

# Estudio de la microviscosidad de la hemoglobina A (HbA) y la hemoglobina S (HbS) en condiciones de desoxigenación espontánea

M. Lores\*, C. Cabal\*, O. Nascimento\*\*, A. M. Gennaro\*\*\* 

\*Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente, \*\*Instituto de Física de Sao Carlos, Grupo de Biofísica Molecular y Espectroscopia, Universidad de Sao Paulo, Brasil, \*\*\*Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

## ● Resumen

La microviscosidad de la hemoglobina A y la hemoglobina S es analizada en muestras con concentración intracelular, durante el proceso de desoxigenación espontánea y a 36 °C, empleando glutatión y carbonmonoxihemoglobina, marcados con 4-maleimido-tempo. El glutatión marcado muestra un comportamiento constante de la microviscosidad de la hemoglobina S durante el estudio. La carbonmonoxihemoglobina marcada muestra un incremento de la microviscosidad durante el proceso de polimerización de la hemoglobina S, lo cual pudiera explicar el comportamiento de los tiempos de relajación magnética protónica determinados en otros artículos para las mismas muestras.

Tanto el glutatión como la carbonmonoxihemoglobina marcados, reportan un comportamiento constante de la microviscosidad en la hemoglobina A.

Palabras clave: microviscosidad, HbS, polimerización, relajación.

## ● Abstract

The Microviscosity of hemoglobin A and hemoglobin S are analyzed in samples of intracellular concentration, during the free deoxygenation process and at 36 °C, using Glutathione and Carbonmonoxihemoglobin labeled with 4-maleimido-tempo. Labeled Glutathione shows a constant behaviour of the hemoglobin S microviscosity during the study. Labeled Carbonmonoxihemoglobin shows an increase of the microviscosity during the hemoglobin S polymerization process, which could explain the proton relaxation times behaviour determined in other articles for the same samples.

Labeled Glutathione and Carbonmoxihemoglobing report constant behaviour of microviscosity in hemoglobin A.

Key words: microviscosity, HbS, polymerization, relaxation.

## ● Introducción

La polimerización de la hemoglobina S (HbS) es el proceso molecular base de toda la fisiopatología en la anemia drepanocítica /1, 2/. Este proceso provoca una disminución (~2 veces) de los tiempos de relajación protónica (T1 y T2) en muestras de HbS de concentración intraeritrocitaria, bajo condiciones de

desoxigenación espontánea /3, 4/. Dicha disminución está relacionada con el incremento del tiempo de correlación rotacional de la HbS ( $\tau_R$ ) /5, 6/, quien está directamente relacionado, a su vez, con la viscosidad de la solución de proteínas /7/.

La viscosidad de la disolución de hemoglobina (Hb) puede ser determinada empleando la ley

generalizada de Mooney, hasta concentraciones de aproximadamente 7 mM /8, 9/. Según esta ley, puede demostrarse, que para concentraciones por debajo de 6 mM, la viscosidad de la solución sólo depende de la viscosidad intrínseca de la Hb, su concentración y la viscosidad del solvente, y no depende de las interacciones entre las moléculas de proteína, o entre las moléculas de proteína y el solvente.

La Resonancia Paramagnética Electrónica (ESR) permite realizar estudios dinámicos en las soluciones de biomoléculas /6/. En particular, el empleo de radicales nitroxilos ha posibilitado el estudio de la microviscosidad ( $\eta_{\mu}$ ) /8/, en soluciones de Hb, y ha sido demostrado que la  $\eta_{\mu}$  en el entorno de radicales nitroxilos disueltos en soluciones de Hb, coincide con la viscosidad de la solución para concentraciones de proteína, iguales o menores a 5 mM /9/.

El presente trabajo pretende comparar estudios de microviscosidad en la solución de Hb durante la polimerización de la HbS, realizados con sondas de pequeñas dimensiones y con sondas de tamaño comparable al de la proteína.

Se analiza, además, la influencia de los cambios de microviscosidad obtenidos para disoluciones de HbS en el tiempo de correlación rotacional de la Hb ( $\tau_r$ ) y en los comportamientos de T1 y T2, determinados en muestras de concentración intraeritrocitaria y en condiciones de desoxigenación espontánea /3, 4/.

## ● Métodos experimentales

Las muestras de hemoglobina A (HbA) y HbS fueron obtenidas a partir de sangre total venosa de individuos y pacientes voluntarios, empleando métodos clásicos /3, 4/.

Para la preparación del 4-maleimido-tempo (4MT)+Glutación(Glu) se toman 25  $\mu$ L de una solución 20 mM de 4MT en etanol y se depositan en el fondo de un vial plástico de 2 mL. Se burbujea nitrógeno gaseoso en el vial para eliminar el etanol. Se añaden 20  $\mu$ L de una solución 25 mM de Glu en PBS (pH 7,4). Después de 30 min de reacción, se burbujea nitrógeno gaseoso nuevamente, para dejar en el vial solamente el soluto de 4MT+Glu. A continuación, se depositan 50  $\mu$ L de Hb en el fondo del vial.

La carbonmonoxihemoglobina (HbCO) fue preparada colocando Hb en atmósfera de monóxido de carbono (CO) durante 30 min. La transformación fue comprobada a través del espectro óptico de la hemoglobina.

Muestras de HbACO y HbSCO, fueron mezcladas con 4MT (2:1), e incubadas a 8 °C durante 24 horas bajo agitación lenta. La hemoglobina marcada (HbACO+4MT y HbSCO+4MT) es lavada con PBS, filtrada con una membrana Centricón (10 000 dalton), para eliminar el radical libre (al menos 5 veces), y llevada hasta la concentración intraeritrocitaria (~30 g/dL), empleando la membrana de 10000 dalton, y utilizando la espectrofotometría óptica como método de verificación. Se mezcló 20  $\mu$ L de HbACO+4MT o HbSCO+4MT con 80  $\mu$ L de HbA o HbS, respectivamente, y se tomaron 40  $\mu$ L para el experimento de ESR.

El espectro clásico de ESR (Banda X) del 4MT+Glu se obtuvo en un espectrómetro BRUKER ER 200 con un campo central de 3 390 Gauss, un barrido de 100 Gauss, una amplitud de modulación de 0,32 Gauss pico a pico, una atenuación de 18 dB, y una constante de tiempo de 100ms.

El tiempo de correlación ( $\tau_c$ ) de esta sonda fue calculado utilizando la fórmula estándar para un régimen isotrópico de alta movilidad /8/. Para el cálculo de la microviscosidad alrededor del 4MT+ Glu ( $\eta_{\mu}$ ), fue empleada una curva de calibración de  $\tau_c$  como una función de la viscosidad  $m = (8,10 \pm 0,13) 10^{-8} \text{s(Pas)}^{-1}$ ,  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $r = 0,994$ ,  $N = 13$ ,  $p = 9 10^{-12}$ ), construida tomando el espectro de la sonda en disoluciones de sucrosa de concentración conocida a 36 °C /8/.  $\eta_{\mu}$  fue corregida por el cambio de temperatura, empleando la fórmula de Debye /10/.

Un espectrómetro de ESR Varian E-109 Century (Banda X) con un campo central de 3267 gauss, 4 min de tiempo de barrido, y un sistema multipropósito Varian E-231 para el control de la temperatura fue empleado para la determinación del espectro de transferencia de saturación (ST-ESR) del 4MT enlazado a la Carbonmonoxihemoglobina en muestras de HbA y HbS.

El segundo armónico fuera de fase de la señal de absorción ( $V^2$ ) fue obtenido con un barrido de campo

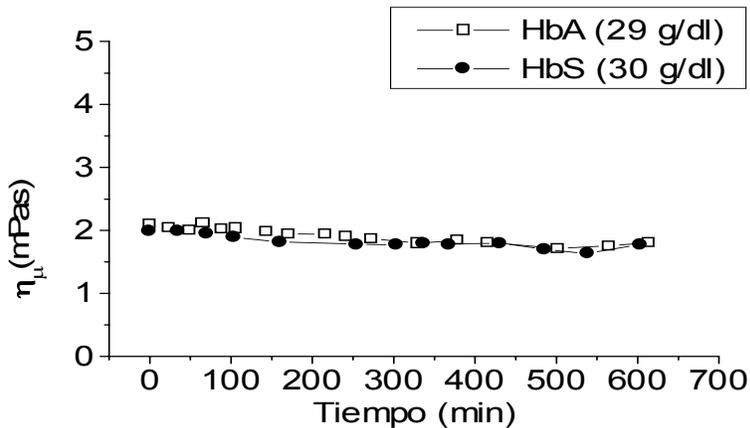
de 160 gauss, una amplitud de modulación de 5 gauss pico a pico, una frecuencia de modulación de 50 KHz, y una constante de filtrado de 0,128.

La relación  $C'/C$  [7], fue empleada para la estimación del tiempo de correlación rotacional del 4MT+HbACO y el 4MT+HbSCO ( $\tau_c^*$ ). La microviscosidad alrededor de estas sondas ( $\eta_\mu^*$ ) fue calculada dividiendo  $\tau_c^*$  por el tiempo de correlación de ambas sondas en agua a 36 °C ( $1,7 \cdot 10^{-8}$  s), y multiplicando el resultado por la viscosidad del agua a esa temperatura (0,7052 mPas).

Todas las mediciones se realizaron en condiciones de desoxigenación espontánea y a 36 °C. Los errores en la determinación de  $\eta_\mu$  alrededor del 4MT+Glu fueron de 2,7 %, y en la obtención de  $C'/C$  fueron del 2 %.

## ● Resultados y discusión

En la figura 1 se observa el comportamiento temporal típico de  $\eta_\mu$  en muestras de HbA ( $29 \pm 1,6$  g/dL) y HbS ( $30 \pm 1,7$  g/dL). Tanto en la HbA (2,14 mPas) como en la HbS (1,99 mPas), los valores de  $\eta_\mu$  permanecen aproximadamente constantes durante todo el experimento.



**Fig. 1: Comportamiento temporal típico de  $\eta_\mu$  en muestras de HbA ( $29 \pm 1,6$  g/dL) y HbS ( $30 \pm 1,7$  g/dL). Los valores de  $\eta_\mu$  permanecen constantes en la HbA (2,14 mPas) y la HbS (1,99 mPas).**

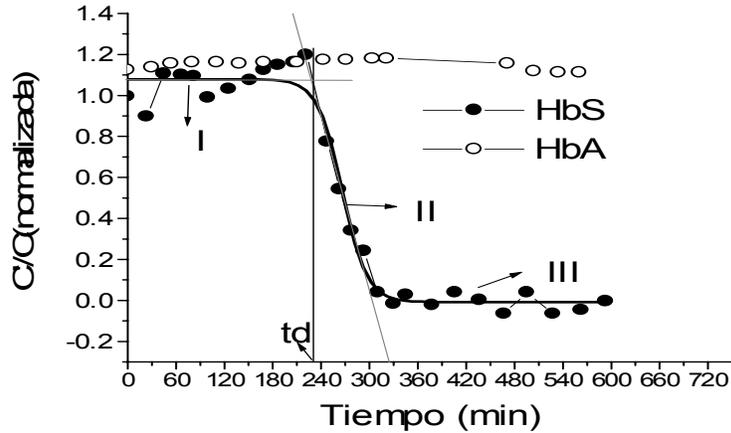
La ligera pendiente negativa que se observa en los comportamientos de ambas muestras (figura 1), está relacionada con el proceso de reducción del radical nitroxilo [12]. Este proceso provoca una pérdida de amplitud en todas las líneas de espectro de ESR, que se manifiesta, sin embargo, con diferentes constantes de tiempo en las líneas empleadas para el cálculo del tiempo de correlación. Esta diferencia conduce a una aparente disminución del tiempo de correlación, que no puede interpretarse como un incremento en la movilidad.

La figura 2 muestra el comportamiento temporal típico de los valores normalizados de la relación  $C'/C$ , obtenidos a partir de los espectros de ST-ESR del

HbACO+4MT y el HbSCO+4MT, disueltos en muestras de HbA y HbS, respectivamente.

De acuerdo con los resultados experimentales (no normalizados), para la HbACO+4MT, se obtuvo un comportamiento constante ( $C'/C = -1,55$ ), a diferencia de la HbS, donde los resultados muestran un comportamiento sigmoidal con tres etapas. En la I y la III,  $C'/C$  permanece invariable, y en la II, esta relación se incrementa hasta 1,4 veces su valor inicial.

Los valores de  $C'/C$  para la HbACO+4MT, y la HbSCO+4MT durante la etapa I ( $C'/C = -1,72$ ), se corresponden, según la calibración de Thomas y colaboradores, con lo reportado en la literatura para el tiempo de correlación rotacional ( $\sim 10^{-8}$ s) de la Hb [5, 7, 11].



**Fig. 2: Valores normalizados típicos de  $C'/C$  en las muestras estudiadas. Los trazos continuos representan los ajustes sigmoideal y lineal que caracterizan los resultados obtenidos en la HbS (30 g/dL) y HbA (33 g/dL), respectivamente.**

Los valores de  $\eta_{\mu}$  obtenidos en la HbA (2,14 mPas), y la HbS (1,99 mPas), coinciden con lo esperado, según la ley de Money /9/, para muestras de Hb de concentración intraeritrocitaria, y con otros resultados reportados en la literatura para muestras similares /10/.

Gennaro y colaboradores demostraron que  $\eta_{\mu}$  puede describirse por una ecuación igual a la que describe la viscosidad macroscópica (ley de Mooney), considerando nulo el factor que representa las interacciones entre las moléculas de Hb ( $K=0$ ) /8/. Por otro lado, empleando la Ley de Money puede demostrarse que para nuestro rango de concentraciones ( $\leq 5$  mM), la viscosidad macroscópica tampoco depende de las interacciones entre las macromoléculas. Por tanto, es lógico esperar una coincidencia entre nuestros valores experimentales y los esperados según la ley Money.

Considerando que los valores de  $\eta_{\mu}$  no son sensibles a las interacciones entre las moléculas de Hb, puede explicarse también su comportamiento constante en las muestras de HbS (figura 1), a pesar del proceso de polimerización que tiene lugar en estas muestras en nuestras condiciones experimentales.

En este trabajo formulamos como hipótesis que la ausencia de sensibilidad de  $\eta_{\mu}$  a las interacciones intermacromoleculares, está relacionado con el

pequeño volumen de esta sonda ( $0,033 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^3$ ) con respecto a la Hb ( $1,02 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^3$ ). Su volumen es aproximadamente 31 veces menor que el de la hemoglobina, lo cual pudiera provocar que permanezca en el solvente sin sentir las interacciones entre las moléculas de Hb que son un elemento fundamental durante la polimerización de la HbS.

Teniendo en cuenta lo discutido anteriormente, decidimos emplear el HbCO+4MT, una sonda con dimensiones similares a la Hb. En este caso, a partir de los valores de  $C'/C$  obtenidos (figura 2), podemos afirmar que los valores de  $\eta_{\mu}^* \approx 2$  mPas, en las muestras de HbA y de HbS ( $t < td$ ), coinciden con lo obtenido utilizando como sonda el 4MT+Glu, y con los valores de viscosidad macroscópica de la Hb para las concentraciones empleadas.

En las muestras de HbS  $\eta_{\mu}^*$  se incrementa hasta aproximadamente 2 veces su valor inicial ( $\eta_{\mu}^* = 4,15$  mPas). Este incremento en  $\eta_{\mu}^*$ , pudiera explicar el aumento de  $\tau_R$  y la disminución de T1 y T2 durante la polimerización de la HbS /3, 4, 12/.

Las tres etapas que caracterizan el comportamiento de  $C'/C$  en la HbS reflejan las tres fases del proceso de polimerización, identificadas por otros métodos /1, 13/: un inicio de agregaciones moleculares reversibles (I), seguido de un proceso de polimerización irreversible a partir del tiempo de demora (td) y con la formación

del núcleo crítico /1, 11/, que concluye (III) con un proceso de alineación y crecimiento de los polímeros ya formados, y que da lugar a la formación de microdominios estructurales inhomogéneos /1, 13/.

El  $\tau$  determinado a partir del espectro de ST-ESR del 4MT+HbSCO (~239 min), coincide con los resultados obtenidos en otros experimentos de Resonancia Magnética en condiciones de desoxigenación espontánea, teniendo en cuenta una variabilidad entre individuos de aproximadamente el 21 % /12/.

Las posibilidades de la sonda construida con la unión del 4MT y la carbonmonoxiHbS para ser sensible a los cambios de la microviscosidad en su entorno, durante la polimerización de la HbS, se deben a que sus dimensiones son comparables a las de las macromoléculas que conforman la solución en estudio, y por tanto, interacciones intermoleculares, como las que tienen lugar durante el proceso de agregación molecular afectan su movimiento.

Los valores de microviscosidad determinados en muestras de HbA y HbS ( $\tau < \tau_d$ ) de concentración intraeritrocitaria, y a 36 °C, coincidieron con la

viscosidad macroscópica de la solución en las mismas condiciones experimentales, y mostraron independencia de las dimensiones de la sonda empleada.

Para monitorear los cambios de viscosidad durante la polimerización de la HbS, fue necesario emplear una sonda con dimensiones similares a la hemoglobina.

Los cambios de viscosidad observados permiten explicar el incremento del tiempo de correlación rotacional de la hemoglobina durante la polimerización de la HbS, y contribuyen a entender el comportamiento de los tiempos de relajación protónica (T1 y T2), obtenidos empleando muestras similares en condiciones de desoxigenación espontánea.

Las diferencias en las sensibilidades de ambas sondas a las interacciones entre las moléculas de hemoglobina, pudieran estar relacionadas con sus dimensiones relativas con respecto a la proteína. El empleo de sondas con dimensiones similares a la hemoglobina puede constituir una herramienta mucho más efectiva si se pretende estudiar el efecto sobre la microviscosidad de procesos vinculados a interacciones intermacromoleculares.



## Referencias

1. W. A. Eaton, J. Hofrichter "Sickle Cell haemoglobin Polymerization" *advan. Prot. Chem.* 40, 1990, págs. 63-279.
2. F. A. Ferrone, J. M. Manning, B. Wei, R. Josephs, et al "Sickle hemoglobin Polymer stability probed by triple and quadruple mutant hybrids" *J. Biol. Chem.* 277/16, 2002, págs. 13479-13487.
3. J. Losada, C. Cabal, F. Guilart, A. Fernández "NMR Relaxation Study of Sickle Cell Disease" *Proc. 24th AMPERE Congress*, 1988, págs. 1027-1030.
4. C. Cabal, A. Fernández, M. Lores, E. Alvarez, et al "Magnetic relaxation in the Kinetics of the polymerization of Hemoglobin S. Clinical Diagnosis and treatment with vanillin" *Proc. ISMRM Sixth meeting and exhibition*, 1998, págs. 1705.
5. G. L. Cottam, M. R. Waterman, B. C. Thompson "Evaluation of the water environments in deoxygenated Sickle Cells by longitudinal and transverse water proton relaxation rates" *Archiv. Biochem. Biophys.* 166, 1975, págs. 193-200.
6. P. Thiyagarajan, M. E. Johnson "Saturation Transfer Electron paramagnetic resonance detection of Sickle hemoglobin aggregation during deoxygenation" *Biophys. J.* 42/3: 269-274 (1983).
7. D. D. Thomas, L. R. Dalton, J. S. Hyde "Rotational diffusion studied by passage saturation transfer electron paramagnetic resonance" *J. Chem. Phys.* 65/8: 3006-3025 (1976).
8. A. M. Gennaro, A. Luquita, M. Rasia "comparison between internal microviscosity of low-density erythrocytes and the microviscosity of hemoglobin solutions: An electron paramagnetic resonance study" *Biophys. J.* 71/389-393 (1996).
9. A. Herrmann, P. Müller "Correlation of the internal microviscosity of human erythrocytes to the cell volume and the viscosity of hemoglobin solutions" *Biochim. Biophys. Acta.* 885/ 80-87 (1986).
10. D. Daveloose, G. Fabre, F. Berleur, G. Testylier, et al "A new spin label method for the measurement of erythrocyte internal microviscosity" *Biochim. Biophys. Acta.* 763/41-49 (1983).
11. R. G. Bryant, W. M. Shirley "Dynamical deductions from nuclear magnetic resonance relaxation measurements at the water-protein interface" *Biophys. J.* 32/ 3-16 (1980).
12. E. Filkenstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckman "Superoxide-dependent reduction of Nitroxides By Thiols" *Biochim. Biophys. Acta.* 802/ 90-98 (1984).
13. A. Fernández "Kinetics of HbS polymerization studied by NMR. Contribution to Sickle Cell Disease treatment and evaluation" *University of Oriente Press* (2002).
14. A. Roufberg, F. A. Ferrone "A model for the Sickle Cell Hemoglobin fiber using both mutation sites" *Protein SCI.* 19/ 5: 1031-1034 (2000).