

## Influencia del campo eléctrico pulsante en la cinética de polimerización de las hemoglobinas S. Parte II: aumento del tiempo de demora

Luis E. Bergues Cabrales,<sup>1</sup> Alcibiades Lara Lafargue, Jorge García Rodríguez, Rodolfo Pérez Bruzón, Héctor Camués Ciria, Richard Hinojosa Aldana, Liban Montes de Oca González, Alfredo Fong Reyes y Ariel González Suárez

*División de Caracterizaciones Magnéticas y Magnetoterapia, Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado  
Universidad de Oriente*

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

<sup>1</sup>*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 22 de marzo de 1999; aceptado el 3 de marzo de 2000

Se realiza un estudio "in vitro" para analizar el retardo del proceso de polimerización cuando las soluciones de moléculas de desoxihemoglobina S son sometidas a la acción de diferentes umbrales de intensidad del campo eléctrico pulsante. Mediante la medición del tiempo de relajación transversal efectivo del protón de agua, se cuantifican las variaciones del tiempo de demora cuando estas soluciones son sometidas a la acción de este agente físico. Se concluye que existe un aumento del tiempo de demora de las soluciones de desoxihemoglobinas tratadas con campo eléctrico pulsante respecto al de las soluciones controles. Este aumento del tiempo de demora se debe a interacciones directas con las moléculas de desoxihemoglobina S, explicando esto el retardo significativo del proceso de polimerización observado en las soluciones tratadas.

*Descriptor:* Tiempo de relajación transversal efectivo del protón de agua; moléculas de desoxihemoglobina S; tiempo de demora

An "in vitro" study is made to analyze the delay of the polymerization undergone by the deoxyhemoglobin molecules solutions when subjected to the action of different intensity thresholds of a pulsed electric field. By means of the measurement of the effective transverse water proton relaxation time, the variations of the delay time when these solutions are subjected to the action of this physics agent are quantified. It is concluded there is a delay time increase of the treated deoxyhemoglobin S solutions with pulsed electric field in respect to the control solutions. This delay time increase is due to a direct interaction with deoxyhemoglobin S molecules, thus explaining the significative delay of the observed polymerization process in the treated solutions.

*Keywords:* Effective transverse water proton relaxation time; deoxyhemoglobin S molecules; delay time

PACS: 87.15.Da; 31.70.hq

### 1. Introducción

La anemia por hemátis falciformes o sickleemia fue descrita primeramente por Pauling *et al.* en 1949, como una enfermedad molecular [1]. La sickleemia es una enfermedad de origen genético y consiste en la sustitución del aminoácido valina por ácido glutámico en la sexta posición de las cadenas  $\beta$ . La polimerización de las moléculas de hemoglobinas S desoxigenadas (deoxiHb S), para formar un gel altamente viscoso, es el evento primario de la patofisiología de la enfermedad de la célula falciforme [2, 3], la cual rigidifica y distorsiona a los eritrocitos desoxigenados de los pacientes sickléimicos. Un tratamiento más amplio de la sickleemia, incluyendo los aspectos genéticos y clínicos, puede ser encontrado en las Refs. 4 y 5.

La cinética de la polimerización de deoxiHb S, quizás el aspecto más importante del proceso, es uno de los mejores ejemplos que caracteriza la agregación controlada de una nucleación. Esta cinética exhibe un curso temporal no usual y la dependencia más alta de una razón de concentraciones, que se haya observado en cualquier proceso en solución [6]. La supersaturación de la solución, razón entre las concentraciones

inicial de Hb S y de la solubilidad del equilibrio, a la potencia 50th está relacionada con el inverso del tiempo de demora,  $T_d$  [6, 7]. El  $T_d$  es el tiempo que transcurre hasta la formación del núcleo crítico de moléculas de deoxiHb S, por las vías de nucleación homogénea o heterogénea. En los experimentos de salto de temperatura, se encontró que el tiempo de demora,  $T_d$ , es extraordinariamente sensible a la temperatura y a la concentración inicial de Hb S [2, 4, 7, 10], a la fracción de saturación con monóxido de carbono u oxígeno [4], a la solubilidad y a la presencia de otras hemoglobinas [3]. Una vez alcanzado este núcleo crítico, el proceso de polimerización de estas moléculas se acelera, favoreciéndose así la fase de formación de polímeros de deoxiHb S.

Una gran parte del suceso en el entendimiento del proceso de polimerización puede ser atribuido a la aplicación de muchos métodos físicos diferentes, entre los que se pueden citar la microscopía electrónica, difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear, espectroscopia de dicroísmo lineal y circular, birrefringencia lineal, fotólisis de láser, calorimetría, microespectrofotometría y cinéticas de salto de temperatura, viscometría [7–9].

El objetivo de este trabajo "in vitro" es mostrar, a través del parámetro  $T_d$ , obtenido de la medición del  $T_2^*$ , por la técnica de RMN, que el CEP retarda la formación del núcleo crítico y por ende el proceso de polimerización de las moléculas de deoxiHb S.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Obtención de la masa de hemoglobinas S deoxigenadas

Las muestras de sangre fresca tomadas de 10 pacientes sickléemicos, por punción de la vena antecubital, fueron colectadas en 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 4 000 r.p.m. durante 10 minutos, en centrifuga refrigerada Jouan MR1812. Este se suspendió en un pequeño volumen de PBS y se le determinó la concentración de hemoglobina mediante el método de la cianometahemoglobina [11]. La concentración inicial de hemoglobina S (Hb S) fue de  $0.25 \text{ g/cm}^3$  (25 g/dl). Una vez obtenido el pellet de eritrocitos, éste se congeló a  $-70^\circ\text{C}$  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 aspersión 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  $\text{O}_2$ , 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 hemoglobinas S deoxigenadas

Una vez obtenida las diez soluciones de deoxiHb S, correspondiente a cada paciente sicklémico, cada una de éstas se dividieron en seis volúmenes iguales de 0.25 ml y fueron vertidas en igual número de ampulas, las cuales se sellaron herméticamente por fusión del cristal a través de un mechero de gas. Para eliminar la heterogeneidad natural existente entre las soluciones de deoxiHb S, se tomó una de las seis ampulas obtenidas de cada tubo de ensayo y se formó un grupo control ( $\text{GC}_{\text{ds}}$ ) formado por diez ampulas. Este proceso se repitió cinco veces, formándose así cinco grupos tratados ( $\text{GT}_{\text{dsj}}$ ,  $j = 1, 2, 3, 4, 5$ ), cada uno sometido a un umbral de intensidad del CEP y formado por diez ampulas. El subíndice  $j$ , por su orden de aparición, indica que los cinco grupos tratados están sometidos a los umbrales 0.01, 1, 3, 4.2, y 5.2 kV/cm, respectivamente, para  $T_p$  igual a 0.1 ms. Cada una de estas ampulas se colocaron en el centro de una configuración de dos electrodos planos cuadrados de paladio, de  $4 \text{ cm}^2$  y espesor de 0.0025 mm, dispuestos paralelamente, los cuales se fijaron a una base de teflón, la cual se puede desplazar con respecto a una estructura también de teflón (ver Fig. 1a).

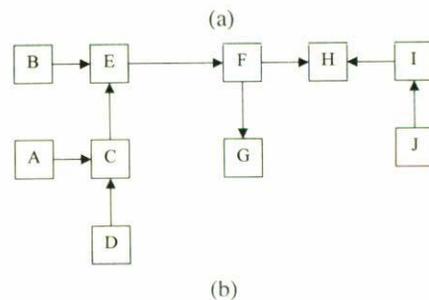
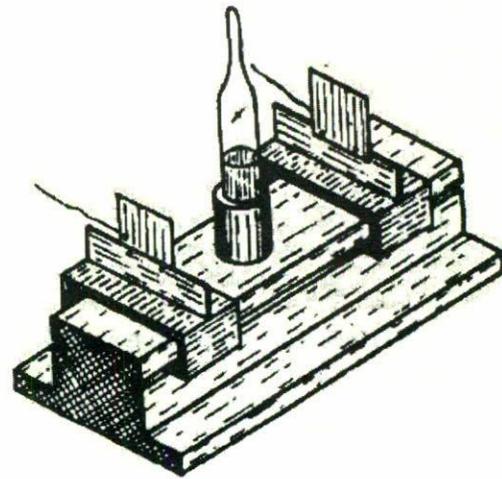


FIGURA 1. Instalación experimental que genera campo eléctrico pulsante. (a) Portamuestra utilizado para perturbar las soluciones de moléculas de deoxiHb S cuando son sometidos a la acción del campo eléctrico pulsante. (b) Diagrama en bloque de la instalación: A-fuente de bajo voltaje de 5 V; B-fuente 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].

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, 300 y 1000 KHz, correspondientes a las intensidades umbrales de campo eléctrico de 3, 4.2 y 5.2 kV/cm, para un ancho de pulso,  $T_p$ , de 0.1 ms, respectivamente. El intervalo entre pulsos fue de 1s para evitar el calentamiento de la muestra. La secuencia de pulsos rectangulares se repitió durante 3 minutos. También, se usaron otras intensidades del CEP de 0.01 y 1 kV/cm para la frecuencia de 100 KHz. El CEP se aplicó cuando el  $T_2^*$  de las soluciones de deoxiHb S alcanzó el valor aproximado de 130 ms, correspondiendo a la fase de monómeros de deoxiHb S.

Las soluciones de deoxiHb S controles se mantuvieron bajo las mismas condiciones que las tratadas, pero no se les suministró CEP. Durante la realización de los experimentos las soluciones de deoxiHb S, perteneciente a los grupos controles y tratados, se mantuvieron en baño termostataado a  $37^\circ\text{C}$ .

TABLA I. Tiempo de demora,  $T_d$ , de los grupos de soluciones de deoxiHb S control y tratados con CEP. El número entre paréntesis indica la cantidad de muestras por grupo.

Tiempo de demora (horas)	GC ( $n = 10$ )	GT $E = 0.01$ kV/cm ( $n = 10$ )	GT $E = 1$ kV/cm ( $n = 10$ )	GT $E = 3$ kV/cm ( $n = 10$ )	GT $E = 4.2$ kV/cm ( $n = 10$ )	GT $E = 5.2$ kV/cm ( $n = 10$ )
$T_d$	0.3	0.5	2.8	6.0	9.9	12.7

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

Para monitorear los cambios moleculares de las deoxiHb 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. A 42.6 MHz, las mediciones de  $T_2^*$  fueron hechas usando la secuencia de pulso espín-eco simple  $90^\circ$ - $\tau$ - $180^\circ$ - $\tau$ -adquisición.

### 2.4. Análisis estadístico

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

## 3. Resultados y discusión

En este trabajo se encontró que el  $T_d$  es sensible no sólo a las variables antes mencionadas [2, 4–7, 10], sino también a los agentes físicos, químicos y/o biológicos externos que retarden o inhiban la formación del núcleo crítico. Encontramos experimentalmente que el  $T_d$  es sensible a la dosis del CEP (intensidad, ancho de pulso, frecuencia, tiempo de exposición y forma de onda).

Se observó en los grupos tratados con CEP un aumento significativo del  $T_d$  (ver Tabla I) y un retardo del proceso de polimerización de las moléculas de deoxiHb S, con respecto al grupo control (ver Fig. 2). En la Tabla I se observa que el  $T_d$  aumenta significativamente con el aumento de la intensidad umbral del CEP. Este resultado puede ser explicado porque al aumentar la intensidad umbral del CEP mayor es la perturbación que se induce en las soluciones de deoxiHb S, debilitándose la interacción entre las moléculas de deoxiHb S (si la vía de ocurrencia del proceso de polimerización fuese la nucleación homogénea) o entre las moléculas y la pequeña fracción de polímeros (si la vía de ocurrencia de este proceso fuese la nucleación heterogénea), lo que conduce a que la probabilidad de formación de los polímeros de deoxiHb S, sea menor. Esto explica que los valores del  $T_2^*$  de los grupos tratados con CEP, respecto a los del grupo control, se mantengan prácticamente constantes en la primera parte de la curva, correspondiente a la fase de monómeros, y que luego se manifiesta una disminución más suave de éstos hasta alcanzar

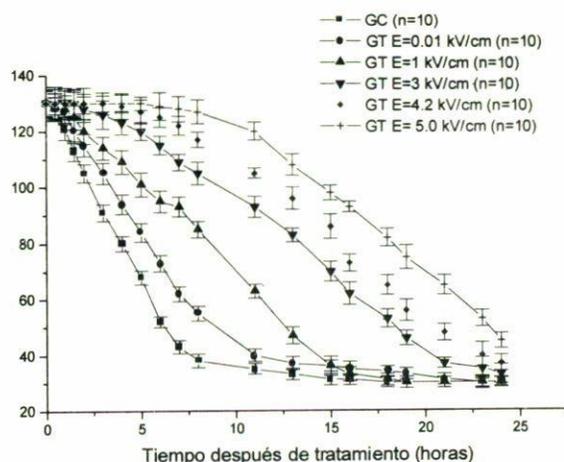


FIGURA 2. Tiempo de relajación transversal efectivo,  $T_2^*$  (en ms), en el tiempo (en horas) de los grupos de soluciones de deoxiHb S controles y tratadas con CEP. En esta figura se representan los valores medios de  $T_2^*$  y sus correspondientes desviaciones estándares (representadas por barras), de cada grupo experimental. GC y GT representan a los grupos control y tratados, respectivamente. Dentro del paréntesis se indica el número de muestras por grupo experimental.

un valor constante, correspondiente a las fases de transición de monómeros a polímeros y de polímeros, respectivamente.

Al tiempo de relajación transversal efectivo,  $T_2^*$ , pueden contribuir dos efectos. Uno resulta del incremento del tiempo de correlación,  $\tau_c$ , de la fracción de agua que aparece estrechamente enlazada a las moléculas de proteínas 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

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

donde  $\Delta H_o$  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. En nuestro caso  $\Delta H_o/H_o = 5 \times 10^{-6}$ , en un gap de 30 mm, sugiriendo que la principal contribución al  $T_2^*$ , se debe a  $\tau_c$ .

TABLA II. Parámetros obtenidos del ajuste de las datas experimentales (sigmoide) de los grupos de soluciones de deoxiHb S control y tratados con CEP.

Parámetros obtenidos del ajuste	GC (n = 10)	GT E = 0.01 kV/cm (n = 10)	GT E = 1 kV/cm (n = 10)	GT E = 3 kV/cm (n = 10)	GT E = 4.2 kV/cm (n = 10)	GT E = 5 kV/cm (n = 10)
$T_{2i}$ (ms)	152.41 [5.82]	152.23 [4.19]	141.07 [4.55]	140.12 [2.63]	133.52 [1.12]	132.35 [0.922]
$T_{2f}$ (ms)	30.398 [0.664]	31.923 [0.587]	26.162 [1.89]	17.685 [3.95]	25.278 [3.22]	27.969 [5.92]
$t_o$ (h)	3.0710 [0.238]	4.2009 [0.223]	7.7332 [0.349]	13.222 [0.328]	15.505 [0.276]	18.190 [0.507]
$\tau$ (h)	2.0112 [0.130]	2.6726 [0.141]	3.5940 [0.334]	5.1899 [0.408]	4.0560 [0.257]	3.9563 [0.329]
$T_{20}$ (h)	0.2837	0.49584	2.75084	6.02719	9.88249	12.70541
$T_{80}$ (h)	5.8600	7.90598	12.71562	20.41657	21.12809	23.67469
$\chi^2$	3.5529	1.99409	7.68422	3.07661	2.51625	2.85594

El comportamiento observado en los  $T_2^*$  de los grupos tratados y control, se explica por la competencia existente entre dos agentes completamente antagónicos: el CEP y el ditionito deoxiHb S, respectivamente. Algunas horas después del tratamiento, el CEP tiene el efecto predominante y luego, dependiendo de la intensidad, ancho de pulso y concentración de las moléculas de deoxiHb S, comienza a predominar la acción del ditionito de sodio, situación que explica la disminución de los valores del  $T_2^*$ . En los grupos tratados con CEP, la disminución de los valores del  $T_2^*$  es más suave que en el grupo control, sugiriendo esto que el  $\tau_c$  de las soluciones de deoxiHb S tratadas con CEP aumentan más lentamente.

Los datos experimentales de los grupos tratados con CEP y control se ajustaron a una sigmoide (ver Fig. 2), la cual viene dada por

$$T_2(t) = \frac{T_{2i} - T_{2f}}{1 + e^{(t-t_o)/\tau}} + T_{2f}, \quad (2)$$

donde  $T_{2i}$  y  $T_{2f}$ , en ms, son los tiempos de relajación transversal del protón de agua inicial ( $t = 0$ , correspondiente a la fase de monómeros) y final ( $t \rightarrow \infty$ , correspondiente a la fase de polímeros), respectivamente;  $t$  es el tiempo, en horas;  $t_o$ , en horas, es el punto medio del proceso de polimerización de las moléculas de deoxiHb S y lo interpretamos como el instante de tiempo en que la solución de estas moléculas pasa de la fase de monómeros a la de polímeros; y  $\tau$ , en horas, lo interpretamos como la constante de tiempo de la solución de moléculas de deoxiHb S, que caracteriza la rapidez con que ocurre el proceso de polimerización. Los parámetros  $t_o$  y  $\tau$  son obtenidos del ajuste de los datos experimentales (ver Tabla II). Este comportamiento sigmoide, también ha sido reportado con el uso de otros métodos físicos [4]. En este comportamiento, Fig. 2, se destacan tres

fases: la de monómeros (desde  $t = 0$  a  $T_{20}$  horas), la de transición de monómeros a polímeros (desde  $t = T_{20}$  a  $T_{80}$  horas) y de polímeros (a partir de  $t = T_{80}$  horas).  $T_{20}$  y  $T_{80}$  representan los tiempos para los cuales el  $T_2^*$  alcanza el 20 y 80% de su valor inicial, respectivamente. Los criterios utilizados para determinar analíticamente el valor de  $T_d$  y el comienzo de la fase polímero son  $t$  igual a  $T_{20}$  y  $T_{80}$ , respectivamente, porque estos valores delimitan muy bien las tres fases. La fase de transición de monómeros a polímeros de deoxiHb S, se caracteriza por una disminución brusca de los valores de  $T_2^*$ , indicando la formación de estos últimos, por las vías de nucleación antes mencionada. Las fases de monómeros y polímeros se caracterizan porque para ambos los  $T_2^*$  se mantienen prácticamente constantes y se diferencian en que los valores de  $T_2^*$  son mayores en la primera fase que en la última. En la fase de monómeros las interacciones fundamentales son: monómeros-monómeros de deoxiHb S (si la vía de ocurrencia del proceso de polimerización es la homogénea), monómeros-pequeña fracción de polímeros (si la vía de ocurrencia del proceso es la heterogénea) y monómeros de deoxiHb S con las moléculas de agua. En la fase de polímeros predominan las interacciones entre los polímeros de deoxiHb S; los monómeros de deoxiHb S en cada polímero; y los polímeros de deoxiHb S con las moléculas de agua ligadas a éstos. Estas interacciones son las responsables de la disminución de los valores del  $T_2^*$ . En la fase transitoria, de monómeros a polímeros de deoxiHb S, ocurren todas las posibles interacciones, resultando la fase más compleja. Para valores pequeños de los parámetros  $t_o$  y  $\tau$  con mayor celeridad se manifiesta el proceso de polimerización y por tanto en un tiempo menor se alcanza la fase de polímeros. Una vez alcanzado el valor de  $t_o$  el proceso se torna irreversible, conduciendo inevitablemente a la fase terminal o de polímeros.

Recientemente, hemos encontrado que el CEP combinado con agentes *antisickling*, en pequeñas cantidades retarda aún más el proceso de polimerización de las deoxiHb S, lo que sugiere la existencia de un efecto sinérgico.

#### 4. Conclusiones

De los resultados preliminares "in vitro" obtenidos en este estudio y en otros previos (ver Parte I), concluimos que el CEP puede utilizarse en la despolimerización de las moléculas de deoxiHb S y en el retardo del proceso de polimerización de las mismas. En estos estudios hemos observado que eritrocitos falciformes, en presencia de determinados umbrales del CEP, cambian de forma y volumen; además comprobamos que los valores de  $T_2^*$  correspondientes a la fase de polímeros aumentaban después de aplicado el campo. Estos

resultados fueron explicados por interacciones directas e indirectas que se producen entre el CEP y los polímeros de deoxiHb S (ver Parte I), para diferentes valores umbrales. Además, se observó que el campo interactúa con las soluciones de moléculas de deoxiHb S, resultando en un aumento del  $T_d$  y un retardo del proceso de polimerización. Estos resultados fueron corroborados por RMN, a través de la medición del  $T_2^*$ .

Para que el CEP, solo o combinado con otras sustancias que poseen efectos *antisickling*, pueda ser introducido en ensayos clínicos se requiere de un aumento de la cantidad y diversidad de las experiencias que permitan esclarecer los mecanismos fundamentales de interacción de este agente físico con las moléculas de deoxiHb S y eritrocitos falciformes de los pacientes sickléimicos.

- 
1. L. Pauling, H.A. Itano, S.J. Singer, and I.C. Wells, *Science* **110** (1949) 543.
  2. J. Hofrichter, P.D. Ross, and W.A. Eaton, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71** (1974) 4864.
  3. H.R. Sunshine, F.A. Ferrone, J. Hofrichter, and W.A. Eaton, *In development of therapeutic Agents of Sickle Cell Disease*, INSERM Symp. 9, edited by J. Rosa, Y. Bevard, and J.I. Hercules, (Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979) p. 31.
  4. A.N. Schechter, C.T. Noguchi, and G.P. Rodgers, "Sickle cell disease", in *Molecular Basis of Blood Disease*, edited by G. Stamatoyannopoulos and A.W. Nienhvis, (Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 1987) p. 179.
  5. H.F. Bunn and B.G. Forget, *Hemoglobin: Molecular genetic, and clinical aspects*, (Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 1986).
  6. J. Hofrichter, P.D. Ross, and W.A. Eaton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73** (1976) 3034.
  7. W.A. Eaton and J. Hofrichter, *Sickle Cell Hemoglobin Polymerization*, (Plenum Press, New York, 1990).
  8. W.A. Eaton, and J. Hofrichter, "Polarized absorption and linear dichroism spectroscopy of hemoglobin", in *Methods in Enzymology*, edited by E. Antonini, L. Rousi-Bernardi, and E. Chiancone, (Academic Press, New York, 1981).
  9. W.A. Eaton *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69** (1976) 539.
  10. J. Hofrichter, E.R. Henry, J.H. Sommer, and W.A. Eaton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80** (1979) 2235.
  11. F.R. Ciscar and P.V. Farreras, *Diagnóstico Hematológico*, 2da edición, (Jims, Barcelona, 1964).