

Título: Resonancia magnética más allá de las imágenes: aplicaciones a la anemia drepanocítica.

Autores: DrC. Físicas Manuel Arsenio Lores Guevara (cpscsc@medired.scu.sld.cu), DrC. Médicas Eloy Daniel Álvarez Guerra, Dr. en Ciencias Biológicas Adolfo Fernández García, Dr.C. Técnicas Juan Carlos García Naranjo.

Centro de procedencia: Universidad de Oriente, Centro de Biofísica Médica, Santiago de Cuba.

Palabras claves: Resonancia magnética, anemia drepanocítica, hemoglobina S.

**PREMIO EN LA INSTANCIA PROVINCIAL DEL CONCURSO, AÑO 2013.
CATEGORÍA INVESTIGACIÓN BÁSICA**

Introducción

El término Resonancia Magnética es uno de los más mencionados en el ámbito de las ciencias médicas contemporáneas. Hasta hace un poco más de tres décadas era desconocido en ese entorno y constituía una exótica herramienta instrumental para los especialistas de diversas ramas de la química. Si nos remontamos a la década de los años veinte del siglo pasado este término no existía en su acepción moderna y la comunidad científica internacional se adentraba en sus orígenes, fundamentalmente con investigaciones de un marcado carácter físico. Exceptuando a la especializada comunidad de expertos en Resonancia Magnética, la mayor parte del público neófito lo asocia con la aún joven tecnología de Resonancia Magnética de Imágenes. Sin embargo, los métodos, modalidades instrumentales y técnicas que utilizan el principio de resonancia magnética han crecido, invariablemente, desde su surgimiento; imponiendo la súper especialización dentro del mismo campo instrumental. Así suele encontrarse en el medio, personas que se autodenominan espectroscopistas, imagenólogos, por citar algunos.

Felix Bloch y Edward Purcell reportan simultáneamente la existencia del fenómeno de resonancia magnética nuclear en 1946. Los experimentos del grupo de Bloch, en la Universidad de Stanford, se realizaron en muestras de solución salina. El grupo de Purcell, en la Universidad de Harvard, realizó sus investigaciones en muestras de parafina. Coincidentemente, ambos artículos aparecieron en la revista *Physical Review* en 1946. Los métodos propuestos por los grupos de Bloch y Purcell abrieron una nueva época que revolucionaron la tecnología y sus aplicaciones hasta nuestros días. Norman Ramsey aportó el siguiente paso al describir, sobre bases empíricas, la teoría del corrimiento químico. El aparato teórico del método necesitaba otro instrumento. Este fue suministrado por Nicolaas Bloembergen en un artículo extraído de su disertación doctoral donde establece la relación entre la movilidad molecular y los tiempos de relajación T_1 y T_2 , parámetros fundamentales del método de resonancia magnética. La teoría BPP (Bloembergen – Purcell – Pound), como se le conoce en el mundo académico, establece dos aspectos fundamentales: en primer lugar, fundamenta la conexión entre las formas de movimientos moleculares y las velocidades de relajación de manera semiempírica, estableciendo las relaciones matemáticas básicas que permiten comprender las diferencias en los tiempos de relajación entre los diversos estados de la materia y los principios que determinan los valores de estos parámetros en cada sustancia a partir de su peso molecular. En segundo lugar, permite comprender, desde un punto de vista espectroscópico, que la resolución del experimento de resonancia precisa picos estrechos que se asocian a movimientos moleculares rápidos como los existentes en los líquidos o sistemas cercanos a este estado.

Con la entrada de la tecnología de resonancia magnética en el entorno clínico ocurrida en la década de los ochenta, la comunidad médica no pudo anticipar que en pocos años esta tecnología desplazara a los métodos imagenológicos tradicionales de todas las áreas de especialización médica. Puede afirmarse con certeza que las tecnologías basadas en rayos X o ultrasonido no han sufrido un

colapso total por los altos costos de inversión, mantenimiento y operación en los que se mantiene la tecnología avanzada de resonancia magnética. Sin embargo, no existe en nuestros días, área del diagnóstico y evolución terapéutica por imágenes donde la resonancia magnética nuclear no tenga aplicación, con resultados satisfactorios, equivalente a otros métodos y, en general, superior, por la diversidad de información que puede suministrar.

La enfermedad. La Anemia Drepanocítica (AD) es una enfermedad de origen genético que tiene su origen molecular en la presencia mayoritaria, en los eritrocitos de los individuos afectados, de una Hemoglobina (Hb) estructuralmente anormal conocida como hemoglobina S (HbS). Esta patología fue la primera enfermedad molecular descubierta (1910), ha sido extensamente estudiada, aunque aún no existe un tratamiento para la misma. Los trastornos que provoca en las propiedades físico químicas del glóbulo rojo, y las implicaciones posteriores en la fisiopatología del paciente, tienen su origen en el proceso de polimerización de la HbS que tiene lugar en condiciones fisiológicas y de hipoxia mantenida. Este proceso de agregación molecular ha sido estudiado empleando varios métodos de análisis físico químico que han aportado información estructural, sobre las propiedades físicas de la solución y sobre la cinética de la aglutinación de las moléculas de HbS. La Resonancia Magnética ha sido uno de los más empleados debido a sus posibilidades para identificar cambios estructurales y en la movilidad molecular.

La enfermedad está caracterizada por la persistencia de una anemia hemolítica subcompensada con presencia de íctero, daño crónico de órganos internos y la ocurrencia de episodios dolorosos recurrentes de intensidad variable. Diversos autores han demostrado la incapacidad del sistema hematopoyético de estos enfermos para compensar la destrucción masiva de los eritrocitos (eritropoyesis submáxima) cuya vida media está reducida en los pacientes a 12,5 días (la supervivencia de los glóbulos rojos de los individuos sanos es de 25-30 días).

Niveles insuficientes de eritropoyetina conducen a la baja respuesta en la división y diferenciación celular que manifiestan los precursores eritroides y se ha propuesto que tal hecho ocurre por la baja afinidad de la HbS por su sustrato. En efecto, la baja afinidad de la HbS por el oxígeno conduce a la liberación de mayor cantidad de este elemento en los tejidos periféricos que la esperada para el nivel de anemia presente y por tanto los sensores de la hipoxia ubicados en el tejido renal responden con una producción subóptima de eritropoyetina. A este hecho se adicionan un sinnúmero de alteraciones metabólicas que no son explicadas por la mutación puntual de la hemoglobina.

Relajación en solución de hemoglobinas. La HbA presenta una disminución ligera, por encima del error experimental, de ambos tiempos de relajación. Sin embargo, en la HbS, se presenta un comportamiento temporal sigmoidal con tres regiones. La (I) y (III) donde la efectividad de la relajación es prácticamente constante, y la (II) en la cual T_1 y T_2 disminuyen como promedio 1.29 ± 0.09 y 2.38 ± 0.48 respectivamente. Esta disminución comienza al cabo del tiempo de demora (td), parámetro identificado con el inicio irreversible del proceso de polimerización de la HbS. Esta diferencia en el comportamiento de la relajación de la HbA y la HbS es esencial para descartar la presencia de algunos mecanismos de interacción magnética y determinados procesos moleculares.

En disoluciones acuosas de Hb hay, al menos, se describen tres poblaciones de protones: protones de agua enlazada (B), protones de agua libre (F) y aquellos pertenecientes a la estructura macromolecular. Es conocido que los tiempos de relajación magnética (T_1 y T_2) de los protones de la estructura de la proteína son muy cortos, mucho más cortos que en los restantes estados (B y F), y que los tiempos muertos de la mayoría de los equipos utilizados para medir la relajación.

Por tanto, la contribución mayoritaria a la relajación magnética protónica en disoluciones acuosas de Hb es realizada usualmente por los protones de agua libre y enlazada.

Las curvas cinéticas del comportamiento temporal de T_2 , a partir de las cuales se calculó t_d permiten caracterizar el estado asintomático del paciente con AD. Durante la crisis se observa una disminución drástica de t_d (32 %) en el mismo paciente, lo cual significa que pueden establecerse claras diferencias entre ambos estados clínicos empleando el parámetro t_d . Es posible caracterizar la crisis del paciente con un rango de valores de t_d . Los comportamientos temporales de T_2 en un paciente que ha sido tratado con vainillina durante 40 días permiten evaluar como los valores del t_d se incrementan sostenidamente, llegando a alcanzar valores cercanos al doble del valor inicial. Este resultado confirma el mecanismo de acción de la vainillina, que se ubica como “ladrillo imperfecto” en la estructura del polímero en construcción desfavoreciendo termodinámicamente su formación. Este resultado demuestra la utilidad del método de rMP para la evaluación de la efectividad de un proceder terapéutico en la AD que centre su acción sobre el proceso de polimerización de la HbS. De igual forma ha sido útil (resultados no mostrados) para evaluar otros agentes antisickling, como la Hidroxiurea, que actual estimulando el incremento de la concentración de otras hemoglobinas como la hemoglobina fetal (HbF). Utilizando técnicas adicionales de Resonancia Paramagnética Electrónica se pueden obtener valiosa información física sobre estos procesos. Esta se puede emplear para la estimación de parámetros físicos como η y la viscosidad en muestras de Hb en ausencia de interacciones intramacromoleculares. La técnica fue utilizada, además, para demostrar la existencia de un efecto no deseado de liberación del marcador (lo que pudo ser comprobado, al final de la corrida de los experimentos, hemolizando las membranas reconstituidas y determinando la presencia de marcador libre en el buffer de lisis), tanto en eritrocitos reconstituidos como en las membranas fantasmas reselladas sin hemoglobina.

Usando la técnica de marcadores de espín en membranas fantasmas, se ha demostrado que la unión de moléculas de HbS a la membrana a pH fisiológico está incrementada cuando se compara con la Hb normal. Utilizando medidas de

Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia sobre eritrocitos SS oxigenados intactos, se ha mostrado que la concentración de HbS próxima a la membrana fue significativamente mayor que la concentración del volumen de Hb en el citoplasma, y que la relación entre estas dos concentraciones aumenta de 1.0 a 1.5 cuando la concentración de Hb celular aumenta de 34 a 45 g/dL. Por lo que creemos que el sistema de reconstitución de las membranas fantasmas abiertas constituye un sistema idóneo para el estudio de esta interacción, y de cómo se modifica la misma durante el proceso de polimerización de la HbS, si se tiene presente que dicho proceso ha sido caracterizado por nuestro grupo, usando condiciones de desoxigenación espontánea, tanto en soluciones de HbS, como en paquetes de eritrocitos, con el empleo de la Relajación Magnética Protónica.

El método de espectroscopia y su utilidad para la diferenciación metabólica. Las diversas técnicas presentes en un espectrómetro de resonancia magnética pueden suministrar información física sobre densidad nuclear, tiempos de relajación, coeficientes de difusión aparente; información química, como la composición y estructura molecular de los más disímiles metabolitos y macromoléculas, pH, velocidad de intercambio químico, concentración metabólica y de iones metálicos y, por último, información sobre la secuencia y estructura tridimensional de moléculas y macromoléculas.

Cuando se habla de perfil metabólico se hace referencia a la caracterización de los constituyentes químicos de un fluido biológico en un instante y condiciones determinadas. Desde el punto de vista físico puede definirse como un estado estacionario de la actividad del organismo. Las investigaciones realizadas en enfermos con AD e individuos control permiten determinar que existen diferencias significativas en el pool metabólico de estos diferentes estados, sin embargo, es difícil establecer cuantitativamente valores estandarizados por la naturaleza multivariada del problema. Este hecho no permite establecer marcadores metabólicos relevantes para el curso de la enfermedad y un problema asociado al análisis cuantitativo convencional es el consumo de tiempo que genera en el

procesamiento y análisis individuales de espectros y señales. La interpretación de los fenómenos biológicos requiere el análisis simultáneo de una gran cantidad de información proveniente del espectro de RMN y las muestras en estudio. Solo es posible entender y aprovechar la diversidad de información latente en los datos de RMN si se analizan estos datos con los métodos de análisis multivariado. La aplicación de estos métodos permite segregar clases para los grupos control y enfermo que parecen señalar escaso o poco daño sistémico en el grupo control, mientras el resto muestra rasgos metabólicos compatibles con el daño sistémico y el desbalance metabólico que afecta los enfermos. Todavía no se pueden adscribir estas diferencias a una determinante genética pero señala que el método es útil para encontrar patrones característicos sobre bases individuales. Se pueden establecer, sobre la base de este estudio, aquellos individuos descompensados y susceptibles a las complicaciones debido al daño sistémico.

La evaluación de información bioquímica utilizando este tipo de análisis permite un enfoque alternativo, con amplias perspectivas para el diagnóstico. Este tipo de información ofrece un parámetro cuantitativo que puede ser utilizado en un sentido exploratorio o evolutivo. La existencia de individuos que no tienen una variación significativa del parámetro puede correlacionarse con los estados clínicos.

La medicina contemporánea se enfrenta al reto de lograr reducciones importantes en sus costos y personalizar de manera efectiva el diagnóstico y tratamiento médicos. El concepto de personalización médica a menudo no es entendido. No se trata de una cosmetización de los procedimientos médicos. La personalización es proporcionar las medicaciones y procedimientos necesarios para que el diagnóstico y el tratamiento sean el óptimo para el paciente; aquellos que garanticen su máxima calidad de vida posible, preferentemente, al mínimo costo para el sistema de salud. Los métodos presentados aquí, en especial, la espectroscopia de resonancia magnética puede realizar una contribución importante a este objetivo.

El potencial diagnóstico de la Resonancia Magnética Unilateral. La anemia drepanocítica, como problemática de salud, exige el desarrollo de técnicas de diagnóstico y seguimiento con relaciones costo beneficio que permitan su extensión a los niveles primarios de salud. Los trabajos descritos hasta el momento, con fuerte base científica, serían sin duda alguna potenciados si pudieran ser acompañados de nuevos desarrollos tecnológicos que los respaldaran en este sentido.

La RMU ha sacado el experimento de RMN del laboratorio creando así nuevos retos y nuevas oportunidades. El diseño de nuevos imanes y la aparición de nuevas aplicaciones han sido elementos importantes de este proceso. Conjuntamente con el desarrollo tecnológico de la RMU, han ido apareciendo una gran cantidad de aplicaciones donde ésta ha probado ser una herramienta importante. La exploración petrolera es el área donde la RMU ha encontrado una de sus más importantes aplicaciones. Su empleo permite realizar el experimento de RMN sin alterar las condiciones de presión y temperatura a la que se encuentran las rocas a estudiar. Las características de las mismas pueden ser extraídas a partir de las distribuciones de $T_{2\text{eff}}$ obtenidas a partir de un tren de ecos.

La biomedicina ha sido otra área de aplicación de la RMU. Sin embargo, no se han reportados muchos trabajos. En general puede afirmarse que la RMU es una técnica novedosa en pleno desarrollo que, debido a su portabilidad y a sus posibilidades para explorar muestras de tamaño arbitrario, ha sacado el experimento de RMN del laboratorio creando así nuevos retos y nuevas oportunidades. El diseño de nuevos imanes, aún cuando ha estado basado más en la intuición que en cálculos que permitan la obtención resultados óptimos, y la aparición de nuevas aplicaciones han sido elementos importantes de este proceso.

Este desarrollo permite avizorar el surgimiento de nuevos métodos para el trabajo en campos inhomogéneos y de nuevas aplicaciones. El conocimiento acumulado en esta nueva rama de la RMN, hoy restringido a un pequeño grupo de laboratorios

en el mundo, debe extenderse en los próximos años sobre la base de sus resultados, su portabilidad y su bajo costo en comparación con la RMN clásica. El desarrollo de sistemas electrónicos optimizados para aplicaciones específicas debe formar parte de este proceso. Ello contribuirá sin duda alguna a la generación de nuevo conocimiento que acelere el afianzamiento de la RMU como técnica viable en muchas aplicaciones y sobre todo en el área biomédica. Precisamente dentro de esta área, la anemia drepanocítica aparece como una problemática de salud que pudiera beneficiarse de este desarrollo. Nuevos métodos para la realización de estudios in vitro, que permitan dar un mejor seguimiento al estado del paciente empleando equipos de bajo costo, deben aparecer en el futuro cercano. Igualmente, aunque más desafiante desde el punto de vista científico y tecnológico, el desarrollo de estudios in vivo empleando los beneficios de la RMU debe ser una realidad que ayude, en el futuro mediato, a continuar mejorando la calidad de vida de los pacientes con anemia drepanocítica.

Conclusiones.

Los trabajos desarrollados y en curso permiten apreciar el enorme potencial científico y diagnóstico que se esconde en los métodos de resonancia magnética. Es innegable que su contribución crece de manera evidente y que pueden tener un desempeño significativo en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles como la presentada en estos estudios.

Referencias bibliográficas

[1] Wüthrich K. NMR of proteins and nucleic acids. John Wiley & sons, New York, first edition, 1986.

[2] Cady EB. Clinical Magnetic Resonance Spectroscopy, Plenum Press, NY, 1990.

[3] Cohen JS, Jaroszewski JW, Kaplan O, Ruiz-Cabello, J and Collier SW. A history

of biological applications of NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Spectroscopy*. 1995; 28:53-85.

[4] Günther H. *NMR Spectroscopy: Basic principles, concepts and applications in chemistry*. John Wiley & Sons, Chichester, Second edition, 1994.

[5] Derome AE. *Modern NMR techniques for chemistry research*. Pergamon, Oxford, First edition, 1987.

[6] Brown FF, Campbell ID, Kuchel PW and Rabenstein DL. Human erythrocyte metabolism studies by ^1H spin echo NMR, *FEBS Lett*. 1977; 82:12-16.

[7] Fabry ME. Proton NMR in Cells and Tissues, in *NMR Spectroscopy of Cells and Organisms*, eds. Gupta RK., Vol I, Chapter 4, pp 69-97, CRC Press, Boca Raton, 1990.

[8] Nicholson JK, Foxall PJD, Spraul M, Farrant RD and Lindon JC. 750MHz ^1H and ^1H - ^{13}C NMR Spectroscopy of human blood plasma. *Analytical Chemistry*. 1995; 67:793-811.

[9] Bell JD, Brown JCC, Sadler PJ. NMR studies of body fluids. *NMR in biomedicine*. 1989; 2:246-256

[10] Holzgrave U, Diehl BWK and Wawer I. Review: NMR Spectroscopy in Pharmacy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1998; 17:557-616.

[11] Barton SJ, Howe FA, Tomlins AM, Cudlip SA, Nicholson JK, Bell BA, Griffiths JR. Comparison of in vivo ^1H MRS of human brain tumours with ^1H HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples in vitro. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*; 1999, 8: 121–128.

[12] Griffin JL, Bollard M, Nicholson JK and Bhakoo K. Spectral profiles of cultured neuronal and glial cells derived from HRMAS ¹H NMR Spectroscopy. *NMR in Biomedicine*. 2002; 15:375-384.

[13] Coen M, Lenz EM, Nicholson JK, Wilson ID, Pognan F and Lindon JC. An integrated metabonomic investigation of Acetaminophen toxicity in the mouse using NMR Spectroscopy. *Chem Res Toxicol*. 2003; 16:295-303.

[14] Lim AK, Hamilton G, Patel N, Bell JD, Taylor-Robinson SD. ¹H MR spectroscopy in the evaluation of the severity of chronic liver disease. *Radiology* 2003; 226: 288-299.

[15] Reglinski J, Smith WE and Sturrock RD. Spin-echo ¹H NMR detected response of Ergothioneine to oxidative stress in the intact human erythrocyte. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1988; 6:217-223.

[16] Kuchel PW, Bubb WA, Ramadan S, Chapman BE, Philp DJ, Coen M, Gready JE, Harvey PJ, McLean AJ, Hook J. ³¹P MAS-NMR of human erythrocytes: independence of cell volume from angular velocity. *Magn Reson Med*. 2004;52(3):663-8.

[17] Daykin CA, Foxall PJD, Connor SC, Lindon JC and Nicholson JK. The comparison of plasma deproteinization methods for the detection of low-molecular-weight metabolites by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 2002, 304:220-230.

[18] Griffin JL, Walker LA, Shore RF, Nicholson JK. Metabolic profiling of chronic cadmium exposure in the rat. *Chem. Res. Toxicol*. 2001; 14:1428-1434.

[19] Le Belle JE, Harris NG, Williams SR and Bhakoo KK. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ¹H-NMR spectroscopy. *NMR in*

Biomedicine. 2002; 15:37-44.

[20] Lehninger, AL. Principles of Biochemistry. Worth Publisher, Inc, Second edition, New York, 1982.