

## Transporte de agua en glóbulos rojos de pacientes con anemia drepanocítica en condiciones de desoxigenación espontánea

Lores-Guevara MA<sup>1</sup>, García-Naranjo JC<sup>1</sup>, Mengana-Torres Y<sup>1</sup>, Suárez-Beyrío LC<sup>2</sup>, Marichal-Felue MA<sup>2</sup>, Simón-Brada T<sup>2</sup>, Rodríguez-Reyes IC<sup>2</sup>, Philippé J<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba; <sup>2</sup>Hospital General “Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso”, Santiago de Cuba, Cuba; <sup>3</sup>Department of Clinical Chemistry, Immunology and Microbiology, Ghent University, Ghent, Belgium.

Email: [manuel.lores@cbiomed.cu](mailto:manuel.lores@cbiomed.cu)

### RESUMEN

Se estudia el transporte de agua hacia el exterior de glóbulos rojos de pacientes con Anemia Drepanocítica en condiciones de desoxigenación espontánea. Con este objetivo se empleó un método de Resonancia Magnética para evaluar el tiempo de intercambio de agua y la permeabilidad a través de la membrana celular midiendo el tiempo de relajación transversal ( $T_2$ ) en muestras dopadas y no dopadas de glóbulos rojos (RBC). La secuencia de pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill fue utilizada para medir  $T_2$  en una consola de Resonancia magnética (MARAN DRX) acoplada con un sistema magnético homogéneo (0.095 T). Fue observado un incremento en el transporte de agua en los glóbulos rojos de pacientes con Anemia Drepanocítica, caracterizado con valores del tiempo de intercambio de agua de  $15,2 \pm 0,8$  ms. La activación anormal de los canales transmembrana  $P_{sickle}$ , de Gardos y el cotransportador de potasio y cloro como resultado de la desoxigenación, así como la posible aparición de nuevos poros debido al incremento de la interacción hemoglobina-membrana, son sugeridos como las causas fundamentales de este fenotipo de transporte anormal. Se sugiere considerar el cambio en la relación superficie volumen en el cálculo de la permeabilidad en condiciones de desoxigenación.

**Palabras clave:** drepanocitosis, transporte de agua, resonancia magnética, transmembrana, desoxigenación.

## INTRODUCCIÓN

Después de un siglo, la enfermedad de células falciformes (ECF) sigue siendo un importante problema de salud en todo el mundo sin una solución definitiva. Su complejidad, origen genético y los diferentes procesos moleculares implicados en su fisiopatología han contribuido a esta situación. La presencia de una hemoglobina anormal (HbS) dentro de los glóbulos rojos(RBC), causando un proceso de polimerización bajo desoxigenación, se reconoce como el proceso molecular que más contribuye a la patogénesis de ECF, y por esta razón se han hecho muchos esfuerzos en relación con su estudio. Sin embargo, la desoxigenación también causa el daño celular, la deshidratación y la reducción.

Diferentes alteraciones de la membrana se han documentado en RBC de pacientes con anemia drepanocítica como la pérdida de la asimetría bicapa lipídica, que altera la tasa de fosfatidilcolina flip-flop, esqueleto-espectrina actina anormal, así como, asociación defectuosa entre ankirina y espectrina dentro de las células hacia afuera.<sup>1</sup> Esto puede causar anomalías funcionales como un fenotipo de transporte anormal: el aumento de afluencia de calcio, permeabilidad reducida de flujo de salida a los no electrolitos como glicerol y glicol de etileno y pérdida neta de cationes monovalentes. Especialmente, la pérdida neta de cationes monovalentes ha estado directamente relacionado con la deshidratación celular, debido a la respuesta celular para mantener el equilibrio osmótico.

El transporte de agua a través de la membrana de los glóbulos rojos de pacientes con anemia drepanocítica se ha estudiado en los eritrocitos oxigenados <sup>2</sup> y en células bajo desoxigenación total <sup>3</sup>; sin embargo, no se han realizado estudios en desoxigenación espontánea. Por otro lado, no se han reportado valores del tiempo de intercambio de agua después de desoxigenación y no hay valores propios de la permeabilidad.

El patrón de desoxigenación (% de desoxigenación y velocidad) define la polimerización HbS, así como, el cambio de forma de RBC<sup>2, 4</sup>. En este trabajo, informamos de los valores de tiempo de intercambio de agua después de la polimerización HbS en condiciones de desoxigenación espontánea. También se discute la necesidad de una evaluación adecuado del volumen de agua a la superficie en relación de células falciformes, para calcular la permeabilidad al flujo de salida de agua. Los resultados sugieren fuertemente la interacción en la hemoglobina de la membrana

como uno de los mecanismos moleculares que contribuyen al fenotipo de transporte anormal de agua observado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Después de la aprobación del comité de ética del hospital, y la obtención del consentimiento informado, se obtuvieron muestras de RBCA (que contiene la hemoglobina adulta normal, HbA) y RBCS (que contienen HbS).<sup>5</sup> Después de eliminar el plasma y los leucocitos, los RBC se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (PBS, pH 7,4, Sigma Chemicals Co), se eliminaron los sobrenadantes por centrifugación (500 g, 10 min) y decantación. El lavado de RBC obtenido se resuspendieron (hematocrito 45 %, PBS (pH: 7,4)) y una porción se centrifugó (1000 g, 30 min, 25°C) eliminar el sobrenadante para obtener concentrado de hematíes, 500 µL de embalado RBC se tomaron y se midió la espín-espín tiempo de relajación de protones para esta muestra ( $T_{2a}$ ), 300µL se resuspendieron se mezclaron con 600 µL de la solución de cloruro de manganeso ( $MnCl_2(ac)$ ) para obtener una concentración final de 2,5 mM. Se tomaron 500 µL de dopado RBC y se midió el tiempo de relajación espín-espín de protones para esta muestra ( $T_2$ ).

A partir de los valores medidos de  $T_{2a}$  y  $T_2$ , el tiempo de intercambio de agua ( $\tau_e$ ) y la permeabilidad de la membrana de RBC (P) se calcula como sigue:

$$\frac{1}{\tau_e} = \frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2a}} \quad (1) \quad P = \frac{V}{S} \frac{1}{\tau_e} (2)$$

Donde V ( $0,63 * 10^{-10} \text{ cm}^3$ ) y S ( $1,42 * 10^{-6} \text{ cm}^2$ ) son el volumen de agua dentro de la RBC y la superficie de la RBC, respectivamente.  $V / A = 4, 4 * 10^{-5} \text{ cm}$ .

Las mediciones de resonancia magnética se realizaron en una consola de resonancia magnética (MARAN DRX, Oxford Instruments, Reino Unido). El espín-espín tiempo de relajación de protones se midió utilizando Carr-Purcell-Meiboon-Gill (CPMG) secuencia de pulsos con una frecuencia de resonancia de 4,0353 MHz (imán permanente homogéneo,  $B_0=0,095T$ ), 10 y 20 µs para pulsos de 90° y 180°, respectivamente, 128 exploraciones, 40 % y 50 % para las ganancias de los amplificadores y receptores de energía RF respectivamente, 3 s de retraso de relajación y tiempo de eco de 0,2 ms (dopado RBC) y 2 ms (paquete de RBC).

Se realizó una prueba del estudiante (t-test) para comparar los valores principales con  $\alpha = 0,05$ .

## RESULTADOS

El incremento del tiempo de intercambio y la reducción de la permeabilidad de los eritrocitos de pacientes con AD, comparados con los valores obtenidos en individuos aparentemente normales, coinciden con reportes previos de otros autores ( $p=1,61 \pm 0,39$ )  $\times 10^{-3}$  cm/s y  $\tau_e= 29,2 \pm 7,3$  ms) y se encuentran estrechamente relacionados con:

- La peroxidación de los lípidos en la bicapa lipídica.
- La interacción de la hemoglobina con la proteína banda 3.
- La oxidación del grupo sulfhidrilo (SH) localizado en el fragmento de 15 kDa de la proteína banda 3.

La peroxidación de los lípidos en la bicapa lipídica es usualmente despreciada ya que la difusión simple aporta solo el 10 % del transporte de agua a través de la membrana del eritrocito. La interacción hemoglobina membrana se establece precisamente con la proteína banda 3, donde se encuentra el canal más importante para el transporte de agua en los eritrocitos (4,5 Å) y puede conducir a una oclusión de este canal. Previamente fue demostrado que esta interacción es más fuerte en eritrocitos de pacientes con AD si se compara con individuos aparentemente normales y por ende los niveles de oclusión serán mayores reduciendo la permeabilidad. La oxidación del grupo sulfhidrilo (SH) localizado en el fragmento de 15 kDa de la proteína banda 3 se produce gracias a la generación espontánea de radicales oxígenos.

El proceso de desoxigenación espontánea trae como consecuencia una disminución del tiempo de intercambio a través de su membrana ( $\tau_e=15,24 \pm 0,8$  ms), comparados con los valores obtenidos previo a la desoxigenación ( $\tau_e=20,89 \pm 1,41$  ms).

A pesar de que es posible encontrar informes del transporte de agua para RBC desoxigenados de pacientes de células falciformes ( $P= (1, 58 \pm 0, 06) 10^{-2}$ cm/s), que no afecta a la novedad de estos resultados porque en estos experimentos:

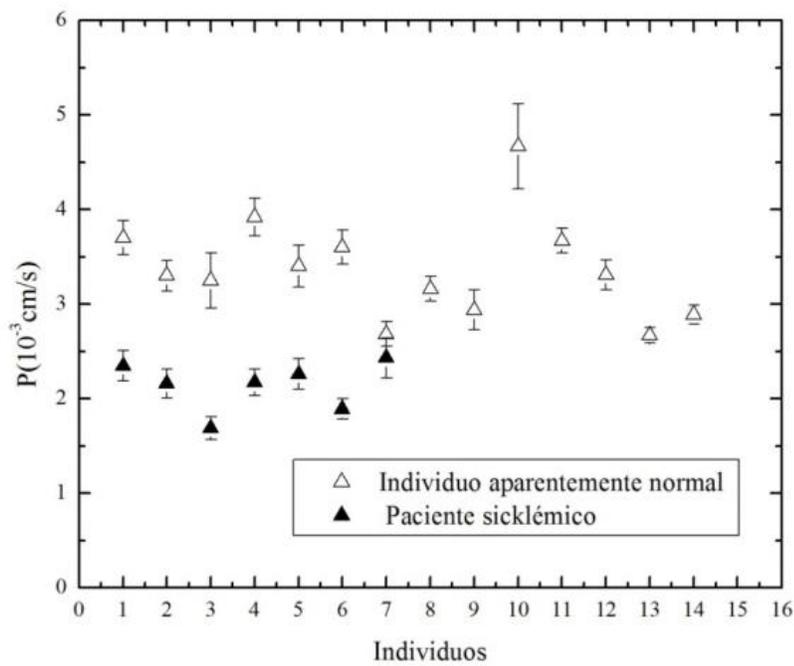
- Los valores experimentales reportados de permeabilidad al agua de flujo de salida eran 10 veces superiores a los valores establecidos para la RBC humano.
- Desoxigenación completa inducida fue empleado para provocar la polimerización de HbS (0, 5 mM, con ditionito de sodio).
- No se reportan los valores  $\tau_e$ .

La explicación de la disminución de  $\tau_e$ , como consecuencia de la desoxigenación espontánea, está relacionado con la interacción en la hemoglobina de la membrana y la activación de los canales de Psickle, Gardos, y KCC. La interacción de hemoglobina-membrana podría causar la aparición de poros a partir de la estructura de orden alto de la proteína banda-3. Anteriormente se demostró el aumento de la interacción de la hemoglobina de la membrana con la polimerización de HbS en condiciones de desoxigenación espontánea. Ahora, estamos sugiriendo fuertemente este aumento podría provocar la apertura de nuevos poros para el flujo de salida de agua, lo que podría explicar la disminución de  $\tau_e$  después del proceso de aglutinación.

En los glóbulos rojos, la disminución de la presión parcial de oxígeno ( $PO_2$ ) provoca la activación de Psickle, que causa un flujo de salida de  $K^+$ , así como,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  salida. Cuando la concentración de  $Ca^{2+}$  alcanza un umbral, los canales Gardos (alrededor de 150 por células) se activan causando una rápida salida de  $K^+$  y  $Cl^-$ . Como la diferencia con RBCA, en el RBCS es la desoxigenación, esta inhibe la permeabilidad hasta  $PO_2 = 40$  mmHg, provocando que P aumenta de nuevo cuando  $PO_2 < 40$  mmHg. Después de 24 h de desoxigenación espontánea ( $PO_2 < 40$  mmHg, el 50 % de desoxigenación), KCC se reactiva en nuestros experimentos que contribuye a la pérdida neta de iones. El flujo de salida de iones está acoplado con un flujo de salida de agua para mantener el equilibrio osmótico. La deshidratación celular aumenta la concentración de HbS, que facilita la polimerización de HbS, el aumento de la interacción en la hemoglobina de la membrana, y la disminución de RBC.

Por otro lado, es importante considerar que estamos determinando P (ecuación 2) para RBCA y RBCS utilizando la misma relación  $V / A$ , como es habitual en la literatura. Consideramos que este es un procedimiento adecuado en RBCS oxigenados teniendo en cuenta que: el volumen corpuscular medio (VCM) y superficie (S) no tienen una variación estadísticamente significativa en estas células. Para RBCS desoxigenados se reportó una disminución de MCV y S permanece constante, lo que podría cambiar la relación  $V / S$  y afectar los valores de p. Por esta razón, en este trabajo que estamos reportando sólo los valores  $\tau_e$  después de desoxigenación. Para evaluar P es necesario evaluar  $V / S$  comportamiento en RBCS después de la desoxigenación. Se podría hacer la realización de un experimento de resonancia magnética que incluye un gradiente de campo magnético, el estudio del agua autodifusión comportamiento coeficiente de corto tiempo de retardo entre impulsos en CPMG o estimuladas secuencias de pulsos de eco. Otra forma de

medir P está empezando a partir del coeficiente de auto-difusión efectiva del agua medido en el RBC, así como, en el medio extracelular e intracelular.



**Figura.** Permeabilidad a la salida de agua en eritrocitos completamente oxigenados de individuos aparentemente normales y pacientes sickléMICOS.

### CONCLUSIONES

El proceso de polimerización de HbS, bajo condiciones de desoxigenación espontánea, conduce a un aumento en el transporte de agua de RBC a partir de pacientes con anemia drepanocítica, caracterizado por valores de tiempo de cambio de  $15,2 \pm 0,8$  ms. La activación anormal de los canales P sickle, Gardos y KCC a partir de desoxigenación, así como, la posible aparición de nuevos poros debido a una mayor interacción de hemoglobina membrana podría explicar este fenotipo de transporte anormal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hebbel RP. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood*. 1991 Jan;77(2):214-37.
2. Herbst MD, Goldstein JH. A review of water diffusion measurement by NMR in human red blood cells. *Am J Physiol*. 1989 May;256(5 Pt 1):C1097-104.
3. Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel. *Eur Biophys J*. 2013 Jan;42(1):33-46. doi: 10.1007/s00249-012-0868-7.
4. Fung LW, Litvin SD, Reid TM. Spin-label detection of sickle hemoglobin--membrane interaction at physiological pH. *Biochemistry*. 1983 Feb 15;22(4):864-9.
5. Falcón-Diéguez JE, Rodi P, Lores M, Gennaro AM. Spin Label Studies of the Hemoglobin--Membrane Interaction During Sickle Hemoglobin Polymerization. *Appl. Magn. Reson*. 2010;38:443-53.

