

Influencia del campo eléctrico pulsante en la despolimerización de las moléculas de hemoglobina S desoxigenadas. Parte I

Luis Bergues Cabrales,¹ Alcibiades Lara Lafargue, Jorge García Rodríguez, Rodolfo N. Pérez Bruzón, Héctor Camué Ciria, Richard Hinojosa Aldana, Liban Montes de Oca González, Alfredo Fong Reyes y Ariel González Suárez

*División de Bioingeniería y Equipos, Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado
Universidad de Oriente*

G/P 4078, Santiago de Cuba 90 400, Cuba

¹*e-mail: bergues@cnea.uo.edu.cu*

Jorge Losada Gómez

*Departamento de Hematología, Hospital Provincial "Saturnino Lora"
Carretera Central s/n, Santiago de Cuba 90 500, Cuba*

Recibido el 2 de febrero de 1999; aceptado el 3 de marzo de 2000

Se realiza un estudio "in vitro" para analizar los cambios de forma y volumen que sufren los eritrocitos falciformes al ser sometidos a la acción de diferentes umbrales de intensidad del campo eléctrico pulsante. Estos umbrales se determinaron, para frecuencias menores o mayores a la frecuencia umbral de 300 KHz, a partir de la ecuación de Schwan o de forma experimental, respectivamente. Mediante la medición del tiempo de relajación transversal efectivo del protón de agua, se verifica si dichos cambios se deben a interacciones directas y/o indirectas del campo eléctrico pulsante con los polímeros de desoxihemoglobina S existente en la solución. Se concluye que el cambio de forma y volumen de los eritrocitos falciformes ocurre para los diferentes umbrales de intensidad del campo eléctrico pulsante. Esto puede ser explicado por interacciones directas con los polímeros de desoxihemoglobina S, para frecuencias mayores a la frecuencia umbral e indirectas con los mismos y/o fuerzas electromecánicas que se inducen en la membrana de estos eritrocitos falciformes, para frecuencias menores a la umbral.

Descriptores: Tiempo de relajación transversal efectivo del protón de agua; polímeros de desoxihemoglobina S; eritrocitos falciformes

An "in vitro" study is made to analyze the changes in form and volume undergone by sickle erythrocytes when subjected to the action of different intensity thresholds of a pulsed electric field. These thresholds were determined, for frequencies lower or higher than the threshold frequency of 300 KHz, from Schwan equation or on an experimental basis, respectively. By means of the measurement of the effective transverse water proton relaxation time, it is verified if the changes are due to direct or indirect interactions of the pulsed electric field with the deoxyhemoglobin S polymers existing in the solution. It is concluded that the change in form and volume of sickle erythrocytes occurs for the different thresholds of intensity of the pulsed electric field. It has an explanation in the direct interaction with the deoxyhemoglobin, for frequencies higher than the threshold frequency and indirectly with them and/or electromechanical forces that are induced in the membranes of these sickle erythrocytes, for lower frequencies than those of threshold.

Keywords: Effective transverse water proton relaxation time; deoxyhemoglobin S polymers; sickle erythrocytes

PACS: 87.15.Da; 31.70.hq

1. Introducción

La sicklemia o anemia por hemáties falciformes es una enfermedad genética caracterizada por la deformación de los eritrocitos desoxigenados, los cuales en su mayoría adoptan forma de hoz. Dicha falciformación se debe a la polimerización intracelular de las moléculas de desoxihemoglobina S (deoxyHb S). Esta patología incluye un amplio espectro de severidad, siendo identificados factores genéticos, celulares y fisiológicos que pueden modificar el desarrollo de la misma. Los pacientes que padecen esta patología, presentan crisis vasooclusivas y hematológicas con frecuencia variable.

El entendimiento de la naturaleza biofísica de la enfermedad y de los factores que afectan su severidad, ha repercutido en el incremento de las estrategias terapéuticas. Una de éstas consiste en evitar la falciformación, inhibiendo la polimerización de las moléculas de deoxyHb S, mediante el empleo

de métodos químicos o físicos. El uso de agentes químicos en la práctica clínica, a pesar de sus efectos *antisickling* "in vitro", se ha visto limitado porque las dosis que se necesitan normalmente manifiestan marcada toxicidad. También se han realizado ensayos con factores fisiológicos proteicos del torrente circulatorio, por lo que resulta poco probable que éstos presenten efectos no deseables, sin embargo, su obtención, unida al tiempo y a las dosis que se emplean, conduce a que se eleve el costo del tratamiento, dificultando su aplicación. Actualmente, por estas razones, no se cuenta con un tratamiento eficaz para prevenir las crisis y mejorar el estado clínico de los pacientes sickléimicos.

En los últimos años ha cobrado especial interés el uso del campo eléctrico pulsante (CEP) en el tratamiento de diversas enfermedades, entre las que se pueden mencionar diferentes tipos de cáncer [1–4]; úlceras crónicas [2, 5, 6]; sicklemia, en la cual se ha observado, "in vitro", cambios de forma y volu-

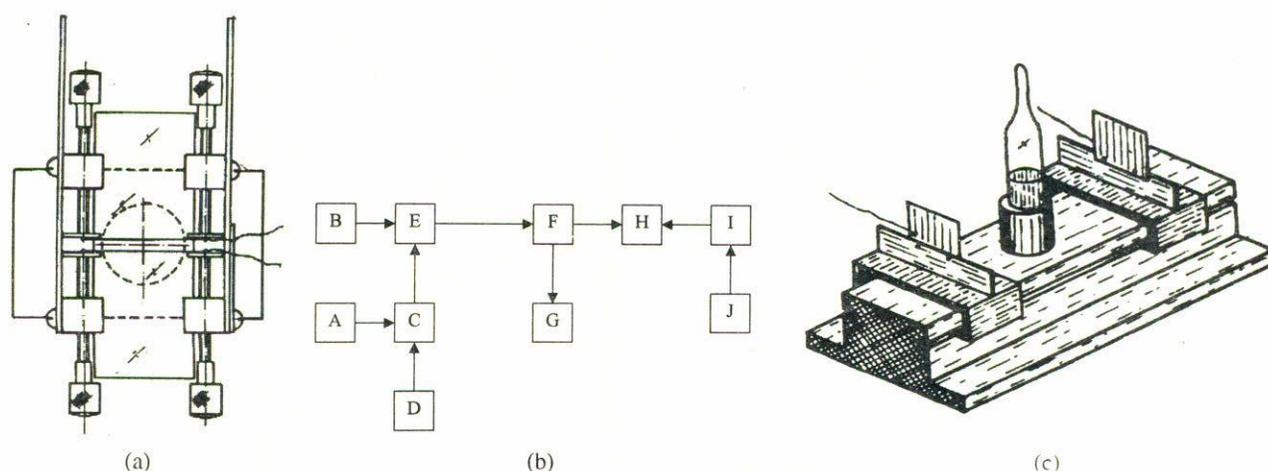


FIGURA 1. Instalación experimental que genera campo eléctrico pulsante. (a) Portamuestra utilizado para la observación del cambio de forma y volumen de los eritrocitos falciformes antes, durante y después de ser sometidos a la acción del campo eléctrico pulsante. (b) Diagrama en bloque de la instalación: A-Fuente de bajo voltaje de 5 V; B-fuente de alto voltaje; C-programador de pulsos; D-oscilador; E-amplificador de voltaje; F-fuente variable de tensión; G-osciloscopio; H-portamuestra; I-microscopio óptico; y J-observador [puede ser el ojo humano, una cámara fotográfica y/o un escáner acoplado a una computadora]. (c) Portamuestra utilizado para perturbar las soluciones de eritrocitos falciformes y deoxyHb S cuando son sometidos a la acción del campo eléctrico pulsante.

men durante algunos minutos, cuando los eritrocitos falciformes son sometidos a la acción de este agente físico [7–9]. Con este trabajo “in vitro”, se pretende observar los cambios de forma y volumen que experimentan los eritrocitos falciformes cuando son sometidos a la acción de diferentes umbrales de intensidad del CEP y verificar a través del tiempo de relajación transversal efectivo del protón de agua, T_2^* , si dichos cambios se deben a interacciones directas y/o indirectas del CEP con los polímeros de deoxyHb S existentes en la solución.

2. Materiales y métodos

2.1. Preparación de soluciones de eritrocitos falciformes y de moléculas de hemoglobina S desoxigenadas

2.1.1. Obtención de la masa eritrocitaria falciforme

Las muestras de sangre fresca tomadas de 10 pacientes sicklémicos, por punción de la vena antecubital, fueron colectadas en igual cantidad de tubos de ensayos con heparina. El plasma sobrenadante fue decantado y el pellet de eritrocitos se lavó tres veces con solución salina buffer fosfato (PBS) pH 7.4, centrifugándose cada vez a 4000 r.p.m. durante 10 minutos, en centrífuga refrigerada Jouan MR1812. Éste se suspendió en un pequeño volumen de PBS y se le determinó la concentración de hemoglobina mediante el método de la cianometahemoglobina [10]. La concentración inicial de hemoglobina S (Hb S) fue de 0.25 g/cm^3 (25 g/dl). Para lograr una rápida falciformación de los eritrocitos sicklémicos, a $250 \mu\text{L}$ de cada muestra se le realizó vacío durante 30 min. para extraerle el O_2 , y luego se añadieron $20 \mu\text{L}$ de solución de ditionito de sodio a una concentración de 1.05 M.

2.1.2. Obtención de la masa de hemoglobina S desoxigenada

Para la realización de este experimento fueron tomadas otras muestras de sangre de los mismos 10 pacientes sicklémicos. Se siguió la metodología expuesta en el punto 2.1.1. sin falciformar a los eritrocitos. Una vez obtenido el pellet de eritrocitos, éste se congeló a -70°C en un freezer, provocando la ruptura de las membranas de éstos. Se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 10 minutos y se separaron las moléculas de Hb S de la solución total por aspersion con agujas. Para lograr una rápida polimerización de las moléculas de Hb S, a $250 \mu\text{L}$ de cada muestra se le realizó vacío durante 30 min. para extraerle el O_2 , y luego se añadieron $20 \mu\text{L}$ de solución de ditionito de sodio a una concentración de 1.05 M.

2.2. Aplicación del campo eléctrico a las soluciones de eritrocitos falciformes y moléculas de hemoglobina S desoxigenadas

2.2.1. Aplicación del campo eléctrico a las soluciones de eritrocitos falciformes

2.2.1.1. Experimentos para observar el cambio de forma y volumen de los eritrocitos falciformes

Una vez obtenidas las diez soluciones de eritrocitos falciformes, de cada tubo de ensayo fueron extraídas cinco gotas de solución. Cada gota fue extendida, en forma de película, sobre el portaobjeto y entre dos conductores rectos y paralelos de Pt-Ir de 0.05 mm de diámetro, separados a la distancia de 0.5 mm (ver Fig. 1a). Luego se cubrió con el cubreobjeto y se colocó en un microscopio óptico MNH-8, con aumento de 800X, con el objetivo de observar el cambio de forma y volumen de los eritrocitos falciformes antes, durante y después

de la aplicación del CEP. Las fotos fueron tomadas con una cámara fotográfica acoplada al microscopio y luego escaneadas usando un escáner del tipo ScanMan Color 2000. Una vez terminada cada observación, para cada gota, los conductores fueron lavados con agua destilada y alcohol al 70%.

Para la aplicación del CEP, se diseñó y construyó un equipo, cuyo diagrama en bloques se representa en la Fig. 1b. Las frecuencias utilizadas fueron 10, 100, 300, 500 y 1000 KHz, correspondientes a las intensidades umbrales de campo eléctrico de 3, 3.1, 3.7, 4.3 y 4.7 kV/cm respectivamente, para un ancho de pulso, T_p , de 5 ms. Para estas mismas frecuencias y un T_p igual a 0.1 ms, las intensidades umbrales del campo eléctrico usadas fueron 3, 4, 4.2, 4.8 y 5.2 kV/cm, respectivamente. El intervalo entre pulsos fue de 1 s para evitar el calentamiento de la muestra. La secuencia de pulsos rectangulares se repitió durante 3 minutos.

El CEP se aplicó cuando se observó que el 90% o más de los eritrocitos sickléemicos se tornaron falciformes, criterio que se tomó para definir a las muestras de eritrocitos falciformes como controles.

2.2.1.2. Experimentos para medir el tiempo de relajación transversal de las soluciones de eritrocitos falciformes

Después que fueron extraídas las cinco gotas de solución de eritrocitos falciformes, por cada tubo de ensayo, la solución restante, en cada tubo de ensayo, se dividió en seis volúmenes iguales de 0.25 ml y fueron vertidas en igual número de ampúlas, las cuales se sellaron herméticamente por fusión del cristal utilizando un mechero de gas. Para atenuar la heterogeneidad natural existente entre las soluciones de eritrocitos falciformes se tomó una de las seis ampúlas obtenidas de cada tubo de ensayo y se formó un grupo control (GC_{ef}) formado por diez ampúlas. Este proceso se repitió cinco veces formándose así cinco grupos tratados (GT_{efi} , $i = 1, 2, 3, 4, 5$), cada uno sometido a un umbral de intensidad del CEP y formado por diez ampúlas. El subíndice i , por su orden de aparición, indica que los cinco grupos tratados están sometidos a los umbrales 3(3), 4(3.1), 4.2(3.7), 4.8(4.3) y 5.2(4.7) kV/cm, respectivamente, para T_p igual a 0.1(5) ms. Cada una de las ampúlas, pertenecientes a los GC_{ef} y GT_{ef} , se colocó en el centro de una configuración de dos electrodos planos cuadrados (4 cm^2) de paladio, de 0.0025 mm de espesor, dispuestos paralelamente, los cuales se fijaron a una base de teflón, que se desplaza a través de una guía construida también de teflón (ver Fig. 1c).

Se utilizaron los mismos parámetros del CEP del experimento descrito en 1 Sec. 2.2.1.1. El CEP se aplicó cuando el T_2^* de las soluciones de eritrocitos alcanzó el valor aproximado de 40 ms, correspondiendo al 90% o más de los eritrocitos falciformes.

2.2.2. Aplicación del campo eléctrico pulsante a las soluciones de hemoglobinas S desoxigenadas

Una vez obtenida las diez soluciones de deoxyHb S, correspondiente a cada paciente sicklémico, cada una de éstas se

dividieron en nueve volúmenes iguales de 0.25 ml y fueron vertidas en igual número de ampúlas, las cuales se sellaron herméticamente por fusión del cristal utilizando un mechero de gas. Para eliminar la heterogeneidad natural existente entre las soluciones de deoxyHb S, se tomó una de las nueve ampúlas obtenidas de cada tubo de ensayo y se formó un grupo control (GC_{ds}) formado por diez ampúlas. Este proceso se repitió ocho veces, formándose así ocho grupos tratados (GT_{dsj} , $j = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ y 8), cada uno sometido a un umbral de intensidad del CEP y formado por diez ampúlas. El subíndice j , por su orden de aparición, indica que los cinco grupos tratados están sometidos a los umbrales 3(3), 4(3.1), 4.2(3.7), 4.8(4.3), 5.2(4.7), 0.01(0.01), 0.1(0.1) y 1(1) kV/cm, respectivamente, para T_p igual a 0.1(5) ms. Cada una de estas ampúlas fueron colocadas entre los dos electrodos planos representados en la Fig. 1c. Se utilizaron los mismos parámetros del CEP descrito en la Sec. 2.2.1.1. Además, fueron usadas intensidades del CEP de 0.01, 0.1 y 1 kV/cm para las frecuencias de 100, 300 y 500 KHz. El CEP se aplicó cuando el T_2^* de las soluciones de deoxyHb S alcanzó el valor aproximado de 40 ms, correspondiendo a la fase de polímeros, la cual es equivalente al 90% o más de los eritrocitos sickléemicos que se tornaron falciformes.

En esta Sec. y en la 2.2.1.2. las soluciones de deoxyHb S y eritrocitos falciformes controles, respectivamente, se mantuvieron bajo las mismas condiciones que las tratadas, pero no se les suministró CEP. Durante la realización de los experimentos las soluciones de eritrocitos falciformes y de deoxyHb S, perteneciente a los grupos controles y tratados, se mantuvieron en baño termostático a 37°C. Las Secs. 2.2.1.1., 2.2.1.2. y 2.2.2. se realizaron para los valores de T_p igual a 5 y 0.1 ms.

2.3. Medición del tiempo de relajación transversal efectivo del protón de agua

Para monitorear los cambios moleculares de las deoxyHb S después de la aplicación del CEP, se diseñó y construyó un relaxómetro de RMN, compatible con un espectrómetro de RMN Bruker, lo que permitió el uso de su sistema magnético (B-E 20 f) y juego de sensores. Las mediciones de T_2^* fueron hechas a 42.6 MHz usando la secuencia de pulso spin-eco simple $90^\circ-\tau-180^\circ-\tau$ -adquisición.

2.4. Análisis estadístico

La diferencia entre los valores del T_2^* de los grupos experimentales (tratados y controles) fue probada haciendo uso del test de Student, para $\alpha = 0.05$. Para cada grupo experimental se reportó el T_2^* promedio con su desviación estándar.

3. Resultados y discusión

Se observó que los eritrocitos falciformes cambiaban de forma y volumen para los diferentes umbrales de intensidad del CEP usados, a los cuales les corresponde sólo un valor

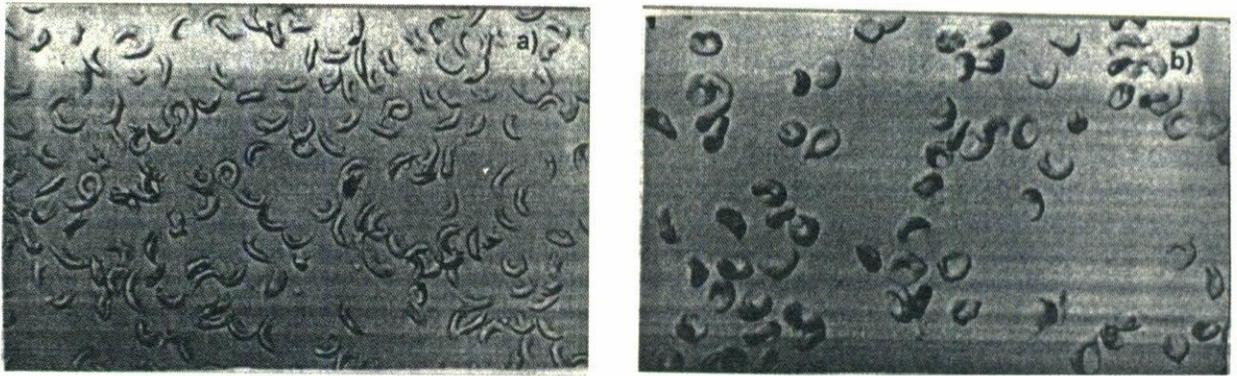


FIGURA 2. Eritrocitos falciformes antes (a) y después (b) de la aplicación del CEP. Esta figura corresponde a E_o , T_p y f iguales a 3.7 kV/cm, 5 ms y 300 KHz, respectivamente. Para los otros umbrales de intensidades se observaron fotos similares.

de frecuencia, f , y ancho de pulso, T_p (ver Fig. 2). Para intensidades menores o mayores a estos umbrales, manteniendo constante los valores de f , y T_p , los eritrocitos falciformes no cambiaron de forma o hemolizaron, respectivamente. La hemólisis también fue observada cuando estas células se expusieron a tiempos de aplicación del CEP mayores a 10 minutos. Para valores de frecuencia igual o por debajo de la frecuencia umbral, f_c ($f_c = 300$ KHz), se obtuvo una correspondencia entre los umbrales de intensidad del CEP observados experimentalmente y los obtenidos teóricamente por la ecuación de Schwan [11]; sin embargo, para frecuencias mayores a f_c , los umbrales de intensidad teóricos son mayores a los experimentales. Estos resultados fueron consistentes con los reportados por Takashima *et al.* [8, 9]. Para este rango de frecuencias, estos umbrales de intensidad del CEP fueron obtenidos experimentalmente, tomando los valores para los cuales se observó el mayor porcentaje de eritrocitos falciformes que cambiaron de forma y volumen.

Schwan [11] calculó el potencial que se induce en las membranas de las células cuando son sometidas a la acción del CEP, el cual viene dado por

$$\Delta V = \frac{1.5RE_o}{[1 + (2\pi\tau)^2]^{1/2}} = \frac{1.5RE_o}{\left[1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^2\right]^{1/2}}, \quad (1)$$

donde ΔV es el potencial transmembrana inducido; R es el radio del eritrocito (4×10^{-4} cm [8]); E_o y f son la amplitud y frecuencia del campo aplicado, respectivamente; τ y f_c son la constante de tiempo (5.3×10^{-7} s [8]) y la frecuencia umbral de la membrana [$f_c = 1/(2\pi\tau) = 300$ KHz], respectivamente.

Para valores de frecuencia mayores a f_c , la polarización de la membrana disminuye ($\Delta V \rightarrow 0$), ver Ec. (1), indicando que las membranas de los eritrocitos falciformes están shunteadas eléctricamente. Esto explica que existe una interacción directa del CEP con los polímeros de deoxyHb S intracelulares, que provoca desestabilización en los mismos y como consecuencia el cambio de forma de hoz a esférica o bicóncava de los eritrocitos falciformes. Este resultado fue corroborado a través del monitoreo, en el tiempo, del T_2^* de

las soluciones de eritrocitos falciformes y deoxyHb S tratadas con CEP, una vez que el T_2^* de estas soluciones alcanzó el valor aproximado de 40 ms. Para estas soluciones los umbrales de intensidad del CEP utilizados fueron 3.7, 4.3 y 4.7 kV/cm, para $T_p = 5$ ms, y 4.2, 4.8, y 5.2 kV/cm, para $T_p = 0.1$ ms. Además se usó, para las mismas frecuencias y T_p , las intensidades del CEP de 0.01, 0.1 y 1 kV/cm (ver Fig. 3). Se encontraron pequeñas diferencias entre los T_2^* de las soluciones de eritrocitos falciformes y deoxyHb S tratadas con CEP, para $f > f_c$, pero no así para $f = f_c$, sugiriendo esto que para este rango de frecuencias la membrana no desempeña un papel esencial y casi toda la energía del CEP interactúa con los polímeros de deoxyHb S y la restante, que es una fracción pequeña, lo hace con los componentes de la membrana. Esto se explica porque para los valores de frecuencia de 500 y 1000 KHz no se ha logrado un shunteado eléctrico perfecto ($\Delta V = 0$). Para $f = f_c$, también se observaron cambios de forma y volumen de los eritrocitos falciformes y diferencias significativas en el T_2^* de las soluciones de eritrocitos falciformes y deoxyHb S, explicando esto que una fracción mayoritaria de la energía suministrada por el CEP es utilizada en desestabilizar a los polímeros de deoxyHb S y la restante, que no es despreciable, interactúa con los componentes de la membrana de los eritrocitos falciformes.

En la Fig. 3 se representa la evolución temporal del T_2^* de las soluciones de eritrocitos falciformes y deoxyHb S, después de aplicado el CEP. Se encontró que los T_2^* de las soluciones de eritrocitos falciformes y deoxyHb S tratadas con CEP, son mayores a los de las soluciones controles. Estas diferencias son altamente significativas ($p < 0.02$), significativas ($0.02 < p < 0.05$) y no significativas ($p > 0.05$) para los rangos de umbrales de intensidad del CEP mayor a 3 kV/cm, entre 1 y 3 kV/cm y menor a 1 kV/cm, respectivamente. Para las soluciones tratadas con umbrales de intensidad menores a 1 kV/cm, el comportamiento del T_2^* difiere ligeramente del de las soluciones controles, indicando que las energías asociadas al CEP no son suficientes para perturbar significativamente a los polímeros de deoxyHb S existentes en estas soluciones. Esto se comprobó al observarse que una fracción

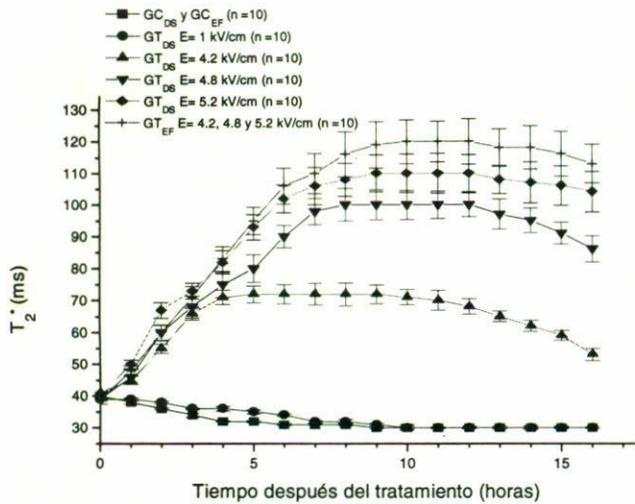


FIGURA 3. Tiempo de relajación transversal efectiva, T_2^* (en ms), en el tiempo (en horas) de los grupos de soluciones de eritrocitos falciformes y deoxyHb S controles y tratadas con CEP. Estas curvas corresponden al rango de frecuencias mayor a la frecuencia umbral, f_c . En esta figura se representan los valores medios de T_2^* y sus correspondientes desviaciones estándares (representadas por barras), de cada grupo experimental. Los subíndices EF y DS corresponden a las soluciones de eritrocitos falciformes y deoxyHb S, respectivamente. GC y GT indican los grupos control y tratado, respectivamente. Dentro del paréntesis se indica el número de muestras por grupo experimental.

pequeña de eritrocitos falciformes cambiaba de forma y volumen; sin embargo, para umbrales de intensidad del CEP mayores a 3 kV/cm, la situación fue completamente diferente ya que los T_2^* de las soluciones tratadas se diferenciaron significativamente de los de las soluciones controles, indicando que las energías suministradas son suficientes para debilitar las interacciones entre las moléculas de deoxyHb S dentro de cada polímero y la existente entre polímeros, eliminándose parcial o totalmente la causa que provoca la falciformación de los eritrocitos. Estas interacciones son las que predominan en el proceso de polimerización y son las responsables de la disminución del tiempo de relajación transversal efectivo. El debilitamiento de estas interacciones solo es posible si la energía del CEP es igual (fenómeno de resonancia) o mayor a la energía de unión de las moléculas de deoxyHb S dentro de los polímeros y a la existente entre polímeros. Esta perturbación del CEP con los polímeros de deoxyHb S también trae consigo que muchas de las moléculas de agua ligadas a los polímeros de deoxyHb S se conviertan en agua semilibre o libre, disminuyendo el tiempo de correlación, τ_c de la fracción de agua estrechamente enlazada a las moléculas de Hb S polimerizadas. Esta disminución del τ_c trae consigo un aumento del T_2^* . Se encontró que para intensidades mayores al umbral, para f y T_p fijos, el debilitamiento de tales interacciones es mayor, incrementándose aún más los valores del con respecto a los del umbral, sin embargo se observó hemólisis en los eritrocitos falciformes. Este resultado sugiere que es necesari-

rio tener el cuidado cuando se aplican intensidades del CEP mayores al umbral, para valores constantes de f y T_p .

Al T_2^* de las soluciones de deoxyHb S controles, durante la formación del polímero, puede contribuir dos efectos. Uno resulta del incremento del tiempo de correlación, τ_c , de la fracción de agua que aparece estrechamente enlazada a las moléculas de deoxyHb S polimerizadas y el otro proviene de las inhomogeneidades en el campo magnético local causado por la formación de dominios de polímeros con susceptibilidades magnéticas diferentes a la de la solución total, y de la anisotropía que caracteriza a la susceptibilidad magnética de los polímeros alineados. Estos efectos provocan que la caída de la Señal de Inducción Libre (SIL) tenga un tiempo característico, T_2^* , definido por

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta H_o, \quad (2)$$

donde ΔH_o representa la inhomogeneidad del campo magnético en el volumen de la muestra y T_2 es la constante de tiempo del SIL cuando la muestra se encuentra en un campo magnético perfectamente homogéneo. La homogeneidad en el interior del sistema magnético (imán permanente Bruker B-E 20 f), en un gap de 30 mm, es de 5 ppm, sugiriendo que la principal contribución al T_2^* se debe al τ_c . La disminución del T_2^* de las soluciones de eritrocitos y deoxyHb S controles se debe al aumento del τ_c , el cual es consecuencia del proceso de polimerización de las moléculas de deoxyHb S.

Sin embargo, para valores de frecuencia menores a f_c , la situación se torna más compleja ya que se observaron diferencias significativas entre los comportamientos del T_2^* , de las soluciones de eritrocitos falciformes y deoxyHb S tratadas con CEP (ver Fig. 4), indicando que una fracción de energía del CEP interactúa con los polímeros de deoxyHb S y la otra con las cargas superficiales y los componentes de la membrana (proteínas, lípidos, etc.), lo que sugiere que para este rango de frecuencia la membrana de los eritrocitos falciformes si desempeña un papel determinante. A medida que la frecuencia disminuye la polarización de la membrana aumenta hasta un valor constante (ver Ec. 1). Muchas anomalías en la membrana de los eritrocitos falciformes, asociadas con la polimerización de las deoxyHb S, han sido reportadas por diferentes técnicas experimentales, tales como: marcada afinidad de las moléculas de deoxyHb S por la membrana plasmática, la cual fue observada por extinción de fluorescencia [12]; grietas en la red esquelética de los eritrocitos falciformes, observada por microscopía inmunoelectrónica e inmunofluorescencia [13, 14]; disminución de la permeabilidad de la membrana (alteración en los canales de agua e iones) [15, 16]; presencia de largas vesículas de Ca^{2+} , originadas mediante un proceso de endocitosis anormal no selectivo a las proteínas observada mediante las técnicas de rayos X y teñimiento de membrana con chlortetracycline sensible al Ca^{2+} [17, 18]; etc.

Pensamos que el mecanismo primario, en este rango de frecuencia, es el propuesto por Ashe *et al.* [7]. Ellos establecieron que el CEP induce en ambos lados de las membranas

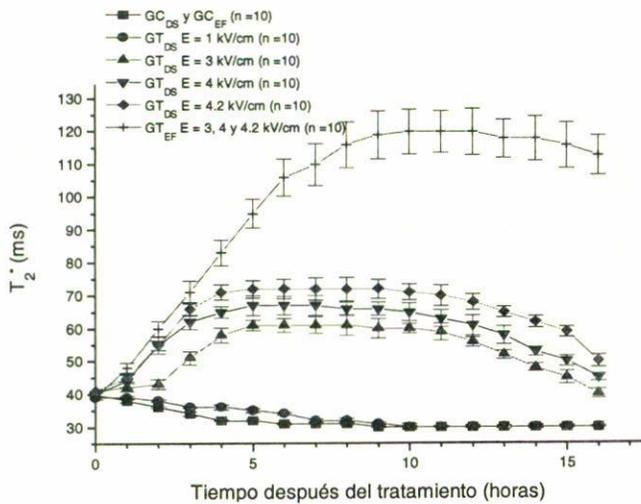


FIGURA 4. Tiempo de relajación transversal efectiva, T_2^* (en ms), en el tiempo (en horas) de los grupos de soluciones de eritrocitos falciformes y deoxyHb S controles y tratadas con CEP. Estas curvas corresponden al rango de frecuencias menor a la frecuencia umbral, f_c . En esta figura se representan los valores medios de T_2^* y sus correspondientes desviaciones estándares (representadas por barras), de cada grupo experimental. Los subíndices EF y DS corresponden a las soluciones de eritrocitos falciformes y deoxyHb S, respectivamente. GC y GT indican los grupos control y tratado, respectivamente. Dentro del paréntesis se indica el número de muestras por grupo experimental.

de estas células tracciones superficiales las cuales son las responsables del cambio de forma y volumen de los eritrocitos falciformes [7] y no la formación de poros propuesta por Takashima *et al.* [8, 9]. Creemos que estas tracciones superficiales inducidas en el interior de la membrana de los eritrocitos falciformes, son las responsables de inducir un reordenamiento parcial o total de las anomalías de las membranas de estos eritrocitos, que estén asociadas directamente con el proceso de polimerización de los monómeros de deoxyHb S, las cuales son reportadas experimentalmente en [12–18]. La naturaleza electromecánica de estas tracciones puede atenuar la marcada afinidad de las moléculas de deoxyHb S por la membrana plasmática, observada por Shaklai *et al.* [12], por debilitamiento directo y/o indirecto de la interacción electrostática (que depende del grado de polimerización de las moléculas de deoxyHb S [12]) entre estas moléculas y las proteínas banda 3. También, estas perturbaciones pueden conducir a reordenamientos directos y/o indirectos en las componentes horizontales (espectrina-espectrina, espectrina-actina, espectrina-proteína 4.1) y vertical (espectrina-banda 3) del esqueleto de la membrana, llegándose a restablecer parcial o totalmente el equilibrio dímero-dímero de las espectrinas, en el caso de los eritrocitos reversiblemente sickleados. Para los eritrocitos que no cambiaron de forma, denominados irreversiblemente sickleados, el equilibrio dímero-dímero se ve seriamente afectado, como reportó Liu *et al.* [13, 14]. Es muy probable que existan estos reordenamientos en otras proteínas, como banda 4.5, además

de la banda 3 [15, 16], que restablezcan los canales de agua, aumentando así la permeabilidad de estas membranas al paso de agua y ciertos iones. El restablecimiento del nivel de K^+ y del flujo iónico en general, el agua y el O_2 , provoca la despolimerización de las moléculas de deoxyHb S. Además la plasticidad observada en los eritrocitos falciformes, debido al número de vesículas, que aumenta con el grado de deoxigenación de los eritrocitos falciformes [17, 18]. Estas vesículas pueden ser destruidas y perder su contenido de Ca^{2+} , a través de estas perturbaciones mecánicas o por lisis osmótica.

La fracción de energía del CEP que no interactúa con los componentes de la membrana de los eritrocitos falciformes disocia parte de los polímeros de deoxyHb S, de forma indirecta, contribuyendo a disminución de forma parcial de las anomalías reportadas en las Ref. 12–18.

Para ambos rangos de frecuencia, los comportamientos temporales del T_2^* después de aplicado el CEP a las soluciones de eritrocitos falciformes y deoxyHb S (ver Figs. 3 y 4), pueden ser explicados por la superposición de dos procesos antagónicos que se manifiestan. Uno es la acción perturbadora del CEP, que incrementa los valores del T_2^* y el otro es la presencia del Ditionito de Sodio, que favorece la formación del polímero de deoxyHb S, y produce una disminución en los valores de los mismos. Una vez aplicado el CEP y durante un tiempo predomina la acción de éste sobre la del Ditionito de Sodio, explicando la subida de los valores del T_2^* hasta un valor constante, el cual es explicado por el equilibrio existente entre estos dos procesos antagónicos. Este equilibrio explica el hecho de que no se alcancen los valores de T_2^* en la fase de monómeros de Hb S, cuando éstos son sometidos al 100% de oxigenación [19, 20]. Después se observa una ligera disminución de los valores del T_2^* indicando que la “memoria” del CEP va desapareciendo y comienza a predominar la acción desoxigenante del ditionito de sodio. Esto se evidencia más para el rango de frecuencias menores al umbral (ver Fig. 4) que para el rango de frecuencia mayores a éste (ver Fig. 3).

4. Conclusiones

En dependencia del rango de frecuencia, el mecanismo básico para explicar el cambio de forma y volumen observado en los eritrocitos falciformes cuando son sometidos a la acción de un CEP, es diferente. Para $f > f_c$, el mecanismo principal es la interacción del CEP con los polímeros de deoxyHb S. Sin embargo para $f \leq f_c$, se superponen dos efectos: una fracción de energía interactúa con los polímeros de deoxyHb S y la otra induce fuerzas electromecánicas en las membranas de los eritrocitos falciformes, las cuales pudieran ser las responsables del reordenamiento, parcial o total de algunas de las anomalías, en los componentes de la membrana celular. Estas anomalías están asociadas con el proceso de polimerización de la deoxyHb S. Si bien la RMN, a través del tiempo de relajación transversal, no permite dilucidar el papel que desempeña la membrana, si resulta muy útil para registrar los cambios que ocurren a escala molecular, los

cuales pueden ser un indicador directo e indirecto de la despolimerización de las deoxyHb S y de reordenamientos que ocurren en la membrana de los eritrocitos falciformes, respectivamente, evidenciándose la efectividad de esta modalidad de tratamiento con CEP.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Fidel Guilart González, del Departamento de Física de la Universidad de Oriente, por su valiosa contribución a este trabajo.

1. G. Serša and D. Miklavcic, *Regional Cancer Treatment* **1** (1994) 31.
2. L. Vodovnik, D. Miklavcic, and G. Serša, *Med. & Biol. Eng. & Comput.* **30** (1992) Ce21.
3. N.J.F. Dodd, J.V. Moore., T.V. Taylor, and S. Zhoo, *Physics Medical* **4** (1993) 2.
4. L. Bergues *et al.*, *Rev. Bras. Cancerol.*, **44** (1998) 203.
5. L. Stefanovska, L. Vodovnik, H. Benko, and R. Turk, *Med. & Biol. & Comput.* **31** (1993) 213.
6. L. Vodovnik and R. Karba, *Med. & Biol. & Comput.* **30** (1992) 257.
7. J.W. Ashe, D.K. Bogen, and S. Takashima, *Ferroelectrics* **68** (1989) 311.
8. S. Takashima and T. Asakura, *Science* **220** (1983).
9. S. Takashima, S. Chang, and T. Asakura, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82** (1985) 6860.
10. F.R. Ciscar, and P.V. Farreras, *Diagnóstico Hematológico*. Segunda Edición, (Jims, Barcelona, 1964).
11. H.P. Schwan, in *Biological Effects and Dosimetry of Nonionizing Radiation*, (Plenum, New York, 1983).
12. N. Shaklai, V.S. Sharma, and H.M. Ranney, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78** (1981) 240.
13. S.C. Liu, L.H. Derick, S. Zhai, and J. Palek, *Science* **252** (1991) 574.
14. S.C. Liu, L.H. Derick, S. Zhai, and J. Palek, *Blood* **81** (1993) 522.
15. Gh. Benga *et al.*, *Transport. Eur. J. Cell. Biol.* **41** (1986) 252.
16. Gh. Benga *et al.*, *Eur. J. Cell. Biol.* **59** (1992) 219.
17. P. Williamson, E. Puchulu, M. Westerman, and R. Schlegel, *Biotechnology and Applied Biochemistry* **12** (1990) 523.
18. P. Williamson *et al.*, *Journal of Cellular Physiology* **152** (1992) 1.
19. G.L. Cottam, M.R. Watermann, and C.B. Thompson, *Arch. Biochem. Biophys. J* **181** (1977) 61.
20. C.B. Thompson, M.R. Watermann, and G.L. Cottam, *Arch. Biochem. Biophys. J* **166** (1975) 193.