

Efecto de la polimerización de la HbS sobre la autodifusión del agua en muestras de hemoglobina

Lores-Guevara MA¹, García-Naranjo J. C¹, Mengana-Torres Y¹, Suárez-Beyrío LC², Marichal-Felue MA², Simón-Brada T², Rodríguez-Reyes IC², Philippé J³.

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

Email: manuel.lores@cbiomed.cu

RESUMEN

La drepanocitosis es una anemia hemolítica hereditaria de alta prevalencia y aunque se han estudiado una serie de compuestos químicos con efectos inhibitorios sobre la formación de polímeros de hemoglobina S (HbS) y la transformación drepanocítica, aún no cuenta con un tratamiento efectivo. El tiempo de relajación transversal, el tiempo de relajación transversal efectivo y el coeficiente de autodifusión del agua son evaluados durante la polimerización de la hemoglobina S. Las determinaciones experimentales fueron realizadas antes y después de colocar las muestras a 36°C durante 24 horas para garantizar la polimerización. Se empleó un sistema de resonancia magnética (MARAN, DRX, UK) que fue acoplado a un sistema magnético homogéneo y otro inhomogéneo (portátil y unilateral) y se utilizó la serie de impulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill. El tiempo de relajación transversal mostró dos exponentes después de la polimerización soportando el concepto de una solución de hemoglobina parcialmente polimerizada. El tiempo de relajación efectivo disminuyó un 40 %, lo cual pudo ser explicado por el incremento del coeficiente de autodifusión del agua 1.8 veces como valor promedio. Estos resultados fueron explicados considerando la disminución de los efectos de obstrucción e hidratación en una solución de hemoglobina parcialmente polimerizada.

Palabras clave: drepanocitosis, hemoglobina S, resonancia magnética, autodifusión del agua, transmembrana, desoxigenación.

INTRODUCCIÓN

La polimerización de la hemoglobina S (Hb S) es el proceso molecular básico en la enfermedad de células falciformes (AD). Una comprensión adecuada de los procesos moleculares asociados a esta enfermedad es necesaria con el fin de diseñar diferentes enfoques para las opciones de diagnóstico y tratamiento. Resonancia magnética se ha empleado con éxito en la caracterización física de la solución de Hb durante la polimerización dando lugar a métodos útiles para evaluar el estado clínico del paciente y algunos fármacos potenciales para el tratamiento.

Para estudiar el comportamiento del agua en la solución de hemoglobina S es un problema relevante en la AD. El agua dentro de las soluciones de hemoglobina (Hb) influye fuertemente en la polimerización de HbS (a través de efecto de concentración) y se refiere a la interacción electrostática que estabiliza las interacciones Hb-Hb durante la aglutinación.

En particular, el coeficiente de autodifusión de agua (D) es una medida importante de la dinámica del agua dentro de la solución de Hb y se ve afectada por los efectos de hidratación y obstrucción según:¹

$$D = D_0 \left(\frac{(1 - \zeta\Phi)(1 - f)}{1 - \Phi} \right) \quad (1)$$

Donde D_0 es el coeficiente de autodifusión del agua libre, Φ es la fracción de volumen ocupada por la hemoglobina hidratada, y f la fracción de agua enlazada a la Hb. El factor ζ depende de la geometría de la proteína. El factor $(1 - \zeta\Phi)$ está relacionado con el efecto de obstrucción y f con el efecto de hidratación.

A medida que el proceso de polimerización de la HbS podría afectar coeficiente de auto-difusión de agua dentro de la solución de Hb, el objetivo principal de este trabajo es comparar los valores D antes y después del proceso de aglutinación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de hemoglobina A (HbA) y HbS se obtuvieron a partir de sangre venosa fresca donada por voluntarios e inmediatamente heparinizados. Después de eliminar el plasma y los leucocitos, las células rojas de la sangre se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (pH 7,4) (Sigma Chemicals Co.) y se hemolizaron mediante congelación. El plasma y el buffer utilizado

en cada lavado se separaron por centrifugación (2000 rpm, 10 min) y decantación. Después de la centrifugación (2000 rpm, 10 min) se eliminó el estroma y 500µL de hemoglobina fueron depositados en un tubo de resonancia magnética nuclear para el experimento.

Las mediciones de resonancia magnética se realizaron en la consola de resonancia magnética (MARAN DRX, Oxford Instruments, UK). El tiempo de relajación transversal magnética de protones (T_2) se midió utilizando la serie de impulsos Carr-Meiboom-Purcell-Gill (CPMG), con una frecuencia de resonancia de 4.0353 MHz (imán homogéneo permanente, $B_0 = 0.095$ T), 10 y 20 ms para 90° y 180° pulsos respectivamente, 32 pulsos, 40 % y 50 % para el amplificador de potencia de RF y ganancias receptor respectivamente, 3 s de retardo y el equipo de la relajación eco de 8 ms. Para la medición de D, el T_2 efectivo ($T_{2\text{eff}}$) se midió empleando un imán con gradiente constante ($B_0 = 0,079$ T, $G = 2,1$ T / m). El equipo de eco se varió desde 600 hasta 1 600 ms con pasos de 100 ms. Cada medición de $T_{2\text{eff}}$ se realizó mediante secuencia de pulsos CPMG con una frecuencia de resonancia de 3.405549 MHz. Con el fin de mantener el mismo ancho de banda de excitación, la longitud del pulso RF se mantuvo a 5 ms y la amplificación de potencia de RF se fijó en 25 % y 50 % para 90° y 180° pulsos, respectivamente. El número de *scan* fue 512 y 3s el retraso de relajación. Después de las mediciones, el ajuste de $1 / T_{2\text{eff}}$ frente T_{AU2} se obtuvo, donde Tau es el tiempo entre 90° y 180° pulsos de RF. Se empleó la pendiente de la línea recta resultante del ajuste de los datos para calcular D, siguiendo la expresión:

$$D = \frac{3}{G^2 \gamma^2} \text{pendiente} \quad (2)$$

Donde γ es la razón giromagnética propia de cada protón, y G el gradiente del imán unilateral.

Las muestras se colocaron a 36°C para facilitar el proceso de polimerización completa durante 24 h. Las mediciones de T_2 , $T_{2\text{eff}}$, y D se llevaron a cabo, antes y después de la polimerización.

El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó con ayuda de los Softwares Microsoft Origin 8.0 y el Matlab 12.0.

RESULTADOS

La figura representa la medición típica D antes y después de la polimerización usando $1 / T_{2\text{eff}}$ comportamiento frente T_{AU2} . Es posible observar un aumento de la pendiente después de la polimerización, como resultado de un mayor valor D .

Los valores de T_2 obtenidos concuerdan con los reportes previos del comportamiento del tiempo de relajación spin-spin en soluciones de hemoglobina y durante el proceso de polimerización de la HbS^2 y se nota que este proceso se encuentra presente en las muestras estudiadas. Como hemos demostrado antes, la decreciente observada en T_2 es el resultado de la creciente en la microviscosidad alrededor de la molécula de Hb, afectando su movimiento de rotación y el movimiento de rotación del agua fuertemente unido a la proteína.³

Un análisis más detallado de la relajación T_2 se realizó y se encontraron diferencias significativas, los valores de la amplitud y del tiempo de relajación spin-spin antes y después de la polimerización. Antes de la polimerización fue encontrado un exponente con amplitud A_0 y tiempo de relajación T_2 . Después de la polimerización fueron encontrados dos exponentes: uno rápido ($A_{0\text{Rap}}$, $T_{2\text{corto}}$) y uno lento ($A_{0\text{Lent}}$, $T_{2\text{largo}}$). Los resultados muestran la división del agua dentro de la solución de Hb en dos poblaciones después de polimerización. Una población con la relajación más rápido transversal (T_2 corto), que incluye el agua unida a la hemoglobina polimerizada, y otra población con más lenta de relajación transversal (T_2 largo) incluyendo el agua unida a la Hb en la solución. Este resultado caracteriza a la solución de hemoglobina estudiado en: parcialmente polimerizada, lo que concuerda con nuestra caracterización física anterior de la polimerización de HbS .³

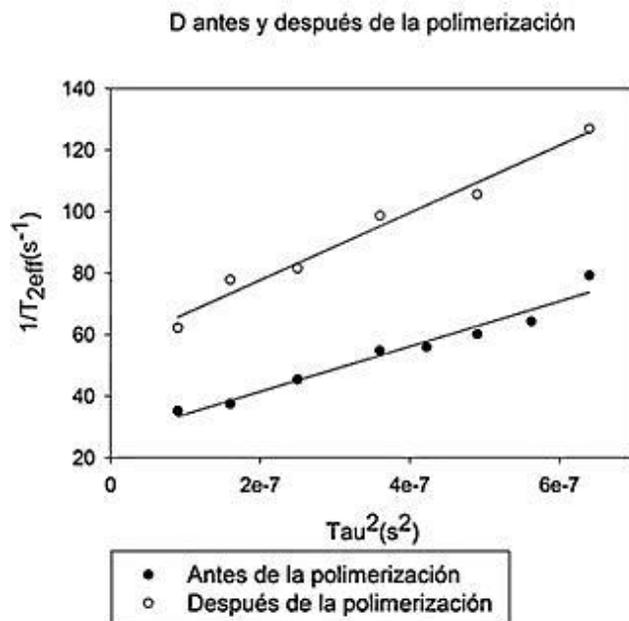


Figura. Medición D antes y después de la polimerización. D aumenta de $0,62 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ a $1,4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ con el proceso de aglutinación.

El mismo experimento realizado en HbA mostró un comportamiento constante de D antes ($D = (0.98 \pm 0.1)10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) y después ($D = (0.98 \pm 0.2)10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$)

Los valores de D obtenidos son coherentes con los resultados previos reportados para disoluciones de hemoglobina. Considerando que la disolución de HbS se convierte parcialmente en polimerizada, el incremento de D pudiera ser explicado de acuerdo a la ecuación 1 sobre la base de los siguientes procesos:

Las interacciones Hb-Hb durante el proceso de polimerización de la HbS tienen el mismo origen que aquellas que garantizan el enlace del agua a la superficie de la proteína (interacciones electrostáticas como: enlaces por puente de hidrógeno e interacciones de Van der Waals).¹ Entonces, con el objetivo de garantizar las interacciones electrostáticas que soportan la estabilidad de los polímeros, la polimerización de la HbS pudiera disminuir el número de sitios

disponibles para el enlace de agua en la superficie de la Hb. Lo anterior provocaría una disminución de f y un incremento de D .

La polimerización de la HbS provoca la aparición de largas fibras dentro de la disolución de Hb, las cuales pudieran incrementar el efecto de obstrucción en la región de la muestra parcialmente polimerizada donde el agua se encuentra cerca de las fibras (región polimerizada). Sin embargo, como el crecimiento de los polímeros resulta de un número inicial y constante de moléculas de HbS, en la región donde el agua se encuentra lejos de las fibras (región libre), el efecto de obstrucción pudiera disminuir. A partir de nuestros datos, en nuestra disolución de HbS parcialmente polimerizada la región libre es dominante; lo cual causa la disminución, como promedio, del efecto de obstrucción provocando un aumento de D .

CONCLUSIONES

El concepto de la hemoglobina parcialmente polimerizada, bajo condiciones de desoxigenación espontáneos, se admite a través de la presencia de dos exponentes que caracterizan la relajación magnético transversal de muestras de HbS. Un nuevo enfoque para estudiar el proceso de polimerización HbS se ha presentado, a partir del estudio de $T_{2\text{eff}}$ y D en un campo magnético portátil y no homogénea con un gradiente de campo magnético estático fuerte y constante. Los valores $T_{2\text{eff}}$ disminuyen alrededor de un 40 %, lo que se explica por el aumento de D 1,8 veces las del valor principal. El aumento de D se puede explicar a través de la disminución de los efectos de hidratación y de obstrucción, como resultado del proceso de aglutinación en una solución de hemoglobina parcialmente polimerizado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baranowska HM, Olszewski KJ. The Hydration of Proteins in Solutions by Self-Diffusion Coefficients NMR Studies. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Apr; 1289(3):312-4.
2. García Naranjo JC, Mastikhin IV, Colpitts BG, Balcom BJ. A Unilateral Magnet with an extended field gradient. *J Magn Reson*. 2010 Dec;207(2):337-44. doi: 10.1016/j.jmr.2010.09.018.
3. Cabal C, Libório AM, Ruiz AI. A Model of the molecular aggregate processes of hemoglobin S. Absence of Crystallization. *Mecánica Computacional*. 2007; XXVI 3361-9.
4. Lores M. Magnetic Resonance Study of the Magnetic Interaction Process and Molecular Mobility during HbS Polymerization. Ph.D. Dissertation, University of Oriente, Santiago de Cuba; 2005.
5. Kimmich R. *NMR Tomography, Diffusometry, Relaxometry*. Berlin: Springer;1997.