valores de T_2 inicial y final (T_{2in} , T_{2fin}) y t_d , son presentados en la Tabla 1.

Discusión

Los valores de T_2 del protón y el deuterón obtenidos a partir de las muestras de Hb S y Hb A están en concordancia con las consideraciones teóricas encontradas en la literatura [1, 14, 19]. En trabajos anteriores [1] se ha demostrado que el T_2 del protón depende del tiempo de

correlación rotacional del agua enlazada a la proteína (ρ_C) y de la frecuencia (ω) usada en el experimento:

$$\left(\frac{1}{T_2 B}\right)^p = C_{p-p} \left[3\rho_C + \frac{5\rho_C}{1 + \omega^2 \tau_C^2} + \frac{4\rho_C}{1 + 4\omega^2 \tau_C^2} \right] \quad (1)$$

donde C_{p-p} es el valor cuadrático medio de la energía dipolar protónica. Por el contrario, la relajación magnética espín – espín del deuterón incluye contribuciones magnéticas (M) y eléctricas (E):

$$\left(\frac{1}{T_2 B}\right)^d = \left(\frac{1}{T_2 B}\right)^{dM} + \left(\frac{1}{T_2 B}\right)^{dE} \quad (2)$$

La contribución magnética puede ser determinada usando la Ec. (1), considerando la interacción dipolar intramolecular del deuterón dentro del agua enlazada a la Hb.

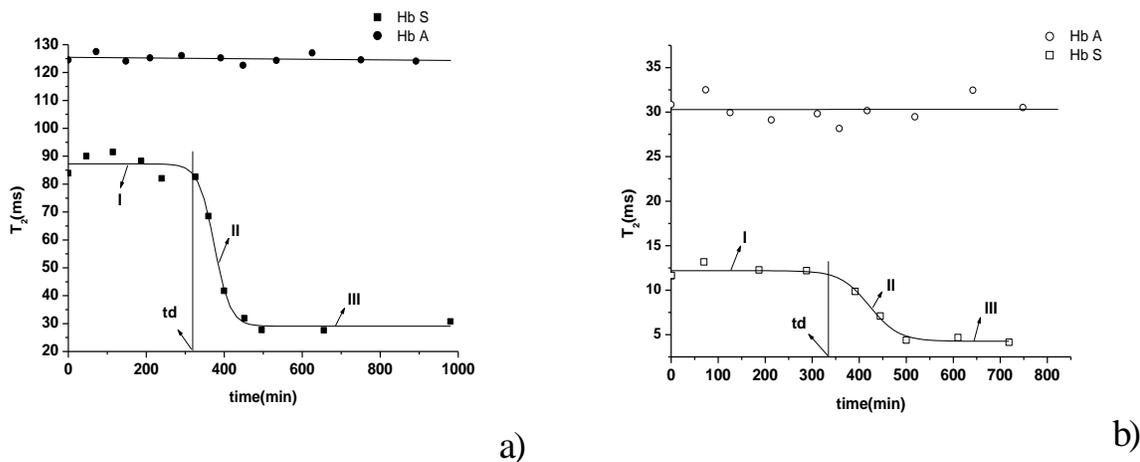


Figura 1. Comportamiento temporal de T_2 en Hb S mezcladas (80% deuteradas, 20% no-deuteradas) a 36 °C bajo desoxigenación espontánea. a) T_2 del protón; b) T_2 del deuterón. Las líneas continuas representan el ajuste sigmoidal y lineal de la data experimental obtenida para las muestras de Hb S y Hb A, respectivamente. Las regiones I, II y III

coinciden con las tres etapas características del proceso de polimerización de la Hb S, y el td, con el irreversible comienzo de la aglutinación macromolecular.

En soluciones deuteradas de Hb podemos encontrar tres tipos de agua enlazada dependiendo del contenido de deuterio: no-deuterada (ppO), parcialmente deuterada (pdO) y completamente deuterada (ddO). En el valor de C para la interacción p-d (C_{p-d}) dominara la interacción dipolar del deuterón, teniendo en consideración los valores de la razón giromagnética del protón y el deuterón (γ_p y γ_d) [19]. Por otro lado, la componente eléctrica de la relajación magnética del deuterón depende del momento cuadrupolar eléctrico del deuterio (Q), la movilidad de la molécula de agua (μ_c) y los gradientes de campo eléctrico alrededor de la molécula (q) [14]:

$$\left(\frac{1}{T_2 B}\right)^{dE} = C_Q \left(\frac{2\pi e^2 q Q}{h}\right)^2 \pi$$

(3)

Tabla 1. Principales valores de T_{2in} , T_{2fin} y td obtenidos del comportamiento temporal del protón y del deuterón durante la polimerización de la HbS.

Parámetros	protón (^1H)	deuterón (^2H)
$T_{2in}(\text{ms})$	104 ± 24	16 ± 4
$T_{2fin}(\text{ms})$	49 ± 20	9 ± 2
T_{2in}/T_{2fin}	2.86 ± 0.42	2.68 ± 0.35
td (min)	335 ± 25	371 ± 28

donde $(\propto \frac{e^2 q Q}{h})$, llamada constante de acoplamiento cuadrupolar, incluye las constantes universales e y h . La constante C_Q contiene información acerca del número cuántico de espín del deuterón y la asimetría de la molécula.

Teniendo en cuenta que ya se ha explicado, la contribución a la relajación magnética en el caso del deuterón será menor que la del protón dando lugar a menores valores del T_2 del protón. Sin embargo, los valores del T_2 del deuterón son menores que los valores de T_2 del

protón según las muestra de HbS y HbA del experimento (Figura 1). Este resultado afirma la contribución dominante de la componente eléctrica de la relajación magnética del deuterón Ecs. (2 y 3) y la presencia de gradiente de campo eléctrico interno dentro de la solución de Hb.

El comportamiento sigmoidal de T_2 del deuterón para la HbS que muestra la Figura. 1 puede ser explicado considerando el desarrollo del proceso de polimerización; el comportamiento constante del T_2 de la HbA apoya esta conclusión. Las regiones I, II y III coinciden con las tres etapas características de la aglutinación macromolecular [1, 2]: nucleación, polimerización irreversible y la formación estructural de microdominios. Durante la polimerización de la HbS, el tiempo de correlación rotacional (ρ_R) aumenta dos veces [2], causando un incremento de ρ_C [1] y una disminución de T_2 (Ecs. (1)-(3)).

Debido a que la relajación del deuterón es potencialmente determinada por la movilidad del agua enlazada (ρ_C) y los cambios de gradientes de campo eléctrico (Ecs. (1) y (3)), mientras que la relajación del protón solo es afectada por variaciones de ρ_C Ec. (1); la disminución de los valores de T_2 del deuterón (Figura 1b) deben ser mayores que los valores de T_2 del protón (Figura 1a), considerando la posibilidad del incremento del gradiente de campo eléctrico interno como resultado de la polimerización de la HbS. Sin embargo la Tabla 1 muestra que no existe diferencias estadísticas entre los valores de los parámetros físicos del protón y el deuterón.

Sin embargo, la Tabla. 1 nos muestra que no existen diferencias significativas entre los valores de los parámetros t_d y T_{2in}/T_{2fin} para ambos núcleos durante el proceso de polimerización de la HbS. En otras palabras, el T_2 del protón y del deuterón describen en la misma medida el proceso de polimerización de la HbS bajo condiciones de desoxigenación espontánea siendo este proceso el factor común que determina el comportamiento obtenido y que implica un incremento de ρ_R y de ρ_C .

Los resultados obtenidos no muestran evidencias del incremento de gradientes de campos eléctricos internos dentro de la solución de HbS como resultado del proceso de polimerización. Por esta razón no podemos encontrar evidencias experimentales acerca de la aparición de alteraciones en las distribuciones de cargas dentro de la solución de HbS durante el proceso de polimerización en condiciones de desoxigenación espontánea.

Conclusiones

El tiempo de relajación espín – espín del deuterón muestra un comportamiento sigmoide compuesto por tres regiones en muestras de solución de Hb S bajo condiciones de desoxigenación espontánea. Esto es, describe las tres fases bien conocidas de la aglutinación molecular: nucleación, polimerización irreversible y formación de microdominios estructurales. Este comportamiento se debe a la disminución de la movilidad de las moléculas de hemoglobina y agua como resultado del proceso de aglutinación molecular. No se encontraron evidencias del incremento de gradientes de campos eléctricos internos dentro de la solución de HbS como resultado del proceso de polimerización de la Hb S en condiciones de desoxigenación espontánea.

Bibliografía

1. Lores M, Cabal C.: *Appl. Magn. Reson.* **28**, 79-84 (2005).
2. Lores M, Cabal C., Nascimento O.R., Gennaro A.M.: *Appl. Magn. Reson.* **30**, 121-128 (2006).
3. Ferrone F.A., Ivanova M., Jasuja R.: *Biophys. J.* **82**, 399-406 (2002).
4. Eaton W. A., Hofrichter J.: *advan. Prot. Chem.* **40**, 63-279 (1990).
5. Sergeant G. R.: *Sickle Cell Disease*, first edn., London: Oxford University Press 1997.
6. Christoph G.W., Hofrichter J., Eaton W.A.: *Biophys. J.* **88**, 1371-1376 (2005).
7. Shacklai N., Sharma V. S., Ranney H. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 65-68 (1981).
8. Cowan B.: *Nuclear Magnetic Resonance and Relaxation*, first edn., Cambridge: Cambridge University Press 1997.
9. Bridges K.R. et al: *Blood* **88**, 4701-4710 (1996).

10. Bryant R. G., Shirley W. M.: *Biophys. J.* **32**, 3-16 (1980).
11. Eisenstadt M.: *Biophys. J.* **33**, 469-474 (1981).
12. Zhong J., Gore J. C., Armitage I. M.: *Magnet. Reson. Med.* **13**, 192-203 (1990).
13. Koenig S.H.: *Biophys. J.* **69**, 593-603 (1995).
14. Abragam A.: *The principles of nuclear magnetism*, first edn., Oxford: Clarendon Press 1961.
15. Halle B., Denisov V.P.: *Biophys. J.* **69**, 242-249 (1995).
16. Denisov V., Halle B.: *J. Mol. Biol.* **245**, 682-697 (1995).
17. Denisov V., Halle B.: *J. Mol. Biol.* **245**, 698-709 (1995).
18. Fernández A., Cabal C.A., Losada J., Álvarez E., Soler C., Otero J.: *Hemoglobin* **29**, 181-187 (2005).
19. Van-Quynh A., Willson S., Bryant R. G.: *Biophys. J.* **84**, 558-563 (2003).