

*Trabajo Especial de*  
*Licenciatura en Física:*

**Determinación experimental del tiempo de  
evolución de procesos de cambios  
conformacionales en Hemoglobina humana  
mediante técnicas de Resonancia Magnética  
Nuclear**

Carla Cecilia Fraenza  
Director: Dr. Esteban Anoardo

Facultad de Matemática Astronomía y Física  
Universidad Nacional de Córdoba

Marzo de 2010



A mi familia...

# Índice General

Resumen	VII
Agradecimientos	VIII
<b>Capítulo 1: Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. ¿Qué son las proteínas?.....	3
1.1.1. Estructura de una proteína.....	5
1.1.2. Clasificación de las proteínas.....	7
1.1.3. Especificidad de una proteína.....	8
1.1.4. Desnaturalización de una proteína.....	9
1.1.5. Sistemas proteicos estudiados en este trabajo.....	9
1.1.5.1. Hemoglobina.....	9
1.1.5.2. Ovoalbúmina.....	10
1.1.5.3. Gelatina.....	11
1.2. Técnica experimental.....	12
1.2.1. Generalidades de RMN.....	12
1.2.2. Medición de $T_1$ .....	14
1.2.3. Relaxometría en el sistema rotante.....	15
<b>Capítulo 2: Propiedades físico-químicas de la hemoglobina</b>	<b>16</b>
2.1. Tipos de Hemoglobina.....	16
2.1.1. Hemoglobinas normales.....	17
2.1.1.1. Transporte de oxígeno: grupo prostético Hemo.....	19
2.1.1.2. Cooperatividad en la unión del oxígeno a la Hemoglobina.....	22
2.1.1.3. Factores que influyen en la afinidad de la Hemoglobina por el oxígeno.....	24
2.1.1.4. Mecanismo de la unión cooperativa del oxígeno: cambios estructurales en la Hemoglobina con la oxigenación.....	25
2.1.2. Hemoglobinas anómalas.....	27
<b>Capítulo 3: Experimental</b>	<b>32</b>
3.1. Preparación de solución de Hemoglobina.....	32
3.2. Técnicas experimentales.....	33
3.2.1. Medición de $T_1$ .....	33
3.2.2. Relaxometría en el sistema rotante: medición de campos locales.....	35

3.2.2.1 Caso I: Campos locales despreciables frente a $B_1$ .....	35
3.2.2.2 Caso II: Campos locales del mismo orden de magnitud que $B_1$ .....	37
3.2.3 Relaxometría en el sistema rotante: medición de campos locales en soluciones acuosas de Hemoglobina.....	39
3.2.4 Cromatografía de filtración molecular .....	41
3.2.5 Filtración por centrifugación.....	41
3.2.6 Espectroscopía infrarroja.....	41
3.3 Trabajo Experimental.....	43
3.3.1 Preparativos y verificaciones .....	43
3.3.1.1 Determinación de la curva frecuencia vs intensidad de un pulso de RF.....	44
3.3.1.2 Análisis de temperatura de la muestra luego de una secuencia de spin-lock.....	48
3.3.2 Mediciones de campo local .....	49
3.3.2.1 Gelatina porcina .....	49
3.3.2.2 Ovoalbúmina .....	52
3.3.2.3 Hemoglobina A .....	54
3.3.3 Mediciones de $T_{IF}$ en función del tiempo en Hb A.....	56
3.3.3.1 Estudio de la influencia del modo de congelación para la hemólisis en $T_{IF}$ vs t.....	58
3.3.3.2 Estudio de la influencia de agitamientos, refrigeración y congelación en $T_{IF}$ vs t.....	59
3.3.3.3 Estudio de la influencia de una centrifugación a 50.000 rpm al inicio de la curva $T_{IF}$ vs t .....	61
3.3.4 Mediciones de $T_{IM}$ en función del tiempo en Hb A.....	62
3.3.5 Mediciones de campo local en Hb A considerando la evolución temporal de $T_{IF}$ .....	65
3.3.6 Cromatografía de filtración molecular .....	71
3.3.7 Filtración por centrifugación .....	71
3.3.8 Espectroscopía infrarroja.....	73

**Capítulo 4: Análisis e interpretación de resultados** **77**

4.1 Estudios de campos locales en gelatina porcina .....	77
4.2 Estudio de campos locales en ovoalbúmina.....	78
4.3 Análisis de las curvas de evolución temporal de $T_{IF}$ y $T_{IM}$ en Hb A.....	79
4.3.1 Influencia del modo de congelación para hemólisis en $T_{IF}$ vs t.....	80
4.3.2 Influencia de agitamientos, refrigeración y congelación en $T_{IF}$ vs t.....	80
4.3.3 Influencia de una centrifugación a 50.000 rpm al inicio de la curva $T_{IF}$ vs t .....	81
4.3.4 Discusión del posible proceso que ocasiona la evolución temporal de $T_{IF}$ .....	81
4.4 Estudio de campos locales en Hemoglobina A.....	84

*Capítulo 5: Conclusiones*

**90**

*Referencias*

**93**

# Resumen

Este trabajo se orienta al estudio de procesos de cambios conformacionales de la molécula de hemoglobina A al ser extraída de su ambiente natural (eritrocitos). Para ello se realizaron mediciones del tiempo de relajación espín-red de protones en función del tiempo y de campo local en el sistema rotante. Estos experimentos fueron complementados con cromatografía de filtración molecular, filtraciones por centrifugación y espectroscopía de infrarrojo. A partir de los resultados obtenidos es posible determinar los tiempos de evolución de dos procesos diferentes, que en este trabajo se atribuyen a la dimerización del tetrámero de hemoglobina A debido al proceso de desoxigenación espontánea, y en segundo lugar, a una gelificación débil por afinidad de los dímeros. Los estudios se extienden a otros sistemas proteicos como la gelatina porcina y la ovoalbúmina. Este trabajo pone de manifiesto la potencialidad de las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear de baja resolución para la determinación de los tiempos característicos de evolución en procesos como los mencionados.

**Palabras claves:** Cambios conformacionales, Resonancia magnética nuclear, Hemoglobina.

**Clasificación Biblioteca:**

76.60.-k Nuclear Magnetic Resonance and Relaxation.

87.15.He Dynamics and Conformational Changes.

# Agradecimientos

Existen tantas personas que hicieron posible que hoy haya llegado hasta esta instancia de mi carrera por medio de depositar la confianza y apoyo necesarios, que voy a tratar de retribuir, en algún sentido, todo lo que hicieron por mí en la simple, pero muy importante, palabra GRACIAS.

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, que incluye a mis padres, mis dos hermanas, mi perro Tomy y mis cinco gatos, Yulita, Yunior, Minina, Gordo y Madre, por el apoyo moral incondicional que me brindaron durante toda la carrera.

En segundo lugar, a mi director, el Dr. Esteban Anoardo, de quien aprendí muchísimo y además depositó su confianza en mí, permitiéndome trabajar en un tema de acuerdo a mi interés.

A todos los profesores que tuve en la carrera, que me ofrecieron una calidad de enseñanza excelente, brindándome muchos de ellos el apoyo moral necesario para seguir adelante en momentos de dificultad, destacándose entre ellos, Jorge Trincavelli, Ricardo Zamar y Cecilia Gonzalez.

Por otro lado, a todos mis compañeros y amigos de la facultad, en especial a Seba, Javi y Ana, por el apoyo anímico que me dieron durante la última etapa de la carrera y me ayudaron a solucionar con la mayor de paciencia posible cada problema técnico que se me presentó. Además, a todos mis compañeros del LaRTE, que me recibieron muy bien en el grupo, destacando a German, quién me enseñó y ayudó muchísimo en mi trabajo especial.

A todos mis alumnos de la facultad, por el apoyo anímico que me brindaron, sobresaliendo entre ellos, Titi, Cesar y Alejandro.

A mi amiga Lujan y a mi profesora de gimnasia Carolina, por toda la confianza que depositaron siempre en mí, sirviendo eso de estímulo día a día.

A todo el personal de administrativo del despacho de alumnos de FaMAF, por la amabilidad y eficiencia que mostraron para cada problema académico que se me presentó durante la carrera, recalcando la actuación de María José.

A toda la gente de los LEF, y de los grupos de Resonancia Cuadrupolar de FaMAF y de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas, por la infinita paciencia y ayuda que me brindaron para poder realizar mi trabajo especial.



Por último, a los guardias de seguridad de FaMAF, quienes tuvieron la amabilidad de abrirme la puerta de entrada a la facultad días feriados, fines de semana, y días de semana a la madrugada, para poder llevar a cabo experimentos que demandaban extensas cargas horarias.

# Capítulo 1

## Introducción

Las proteínas son las moléculas orgánicas que desempeñan el mayor número de funciones en las células de todos los seres vivos, desde formar parte de la estructura básica de los tejidos hasta desempeñar funciones metabólicas, reguladoras, y de transporte.

Considerando el protagonismo de estas biomoléculas, la motivación de este trabajo fue la posibilidad de abordar el estudio de cambios de orden y dinámica molecular en una proteína tan fundamental como la *hemoglobina* (Hb), centrándonos en la hemoglobina mutante denominada *hemoglobina S* (Hb S), durante su proceso de polimerización característico en condiciones de desoxigenación, por medio de técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [1,2].

El estudio de la polimerización de la hemoglobina S, evento fisiopatológico primario de la anemia drepanocítica o de células falciformes, enfermedad que constituye hoy en día un problema social de escala mundial, se ha enfrentado empleando numerosos métodos de investigación [3,4], destacándose entre ellos la RMN debido a su no invasividad y que permite estudiar los sistemas desde el punto de vista molecular. Las posibilidades reales de los métodos de Resonancia Magnética para el estudio del mundo biológico han permitido un auge en su aplicación al estudio de proteínas, en particular la hemoglobina y el proceso de polimerización de la hemoglobina S [5,6,7].

En RMN, se define el *tiempo de relajación longitudinal o espín-red*  $T_1$  como el tiempo característico asociado a la evolución temporal hacia la condición de equilibrio de la componente de la magnetización paralela al eje de cuantización impuesto por campo

externo  $B_o$ . Bajo ciertas aproximaciones, la inversa del tiempo de relajación espín-red ( $T_1^{-1}$ ) se puede escribir como una combinación lineal de ciertas funciones de la frecuencia de Larmor, conocidas como densidades espectrales, las cuales poseen la información dinámica del sistema estudiado. De esta manera, conociendo la dependencia de  $T_1^{-1}$  en función de la frecuencia, o curva de dispersión, obtenemos información de los procesos dinámicos que intervienen en la relajación del sistema de espines y del rango de frecuencias en el cual son efectivos.

La relaxometría con ciclado de campo (también conocida como *fast field cycling* o *FFC*) nos permite obtener el tiempo de relajación espín-red del sistema de núcleos estudiado (en nuestro caso protones) en función del campo externo aplicado en un amplio rango, típicamente desde algunos kHz hasta decenas de MHz [8]. Sin embargo, existen ciertas limitaciones en cuanto a la utilización de esta técnica para obtener la curva de dispersión  $T_1(\nu_0)$  (donde  $\nu_0$  es la frecuencia de Larmor) cuando las mediciones se llevan a cabo a valores del campo externo que son comparables en magnitud con los campos locales. En este caso, el tiempo medido no es estrictamente el tiempo de relajación longitudinal. Por esta razón, es necesario antes que nada estimar la magnitud de los campos locales del sistema, a los fines de obtener un límite inferior en el rango del campo magnético externo.

Para estimar este límite, se utilizó la técnica de relaxometría en el sistema rotante [9,10]. Esta técnica permite obtener información de las componentes residuales del campo local a lo largo de la dirección impuesta por el campo magnético externo.

En este trabajo se indaga sobre la dinámica molecular del sistema, y posibles cambios de orden en el mismo durante el proceso de desoxigenación. Para ello se realizaron mediciones del tiempo de relajación espín-red de protones en función del tiempo y de campo local en el sistema rotante. Estos experimentos fueron complementados con cromatografía de filtración molecular, filtraciones por centrifugación y espectroscopía de infrarrojo.

Los estudios se concentraron principalmente en Hb A humana como sistema de referencia y para la puesta a punto de los experimentos. A modo de comparación, se trabajó también con muestras de Hb S (Hb mutante) y otras proteínas, como ovoalbúmina y gelatina porcina, durante procesos de desnaturalización.

## 1.1. ¿Que son las proteínas?

Una *proteína* es una macromolécula orgánica, es decir de masa molecular elevada, constituida básicamente por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N); aunque pueden contener también azufre (S) y fósforo (P) y, en menor proporción, hierro (Fe), cobre (Cu), magnesio (Mg), yodo (I), etc. Estos elementos químicos se agrupan para formar unidades estructurales fundamentales constituyentes de la macromolécula llamadas *aminoácidos*. Estos son compuestos relativamente simples, de pequeño peso molecular, constituidos por un átomo de carbono central C, denominado carbono alfa, que portan en éste un grupo amino (NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxilo (COOH), lo cual les da su nombre, además de un átomo de hidrógeno H y un grupo variable denominado grupo de la cadena lateral o radical R (Fig. 1.1). Este les confiere sus características definitorias (determina las propiedades físicas y químicas del aminoácido), y en función de lo cual se clasifican existiendo veinte especies diferentes. En las figuras 1.2 y 1.3 se muestran las estructuras de los 20 aminoácidos divididos según su relación con el agua: hidrofílicos (se atraen con el agua) e hidrofóbicos (se repelen con el agua).

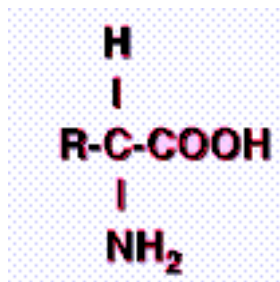


Figura 1.1. Estructura básica de un aminoácido, componente fundamental de una proteína.

Se unen entre sí mediante *enlaces peptídicos*, es decir, un enlace covalente que se establece entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente, dando lugar al desprendimiento de una molécula de agua. Este enlace, denominado también unión amida, pues se forma un grupo amida (Fig. 1.4), es una estructura plana rígida, razón por la cual no existe rotación alrededor del enlace C-N (posee un carácter parcial de doble enlace, pues se comparten dos pares de electrones). En contraste, existe una considerable libertad de rotación alrededor de los enlaces que unen los grupos amidas a los átomos de carbono  $\alpha$  por tratarse de enlaces simples (comparten un par de electrones).

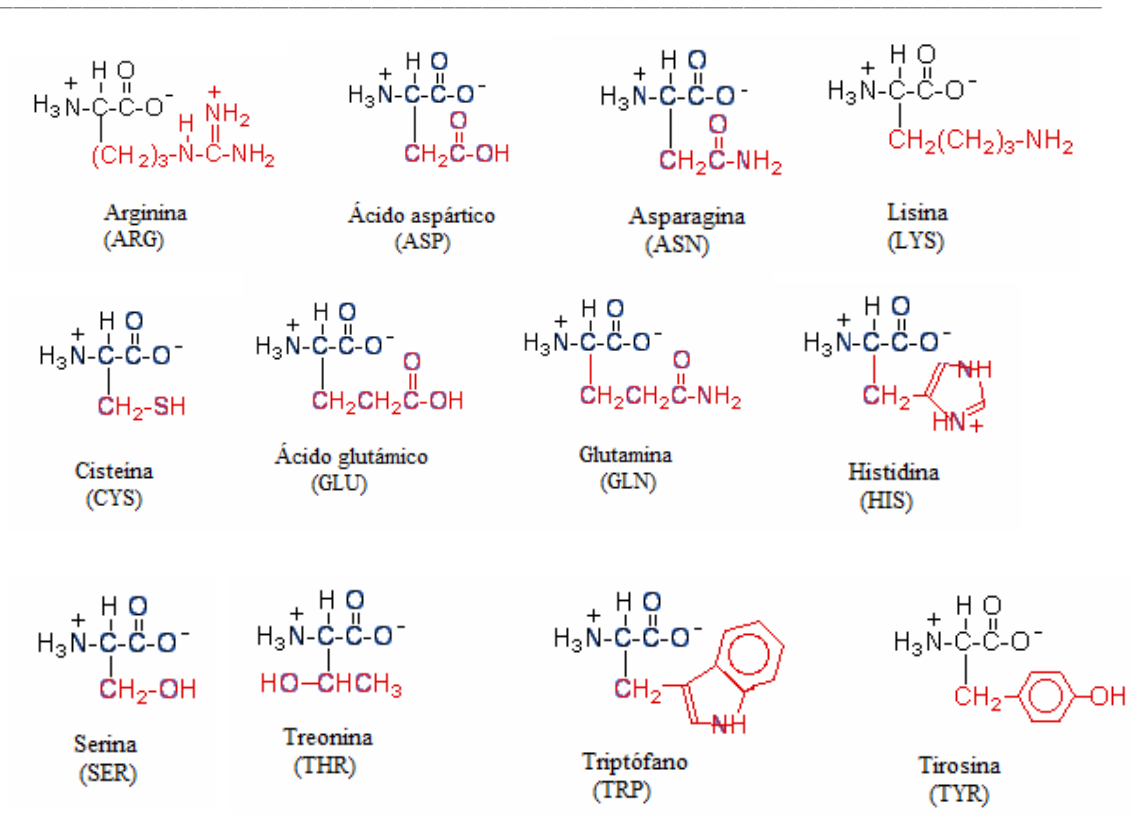


Figura 1.2. Estructura de aminoácidos hidrofílicos. El grupo amino y el grupo carboxilo se muestran ionizados, pues es su forma predominante a pH neutro (pH = 7).

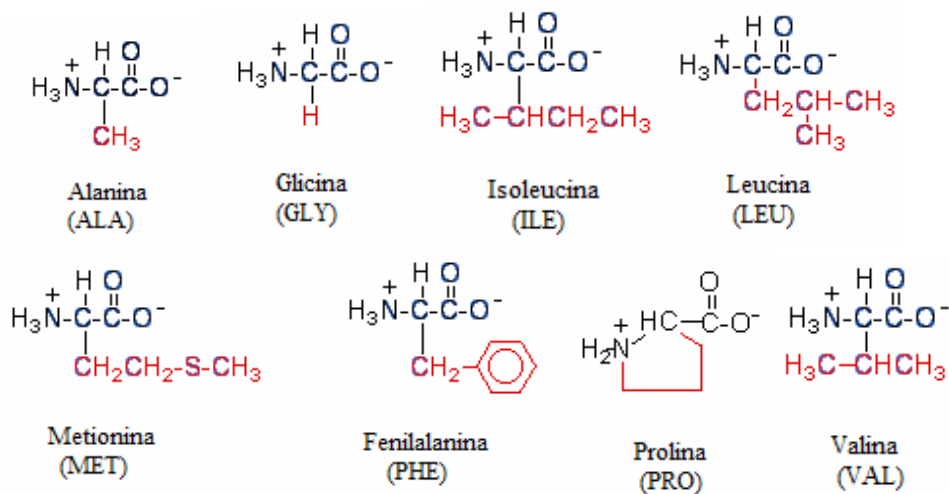


Figura 1.3. Estructura de aminoácidos hidrofóbicos. El grupo amino y el grupo carboxilo se muestran ionizados, pues es su forma predominante a pH neutro (pH = 7).

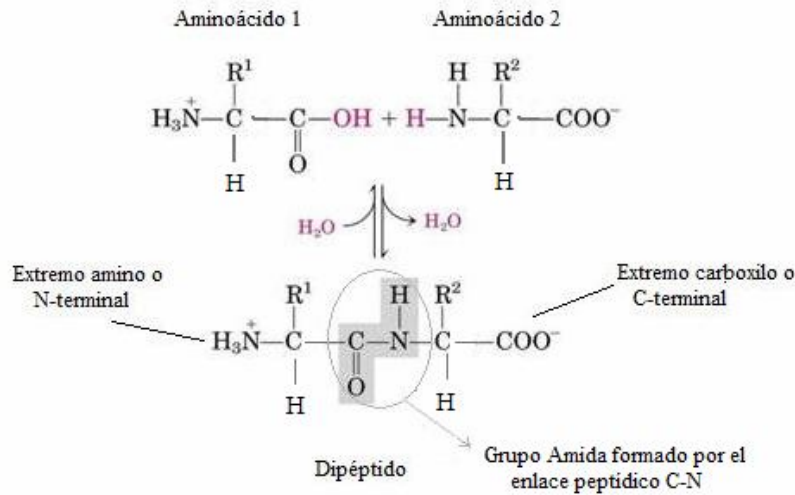


Figura 1.4. Formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos. Las proteínas son largos polímeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se escriben siempre con el extremo N hacia la izquierda.

La unión de un bajo número de aminoácidos da lugar a un péptido. Si este número no es mayor de 10, se denomina oligopéptido, si es superior a 10 se llama polipéptido y si es superior a 50 se habla ya de proteína, por lo cual cientos y miles de estos aminoácidos pueden participar en la formación de la gran molécula polimérica de una proteína.

Luego, podemos decir que una proteína es una cadena polipeptídica que consiste de una parte regularmente repetida, llamada cadena principal o esqueleto polipeptídico, y una parte variable constituida por las cadenas laterales de algunos de los 20 aminoácidos, es decir, las partes de los aminoácidos que no intervienen en la formación del enlace peptídico.

Las proteínas de todo ser vivo están determinadas genéticamente, es decir, codificadas en el material genético de cada organismo, donde se especifica su secuencia de aminoácidos, y luego son sintetizadas por los ribosomas (complejos supramoleculares).

### 1.1.1. Estructura de una proteína

Las proteínas constituyen macromoléculas de enorme importancia biológica pues sus cadenas de aminoácidos se pliegan adquiriendo una estructura tridimensional que les

permite llevar a cabo miles de funciones, lo cual depende principalmente del número, tipo y secuencia de los aminoácidos en la cadena polipeptídica.

La organización de una proteína viene definida por cuatro niveles estructurales interdependientes denominados: estructura primaria, estructura secundaria, estructura terciaria y estructura cuaternaria.

La *estructura primaria* de la proteína es la secuencia de aminoácidos que la conforman, es decir, nos indica que aminoácidos componen la cadena polipeptídica y el orden en que se encuentran. La disposición de los aminoácidos en un orden adecuado determina la estructura molecular específica de la proteína para realizar la función apropiada y, un cambio o disposición errónea de un solo aminoácido en la estructura primaria de la proteína puede producir una alteración radical en la función vital dando origen a las enfermedades hereditarias. Por lo tanto, la estructura primaria no solo es importante por su papel en la función celular, si no que es una traducción lineal de la secuencia de los nucleótidos del ADN, lo que proporciona información acerca de la contribución genética (normal o errada) para la síntesis de proteínas.

Sin embargo, la secuencia no es todo. Para cumplir alguna función, las proteínas tienen una estructura tridimensional, que se forma mediante el plegamiento del polímero lineal de aminoácidos. La *estructura secundaria* está determinada por la disposición espacial de las cadenas polipeptídicas, las cuales no se disponen en línea recta si no que adoptan un plegamiento gracias a la formación de enlaces de hidrógeno (enlaces no covalentes, que se forman cuando un átomo de hidrógeno queda “encerrado” entre dos átomos que atraen electrones, generalmente O ó N) y otras fuerzas débiles entre los átomos que forman el enlace peptídico, es decir, entre los grupos N-H y C-O del esqueleto polipeptídico. Las estructuras secundarias más comunes son: *α-hélice* (la estructura primaria se enrolla helicoidalmente sobre si misma) y *β-lámina* (los aminoácidos se disponen en una cadena en forma de zigzag o lámina plegada).

La *estructura terciaria* está determinada por la disposición espacial de la cadena de aminoácidos ya plegada, es decir, considera cualquier otro tipo de pliegue o curvatura de la cadena (además de las *α-hélice* ó *β-lámina*) originando una conformación globular. Este nuevo plegamiento se produce por la unión de nuevos segmentos de la cadena mediante enlaces débiles como puentes de H, fuerzas electrostáticas y fuerzas de Van der Waals. Esta conformación es tal que las porciones hidrofóbicas quedan en la zona interna y las

hidrofílicas en el exterior, lo que facilita la solubilidad en agua y con ello que la proteína realice la función correspondiente.

Finalmente, las proteínas no se componen, en su mayoría, de una única cadena de aminoácidos, sino que comúnmente se agrupan varias cadenas polipeptídicas mediante enlaces débiles no covalentes. A este tipo de uniones y arreglo espacial de varias cadenas se le llama *estructura cuaternaria* de las proteínas. En la figura 1.5 se muestra un diagrama resumiendo los cuatro niveles estructurales en una proteína.

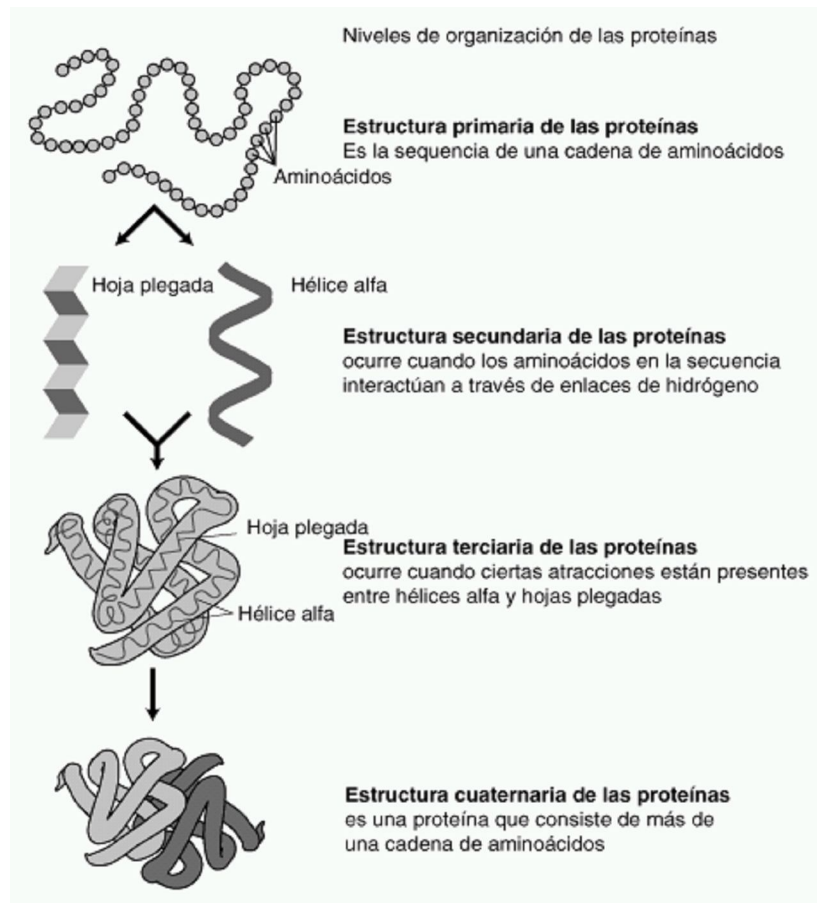


Figura 1.5. Niveles estructurales de una proteína.

## 1.1.2. Clasificación de las proteínas

Según su forma, las proteínas se clasifican en:

- *Fibrosas*: presentan cadenas polipeptídicas largas, pues carecen de estructura terciaria y son insolubles en agua y en soluciones acuosas.



- *Globulares*: se caracterizan por doblar sus cadenas en una forma esférica apretada o compacta dejando grupos hidrófobos hacia adentro de la proteína y grupos hidrófilos hacia afuera, lo que produce que sean solubles en solventes polares como el agua.
- *Mixtas*: poseen una parte fibrilar (en el centro de la proteína) y otra parte globular (en los extremos).

Según su composición química, se clasifican en:

- *Simples u holoproteínas*: formadas solamente por aminoácidos (fibrosas y globulares).
- *Conjugadas o heteroproteínas*: formadas por una fracción proteica (aminoácidos) y por un grupo no proteico, que se denomina “grupo prostético” (sólo globulares).

### 1.1.3. Especificidad de una proteína

La especificidad se refiere a la función de una proteína. Cada una lleva a cabo una determinada función, y lo realiza porque posee una determinada estructura primaria y una conformación espacial propia. Por ello, un cambio en la estructura de la proteína puede significar la pérdida de su función. Prácticamente todas las funciones biológicas desempeñadas en todos los organismos vivos dependen de la presencia y/o actividad de las proteínas.

De la enorme cantidad de funciones realizadas por ellas, se destacan las siguientes:

- *Estructural*: forman parte de membranas (glucoproteínas) y tejidos (colágeno y elastina), etc.
- *Enzimática*: actúan como biocatalizadores de las reacciones químicas en las células para que ocurran en tasas significativas (glucosidasas, lipasas, etc).
- *Hormonal*: regulan actividades celulares (insulina, hormona del crecimiento, etc).
- *Defensiva*: se encargan de acciones de defensa natural contra infecciones o agentes extraños (anticuerpos).
- *Transporte*: transportan diferentes sustancias dentro de las células o de una célula a otra (hemoglobina, hemocianina, etc).
- *Reserva*: se depositan principalmente en la masa muscular y son utilizadas en situaciones de demanda energética del organismo (ovoalbúmina, lactoalbúmina, etc).

## 1.1.4. Desnaturalización de una proteína

La *desnaturalización* es un cambio estructural donde la proteína pierde su estructura nativa, es decir, los enlaces que mantienen unida la cadena proteica en las distintas conformaciones espaciales se rompen y dicha proteína pierde su configuración espacial, y con ella, su función biológica. Ahora bien, esto solo ocurre en la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, nunca en la estructura primaria ya que los enlaces peptídicos, presentes solo en este nivel estructural, son enlaces mucho más estables que el resto y no se ven afectados.

Así, la proteína desnaturalizada no es más que una cadena de aminoácidos sin una estructura tridimensional definida (cadena desplegada) ni estable, perdiendo así su solubilidad y precipitando.

Los factores que provocan la desnaturalización de las proteínas se denominan *agentes desnaturalizantes*, y pueden ser físicos (la temperatura, la presión, etc) o químicos (detergentes, disolventes orgánicos, cambios del pH, etc).

En algunos casos, si las condiciones se restablecen, una proteína desnaturalizada puede volver a su anterior plegamiento o conformación, es decir, se “renaturaliza”.

## 1.1.5. Sistemas proteicos estudiados en este trabajo

### 1.1.5.1. Hemoglobina

La *hemoglobina* (Hb) es una proteína globular de la sangre, que constituye el 90% de la composición de los glóbulos rojos y les otorga su color rojo característico, por lo que se denomina también cromoproteína. Los valores normales en sangre son de 13 – 18 g/ dl en el hombre y 12 – 16 g/dl en la mujer. Su peso molecular es de 65 kD y su forma se asemeja a la de una esfera de aproximadamente 55Å de diámetro. Su función es la de almacenar y transportar por la sangre oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) capturado en los pulmones hacia los tejidos, para que puedan generar la energía necesaria para mantener la vida celular; y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), desecho del proceso de producción de energía, desde los tejidos periféricos hacia los pulmones, para ser eliminado al aire.

Según la clasificación de las proteínas por su composición, la Hb es una *heteroproteína* pues esta conformada por una parte proteica y una no proteica.

La *fracción proteica* esta constituida por cientos de aminoácidos formando las cadenas polipeptídicas llamadas *globinas*. La Hb posee estructura cuaternaria, pues está conformada por cuatro de estas cadenas, semejantes dos a dos, que se mantienen unidas por interacciones no covalentes, y se designan por letras griegas que pueden ser de las siguientes clases: Alfa  $\alpha$ , Beta  $\beta$ , Gamma  $\gamma$ , Delta  $\delta$ , Epsilon  $\epsilon$ , ó Zeta  $\xi$ . Las cadenas polipeptídicas alfa contienen 141 aminoácidos, las no alfa 146 y difieren en la secuencia de aminoácidos. La estructura secundaria de ellas es muy similar: cada una exhibe 8 segmentos helicoidales designados con las letras A a la H. Entre ellos se encuentran 7 segmentos no helicoidales. El tipo de cadenas presentes en la Hb, varía con el desarrollo del organismo, de forma que cambian según se trate de la vida embrionaria, fetal o adulta.

La *parte no proteica* está formada por el *grupo hemo* o *hem* (grupo prostético, es decir, no proteico) y son cuatro, cada uno de ellos unidos a una globina. Este grupo, que consiste en una porción no polipeptídica que forma parte de la proteína en su estado funcional, es una molécula plana que consta de un hierro ferroso (hierro divalente  $Fe^{+2}$ ) tal que es capaz de unirse de forma reversible al oxígeno. Es apolar (no está polarizado), por lo tanto insoluble en agua, lo que genera que vaya “enterrado” entre las estructuras terciarias de las cadenas polipeptídicas. Se forman así uniones hidrofóbicas entre el grupo hemo y la estructura terciaria de las cadenas siendo esos enlaces los que mantienen el grupo hemo en su sitio. En la figura 1.6 se muestra la estructura general de una molécula de Hb, en particular, de Hb A, denominada también hemoglobina normal o del adulto, formada por dos cadenas  $\alpha$  y dos  $\beta$ .

Es importante destacar que por la importancia de la función de la Hb, pequeñas mutaciones en su estructura (como es el caso de la Hb S) puedan generar anemias y otras patologías severas, de lo que se hablará un poco en el capítulo 2.

### **1.1.5.2. Ovoalbúmina**

La *ovoalbúmina* es la principal proteína de la clara del huevo de aves (60-65% de su composición proteica), rica en aminoácidos esenciales. Es una holoproteína globular,

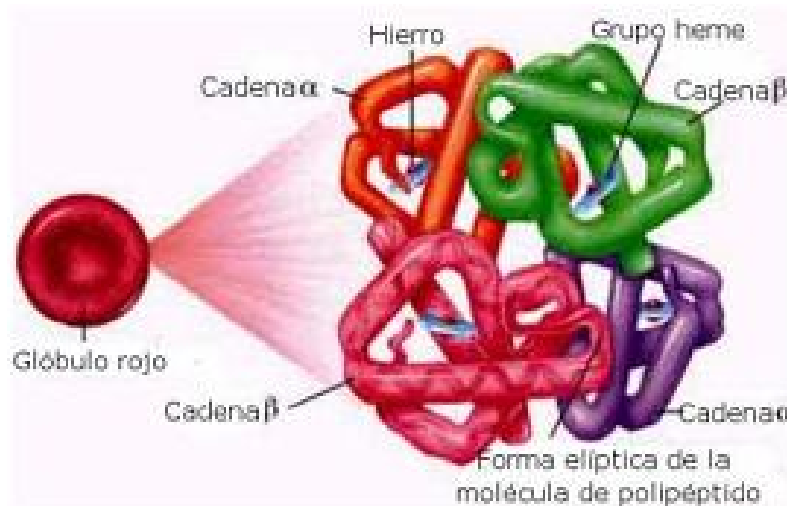


Figura 1.6. Estructura general de una molécula de hemoglobina A, Hb normal o del adulto.

de peso molecular de 45 kD (45.000 u.m.a) y consiste de una sola cadena polipeptídica formada por 385 aminoácidos (no posee estructura cuaternaria). Pertenece a la superfamilia proteínica de las *serpinas*, constituida de un grupo numeroso de proteínas con estructuras similares identificadas inicialmente como capaces de inhibir otras enzimas del grupo de las proteasas (enzimas que degradan las proteínas). Aunque, a diferencia de la mayoría de las serpinas, la ovoalbúmina no es capaz de inhibir cualquier proteasa sino que su función principal es la de reserva.

Al calentar o batir la clara de huevo los enlaces que mantienen plegada la ovoalbúmina se rompen, por lo que pierde su forma de proteína globular, es decir, la proteína se desnatura. La cadena peptídica de cada molécula se desenrolla y forman enlaces entre ellas (gracias a los grupos hidrofóbicos que antes estaban encerrados en el interior de la molécula), con lo que pasa de un estado líquido y semitransparente al blanco y sólido (gel con gran retención de agua) característico de un huevo cocido. Además del cambio físico también se produce un cambio funcional, puesto que pierde las características propias de la proteína.

### 1.1.5.3. Gelatina

La *gelatina* es una sustancia incolora, translúcida, y casi insípida de origen animal formada por proteínas (84-90%), sales minerales (1-2%) y agua (el resto). Se obtiene a partir de la hidrólisis parcial irreversible del colágeno (proteína estructural) procedente de

pieles, huesos y otros tejidos animales mediante tratamiento con álcalis o con ácidos como catalizadores. El colágeno, es una holoproteína fibrosa (insoluble en agua), y está formada por tres cadenas polipeptídicas, enrolladas en forma de hélice y estabilizadas por uniones intramoleculares. La conversión del colágeno insoluble a la gelatina soluble constituye la transformación esencial de su elaboración industrial. Por esto se dice que la gelatina proviene de la solubilización del colágeno. El proceso puede llevar a diferentes gelatinas dependiendo de las rupturas en las uniones intramoleculares.

Aunque contiene un alto contenido de proteína su valor nutritivo es incompleto al ser deficiente en ciertos aminoácidos esenciales. Aporta concretamente los aminoácidos glicina y prolina, que permiten mejorar la construcción de las estructuras de nuestro organismo, fundamentalmente huesos, cartílagos, tendones y ligamentos.

Una notable propiedad de la gelatina es su comportamiento frente a temperaturas diferentes: se disuelve con el agua caliente y se solidifica (formando un gel) nuevamente y se hincha con el agua fría. El estado de gel es reversible al estado de fluido si se aumenta la temperatura. Nuevamente, esta transformación física (de fluido a gel) corresponde a un proceso de desnaturalización de las proteínas componentes de la gelatina.

## 1.2. Técnica experimental

### 1.2.1. Generalidades de RMN

Muchas han sido las técnicas empleadas durante años para el estudio de sistemas biológicos. Dentro de estas técnicas, la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una de las más poderosas debido a su no invasividad y que permite estudiar los sistemas desde el punto de vista molecular.

La *resonancia magnética* [1,2] es un fenómeno que se encuentra en sistemas magnéticos que poseen momento magnético y momento angular. El término resonancia magnética implica que estamos “en sintonía” con una frecuencia natural del sistema magnético, en este caso la frecuencia de precesión giroscópica o *frecuencia de Larmor* del momento magnético en un campo magnético estático externo.

La aplicación de un campo magnético  $\mathbf{B}$  a un momento magnético asociado a un espín nuclear  $\mathbf{M} = \gamma \hbar \mathbf{I}$ , donde  $\gamma$  es la razón giromagnética del núcleo,  $\hbar$  la constante de

Planck dividida  $2\pi$  e  $\mathbf{I}$  es el operador momento angular, produce una energía de interacción de los núcleos de la forma  $-\mathbf{M}\cdot\mathbf{B}$ . Entonces tenemos el siguiente Hamiltoniano:

$$H = -\mathbf{M}\cdot\mathbf{B} \quad (1.1)$$

Tomando que el campo sea  $B_0$  a lo largo de  $z$ , encontramos que:

$$H = -\gamma\hbar B_0 I_z \quad (1.2)$$

donde  $I_z$  es la componente  $z$  del operador  $\mathbf{I}$ . Los valores de energías permitidos son:

$$E = -\gamma\hbar B_0 m \quad m = I, I-1, \dots, -I \quad (1.3)$$

Uno espera ser capaz de detectar la presencia de tal conjunto de niveles de energía por algunas formas de absorción espectral. Para ello, necesitamos tener una interacción que pueda causar las transiciones entre niveles. Para satisfacer la conservación de la energía, la interacción debe ser dependiente del tiempo y de una frecuencia angular  $\omega$  tal que:

$$\hbar\omega = \Delta E \quad (1.4)$$

donde  $\Delta E$  es la diferencia de energía entre las energías Zeeman inicial y final.

Supóngase ahora un sistema de espines nucleares bajo la acción de un campo magnético estático  $B_0$  dirigido según el eje  $z$  del sistema de laboratorio, y considérese al sistema de espines como un sistema termodinámico en contacto con un reservorio (la red) con un gran número de grados de libertad. La condición de equilibrio está caracterizada por un estado de polarización con una magnetización  $M_0$  alineada a lo largo de la dirección de campo magnético externo.

En un experimento típico de RMN, se conduce energía hacia el sistema de espines en forma de pulsos  $B_1$  de radiofrecuencia (rf) aplicados en direcciones perpendiculares a  $B_0$ , con el objetivo de llevarlo a un estado de no equilibrio con la red. Es decir, se inducen transiciones entre los niveles de energía Zeeman. Al introducir una energía adicional al sistema, aparecen una componente longitudinal y una transversal de la magnetización relativa a  $B_0$ . Para retornar al estado de equilibrio térmico, el sistema de espines necesita disipar este exceso de energía lo que se describe como *relajación*.

Entonces, si se le permite al sistema de espines interactuar entre ellos y entrar en contacto con la red durante un período de evolución, y se observan los resultados de dicha evolución, se comprueba que cumplen con las denominadas *ecuaciones fenomenológicas de Bloch* [11], las cuales describen la evolución temporal de las componentes de la magnetización en el sistema de laboratorio y se expresan en forma vectorial como:

$$\frac{d\vec{M}(t)}{dt} = \gamma \vec{M}(t) \times \vec{B}_0 + \frac{1}{T_1} [M_0 - M_z(t)] \hat{z} - \frac{1}{T_2} \vec{M}_\perp(t) \quad (1.5)$$

donde  $M_z$  y  $M_\perp$  son la componente paralela y la componente vectorial perpendicular a  $B_0$ , respectivamente.

Al resolver estas ecuaciones se obtiene la dependencia temporal de la magnetización en los planos longitudinal y transversal. Estas dependencias tienen forma exponencial, donde la constante de caída es el inverso de los denominados *tiempos de relajación*.

Así, la recuperación de la componente longitudinal ocurre con un tiempo característico denominado *tiempo de relajación longitudinal o espín-red*  $T_1$ , y está determinado por la eficiencia de los mecanismos de relajación espín-red, es decir, mecanismos que involucran una transferencia energética desde el sistema de espines a la red.

Por otro lado, el decaimiento de las componentes transversales, las cuales son proporcionales a la *señal de RMN o FID* (free induction decay), está caracterizado por la constante de tiempo llamada *tiempo de relajación transversal o espín-espín*  $T_2$ , y está determinado por procesos de interacción entre espines.

Luego, puede verse que los experimentos de relajación en RMN tratan con los grados de libertad de los espines nucleares, y proveen información acerca de la red a través de la evolución temporal del sistema de espines. De allí, la importancia de medir tiempos de relajación del sistema de estudio.

### 1.2.2. Medición de $T_1$

Se puede estudiar su evolución temporal,  $T_1(t)$  (en caso en que exista) de la cual se obtiene información de cambios de la eficiencia en los mecanismos de relajación espín-

red, ocasionados por alguna evolución en la estructura o conformación del sistema en estudio. Dos de las secuencias de pulsos más empleadas en la determinación de  $T_1$  son la recuperación de saturación (RS) y la secuencia de recuperación de inversión (RI). La secuencia de RS se basa en dos pulsos de  $\pi/2$  ( $90^\circ$ ), mientras que la RI cuenta con un pulso inicial de  $\pi$  ( $180^\circ$ ) seguido por uno de  $\pi/2$ .

Por otro lado, si se estudia la dependencia del tiempo de relajación espín-red en función de la frecuencia  $\nu_0$ , o curva de dispersión  $T_1(\nu_0)$ , se obtiene información de los procesos dinámicos que intervienen en la relajación del sistema de espines y del rango de frecuencias en el cual son efectivos. Partiendo de la teoría de relajación [2] puede deducirse que la inversa del tiempo de relajación espín-red  $T_1^{-1}$  se puede escribir como una combinación lineal de ciertas funciones de la frecuencia de Larmor, conocidas como densidades espectrales, las cuales poseen la información dinámica del sistema estudiado. Para la obtención de  $T_1(\nu_0)$  en un amplio rango de frecuencias de Larmor  $\nu_0$ , se emplea la relaxometría con ciclado de campo (FFC) [8].

Considerando que en muchos sistemas los campos locales residuales son relevantes en un intervalo de frecuencias de Larmor crucial para la correcta interpretación de la curva de dispersión  $T_1(\nu)$ , es importante determinar, antes que nada, el valor de los mismos, a los fines de obtener un límite inferior en el rango del campo magnético externo a utilizar en los experimentos.

### 1.2.3. Relaxometría en el sistema rotante

La *técnica de relaxometría en el sistema rotante* [9,10] permite obtener información de las componentes residuales del campo local a lo largo de la dirección impuesta por el campo magnético externo. Ésta consiste básicamente en observar el comportamiento de la magnetización (en el sistema rotante, sistema que rota a la frecuencia de Larmor) en función de la intensidad del pulso de lock ( $B_I$ ), luego de un pulso de  $\pi/2$ , para una duración del lock fija. A partir de la curva obtenida  $M(B_I)$  y con un modelo apropiado [3,4], se puede estimar la componente longitudinal de los campos locales de la muestra.



# Capítulo 2

## Propiedades físico-químicas de la hemoglobina

La intención de este capítulo es la revisión de algunas propiedades más específicas de la hemoglobina, dado que es nuestro principal sistema proteico de estudio. Se considerarán los diferentes tipos de hemoglobina con sus principales características, centrándonos en la Hb normal (HbA) con la descripción completa de su estructura y función, considerando en esta última el proceso de oxigenación y desoxigenación.

### 2.1. Tipos de hemoglobina

Las proteínas de todo ser vivo están determinadas genéticamente, por lo cual el tipo de hemoglobina que posee un individuo está codificado en el material genético, donde se especifica la secuencia de aminoácidos. Así, siguiendo esta codificación, las cadenas polipeptídicas o globinas son sintetizadas por los ribosomas (complejos supramoleculares), mientras que el grupo hemo se sintetiza principalmente en la médula ósea y en el hígado.

Dependiendo del tipo de globinas que posea la molécula de Hb, existen más de 600 variantes, de las cuales sólo algunas de ellas son normales mientras que otras, denominadas *hemoglobinas anómalas*, surgen como consecuencia de un defecto de carácter hereditario en la cadena de ADN [12,13]. Esto tiene como consecuencia ya sea, una estructura anormal en una de las cadenas de globina, o la falta de síntesis, total o

parcial, de una cadena completa de globina, pudiendo alterarse la función básica de la molécula con consecuentes síntomas clínicos.

Se considerarán sólo algunas de todas estas variantes de hemoglobina, destacándose las que son de principal interés para este trabajo, Hb A y Hb S.

### 2.1.1. Hemoglobinas normales

Como se mencionó en el capítulo 1, existen varias hemoglobinas normales pues de acuerdo al estado de desarrollo del organismo, vida embrionaria, fetal o adulta, es el tipo de globina que se sintetiza. Los diferentes tipos de cadenas polipeptídicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\epsilon$ ) que dan origen a las distintas hemoglobinas normales en el embrión, el feto y el adulto son muy similares en su estructura secundaria pero no en su estructura primaria, es decir, presentan secuencias de aminoácidos diferentes. Las globinas alfa contienen 141 aminoácidos, y las  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , 146. La secuencia de aminoácidos de las cadenas  $\alpha$  presenta muchas partes idénticas a la de las cadenas  $\beta$ , pero así mismo tienen alrededor de 84 diferencias (Fig. 2.1).

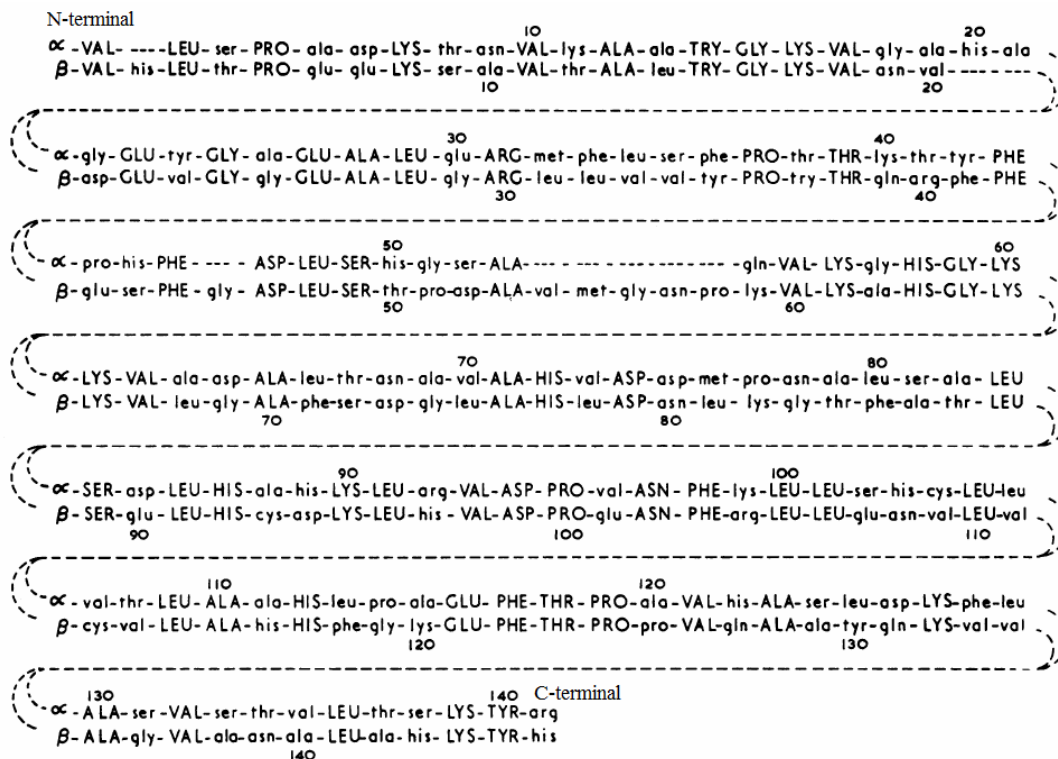


Figura 2.1. Secuencia de aminoácidos de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Los aminoácidos que son idénticos en las dos cadenas son indicados con letras mayúsculas [13].

Mientras que las globinas  $\gamma$  y  $\delta$  sólo difieren en 39 y 10 aminoácidos respectivamente en comparación a las  $\beta$ . Las cadenas  $\zeta$  y  $\varepsilon$  difieren en varios aminoácidos respecto a todas las mencionadas anteriormente [13].

Estas cadenas están compuestas tanto por aminoácidos hidrofílicos como hidrofóbicos, tal que dada la posibilidad entre el agua y un ambiente apolar, estos prefieren claramente el medio apolar. Así, la tendencia de estos aminoácidos a liberarse del agua funciona como la fuerza motriz que lleva al plegamiento de la cadena con su interior hidrófobo. Esto genera una estructura terciaria termodinámicamente más estable.

Así, tenemos las siguientes hemoglobinas normales [12,13]:

- **Hemoglobinas embrionarias:** existen dos tipos, una de ellas se denomina **Hb Gower I** constituida por dos cadenas polipeptídicas zeta ( $\zeta$ ) y dos épsilon ( $\varepsilon$ ), por lo que su estructura es  $\zeta_2\varepsilon_2$ . La otra es la **Hb Gower II** constituida por dos globinas alfa ( $\alpha$ ) y dos globinas épsilon ( $\varepsilon$ ), siendo su estructura  $\alpha_2\varepsilon_2$ .
- **Hemoglobina fetal:** la hemoglobina característica del feto es la **Hemoglobina F (HbF)** formada por dos globinas  $\alpha$  y dos globinas  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ); así mismo puede representar en forma normal entre el 0,8% al 2% de la Hb del adulto. Al final del primer trimestre de embarazo se empiezan a sintetizar en el feto cadenas de tipo  $\gamma$  que remplazan a las subunidades  $\varepsilon$  de la Hb Gower II. Por esto, la HbF tiene la composición  $\alpha_2\gamma_2$ .
- **Hemoglobinas del adulto:** la principal es la **Hemoglobina A (HbA) o hemoglobina A<sub>1</sub> (HbA<sub>1</sub>)**, llamada también hemoglobina del adulto o hemoglobina normal, y representa entre el 95% al 98% de la hemoglobina presente en el adulto. Está formada por dos globinas  $\alpha$  y dos globinas  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ). Cada cadena  $\alpha$  está en contacto con las cadenas  $\beta$ , sin embargo, existen pocas interacciones entre las dos cadenas  $\alpha$  o entre las dos cadenas  $\beta$  entre sí. Las subunidades  $\beta$  comienzan su síntesis en el feto en el tercer trimestre de embarazo y reemplazan a las  $\gamma$  de la Hb F. Otra Hb presente en el adulto es la **Hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>)**, la cual representa entre el 2% al 3% de la hemoglobina normal del adulto, y está formada por dos globinas  $\alpha$  y dos globinas  $\delta$  ( $\alpha_2\delta_2$ ).

En la figura 2.2 se resume la composición porcentual de cada uno de los tipos de hemoglobina normal según el estado de desarrollo del organismo humano.

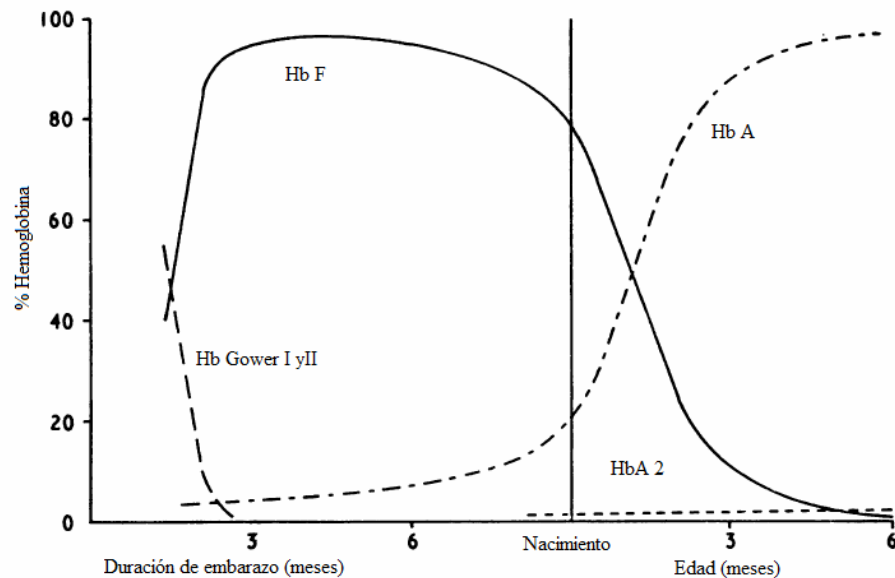


Figura 2.2. Composición porcentual de los distintos tipos de Hb normal según el estado de desarrollo del organismo humano [13].

### 2.1.1.1. Transporte de oxígeno: grupo prostético Hemo

Como ya se ha mencionado, la función de la hemoglobina es la de almacenar y transportar por la sangre oxígeno molecular ( $O_2$ ), el cual es capturado en los pulmones y transportado hacia los tejidos para que puedan generar la energía necesaria para mantener la vida celular.

La hemoglobina que se encuentra unida al oxígeno ( $HbO_2$ ) se denomina **Oxihemoglobina**, dando el aspecto rojo o escarlata intenso característico de la sangre arterial. Se sabe que por cada litro de sangre hay 150 gramos de Hb, y que cada gramo de Hb disuelve 1.34 ml de  $O_2$ . Por lo tanto, en total se transportan 200 ml de  $O_2$  por litro de sangre. Esto es, 87 veces más de lo que el plasma sanguíneo solo podría transportar. Sin un transportador de  $O_2$  como la Hb, la sangre tendría que circular 87 veces más rápido para satisfacer las necesidades corporales.

Cuando la Hb libera el oxígeno a los tejidos, se denomina **hemoglobina reducida** o **desoxihemoglobina**, y presenta el color rojo oscuro o bordó de la sangre venosa. Por lo tanto, podemos decir que la capacidad de la Hb de ligar oxígeno es importante, ya que el color de la misma depende de que la proteína esté oxigenada o no, como muestra la figura 2.3.

La capacidad de la hemoglobina para enlazar oxígeno depende de la presencia de la unidad no polipeptídica denominada **grupo Hemo**.

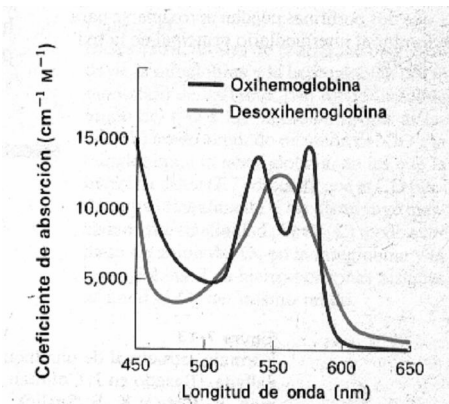


Figura 2.3. Coeficiente de absorción en función de la longitud de onda para Hb oxigenada y desoxigenada [14].

Las cuatro cadenas polipeptídicas de la Hb contienen cada una un grupo Hemo, siendo éste el responsable del color rojo característico de la Hb, y consecuentemente el de los hematíes. Este grupo es una molécula plana que consta de una parte orgánica y un átomo de hierro. La parte orgánica se denomina *protoporfirina IX* (Fig. 2.4) y el átomo de hierro se encuentra en estado de oxidación ferroso (+2) pudiendo formar hasta 6 enlaces. Cuatro de estos enlaces se producen con los nitrógenos en el centro del anillo de la protoporfirina, quedando el Fe situado en el centro de esta molécula en un plano horizontal (Fig. 2.5).

El quinto enlace se realiza con el nitrógeno de un aminoácido histidina (His F8) de la cadena de globina correspondiente denominada *histidina proximal* (Fig. 2.6). Como consecuencia de este enlace, el átomo de hierro queda aproximadamente 0,75 Å fuera del plano del hemo en el lado de la histidina F8, es decir, el enlace se encuentra en un plano perpendicular al plano del anillo de la protoporfirina.

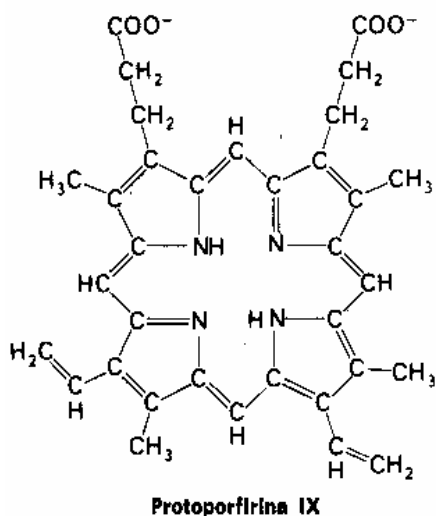


Figura 2.4. Estructura de la molécula orgánica Protoporfirina IX [14].

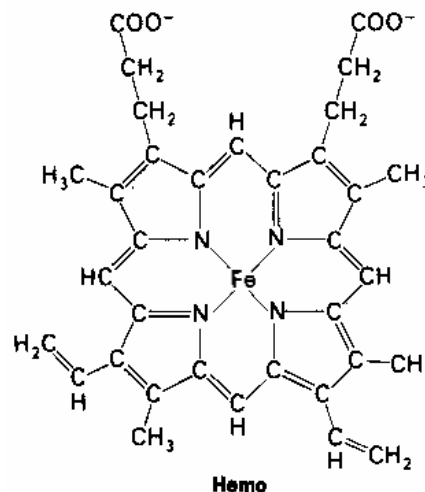


Figura 2.5. Estructura del grupo Hemo [14].

Finalmente, el sexto enlace del átomo ferroso, el cual también se encuentra en un plano perpendicular al plano del hemo, es con el  $O_2$ . El eje de la molécula de  $O_2$  enlazada forma un ángulo con el enlace hierro-oxígeno de 121 grados (Fig. 2.6). Este enlace queda próximo a un segundo aminoácido de histidina (His E7) denominada *histidina distal*, la cual no está ligada al hemo, si no que su presencia es para cumplir varias funciones, entre ellas, debilitar la mayor afinidad natural del hemo por el monóxido de carbono, favoreciendo la unión del oxígeno.

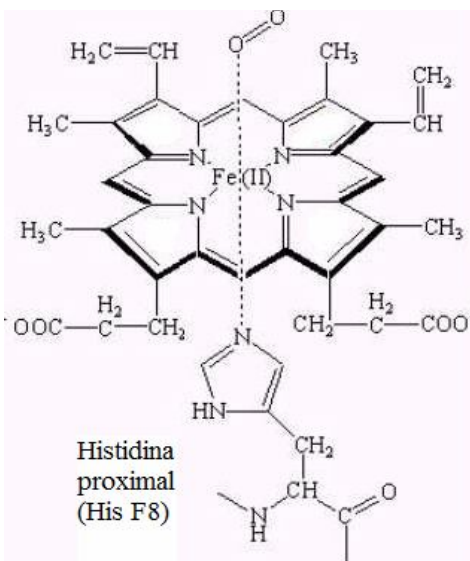


Figura 2.6. Grupo Hemo enlazado al  $O_2$  y a la cadena polipeptídica a través de la His F8 [12].

El grupo hemo es básicamente apolar (insoluble en agua) con un pequeño extremo polar que está cargado a pH fisiológico. Esto lleva a que se sitúe dentro de una “bolsa” hidrofóbica que se forma en cada una de las cadenas polipeptídicas, en la cual está rodeado de aminoácidos apolares (excepto las His F8 y E7) con los que forma alrededor de 80 uniones hidrofóbicas.

Considerando que el enlace del  $O_2$  a la Hb solo involucra al grupo hemo, surge la pregunta: ¿Por qué se necesita la porción polipeptídica de la molécula de Hb para el transporte del oxígeno? La respuesta procede de la consideración de las propiedades del enlace al oxígeno de un grupo hemo aislado. En el agua, un grupo hemo ferroso aislado puede unirse al oxígeno, pero lo hace durante un tiempo muy corto. La razón es que en el agua el hemo ferroso es oxidado muy rápidamente a hemo férrico que ya no puede unirse al oxígeno. Así, en la molécula de Hb el entorno poco accesible del hemo, es decir, el estar contenido en un entorno hidrófobo que excluye al agua permite la oxigenación reversible [14]. Entre los aminoácidos que participan en la creación de este microambiente apolar se encuentra principalmente la histidina distal. Luego, podemos decir que la función de este grupo prostético depende parcialmente de su entorno polipeptídico.

#### **2.1.1.2. Cooperatividad en la unión del oxígeno a la hemoglobina**

Se define la función de saturación,  $Y$ , como la fracción de ocupación de los centros de unión del oxígeno. El valor de  $Y$  puede oscilar desde cero (todos los centros vacíos) hasta 1 (todos los centros ocupados). Una representación gráfica de  $Y$  frente a  $pO_2$ , la presión parcial de oxígeno, se denomina *curva de disociación del oxígeno*. La curva de disociación de la hemoglobina es sigmoidea (Fig. 2.7), lo que indica que la afinidad de la Hb por el  $O_2$  no es la misma en todo el rango de  $pO_2$  [14]. Se puede ver que para  $pO_2$  bajas, la afinidad es baja, y cuando la  $pO_2$  se eleva, la afinidad es mayor. La parte superior de la curva, casi plana, ayuda a la difusión del  $O_2$  a través de la barrera hemato-gaseosa en los pulmones y de esta manera, aumenta la carga de  $O_2$  por la sangre. Una ventaja adicional de esta zona de la curva es que las pequeñas disminuciones de la  $pO_2$  del gas alveolar apenas afectan el contenido de  $O_2$  de la sangre arterial y en consecuencia, la cantidad de  $O_2$  disponible para los tejidos. La parte inferior más empinada, significa que

los tejidos periféricos pueden extraer gran cantidad de  $O_2$  con sólo una pequeña disminución de la  $pO_2$  tisular.

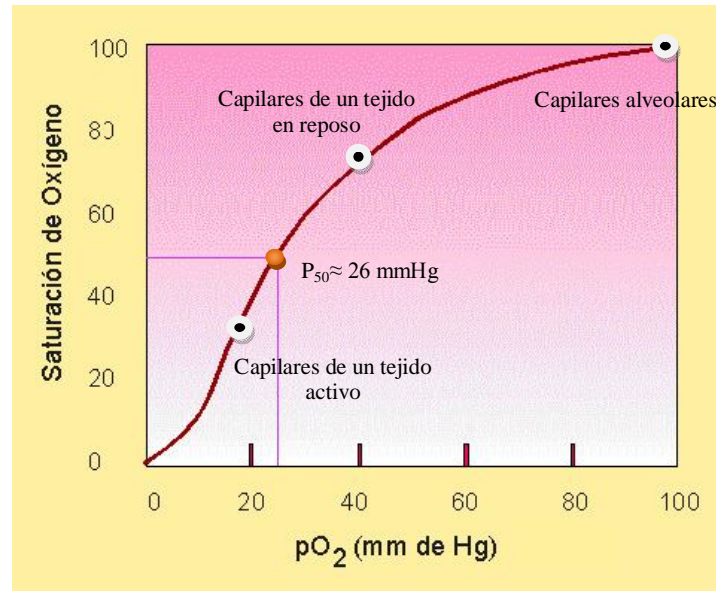


Figura 2.7. Curva de disociación del oxígeno de la hemoglobina. Los valores típicos para  $pO_2$  en los capilares de un tejido activo y en reposo, y en los alveolos pulmonares aparecen marcados en el gráfico.  $P_{50}$  representa la presión parcial de oxígeno a la cual se encuentran ocupados el 50% de los centros de unión [12].

Entonces, las propiedades ideales de la Hb como transportador de  $O_2$  se basan en que su afinidad aumenta cuando tiene que tomar  $O_2$ , como ocurre al pasar por los pulmones, y que ésta disminuye cuando tiene que cederlo, como cuando circula por los tejidos. De esta forma, la Hb está saturada 98% en los pulmones y sólo 33% en los tejidos en actividad, de manera que cede casi 70% de todo el  $O_2$  que puede transportar.

Así como la afinidad de la Hb no es la misma en todo el rango de  $pO_2$ , los cuatro sitios de la Hb que se pueden unir con  $O_2$  no tienen la misma afinidad con dicho gas. Esto se debe a un fenómeno, conocido con el nombre de *cooperatividad* [14], el cual indica que cada grupo hemo no actúa en forma independiente. Cuando el  $O_2$  ocupa el primer sitio, aumenta la afinidad de los otros en forma sucesiva, esto es, la unión del oxígeno a un grupo hemo facilita la unión del oxígeno a los otros tres grupos. Además, la liberación de  $O_2$  de un grupo hemo facilita la liberación de oxígeno de los demás. En otras palabras, existe una comunicación entre los grupos hemo de una molécula de hemoglobina.



La unión cooperativa del oxígeno a la hemoglobina hace que ésta sea un transportador de oxígeno más eficiente. La saturación de oxígeno de la hemoglobina cambia más rápidamente con los cambios en la presión parcial de oxígeno de cómo lo haría si los centros de unión al oxígeno fueran independientes unos de otros. Esto le permite liberar dos veces más oxígeno de cómo lo haría si sus centros fueran independientes.

### 2.1.1.3. Factores que influyen en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno

La capacidad de la hemoglobina para enlazar oxígeno se ve afectada profundamente por moléculas específicas de su entorno, a saber,  $H^+$ ,  $CO_2$  y compuestos orgánicos fosforilados [14]. Es decir, estas moléculas perturban la afinidad de la Hb por el oxígeno, uniéndose a diferentes partes de la proteína alejadas de los grupos hemo.

Estas moléculas reguladoras pueden causar dos efectos sobre la curva de disociación de oxígeno de la Hb dependiendo de sus concentraciones, a saber: un desplazamiento de la curva a la derecha o un desplazamiento de la curva a la izquierda. El primer efecto significa que la afinidad de la Hb por el  $O_2$  ha disminuido y, en consecuencia, la Hb cede más  $O_2$ . En el segundo caso, la afinidad ha aumentado, ya que a una misma  $pO_2$  la saturación de la Hb es mayor y por lo tanto en ésta situación se libera menos  $O_2$ .

Así, la afinidad de la Hb por el  $O_2$  está influenciada por:

- ✓ La concentración de iones de hidrógeno ( $H^+$ ), que determinan el pH;
- ✓ La presión parcial de  $CO_2$ ;
- ✓ La presencia de compuestos orgánicos con fósforo como el DPG (2,3-difosfoglicerato).

En un tejido metabólicamente activo, se produce mucho  $CO_2$  y ácido libre (gran concentración de iones de hidrógeno, lo que equivale a una disminución del pH). La presencia de niveles elevados de  $CO_2$  y  $H^+$  en los capilares de los tejidos activos desplaza la curva de disociación hacia la derecha, es decir, favorece la liberación del  $O_2$  de la oxihemoglobina, con la consiguiente unión del  $CO_2$  (formando carbaminohemoglobina  $HbCO_2$ ) y  $H^+$  a la proteína.

Recíprocamente, en los capilares de los alveolos pulmonares la elevada concentración de  $O_2$  y bajas concentraciones de  $CO_2$  y  $H^+$  desplazan la curva de

disociación hacia la izquierda, promoviendo la liberación de los  $H^+$  y el  $CO_2$  de la desoxihemoglobina, con la consiguiente unión del oxígeno a la proteína. Así, las relaciones entre la unión del  $O_2$ , de  $H^+$  y de  $CO_2$  se conocen como *efecto Bohr* [14].

Por último, el compuesto orgánico DPG puede unirse a la hemoglobina alterando su afinidad por el oxígeno. Es un anión que se encuentra en alta concentración en los eritrocitos y altera la afinidad de la Hb por el  $O_2$  por medio de unirse a las cadenas beta de la desoxihemoglobina, pero no a las de la oxihemoglobina, y por medio de disminuir el pH intracelular, ya que presenta 5 grupos ácidos. En su ausencia la Hb desprendería muy poco oxígeno al pasar a través de los capilares de los tejidos. Luego, un aumento en la concentración de DPG desplaza la curva de disociación de la Hb a la derecha, haciendo que se libere más  $O_2$ .

#### **2.1.1.4. Mecanismo de la unión cooperativa del oxígeno: cambios estructurales en la hemoglobina con la oxigenación**

La hemoglobina presenta dos estructuras estables y distintas: oxihemoglobina y desoxihemoglobina. Se ha demostrado que la oxi y desoxihemoglobina difieren claramente en su estructura terciaria y cuaternaria, no así en su estructura secundaria [14-19].

En la desoxihemoglobina, el átomo de hierro está unos 0,75 Å fuera del plano del hemo debido a la repulsión estérica entre la histidina proximal y los átomos de nitrógeno de la porfirina. El primer  $O_2$  que se une a la Hb, lo hace en una cadena alfa, porque en las cadenas beta, el lugar de ingreso del oxígeno se encuentra obstruido por una valina (Val E11); al entrar este oxígeno el átomo de hierro se introduce en el plano de la porfirina de modo que pueda formar un enlace fuerte con el  $O_2$ . Así, la histidina proximal, que está directamente unida al hemo, es arrastrada por el átomo de hierro en su desplazamiento, generándose un cambio en la estructura terciaria de la cadena correspondiente. Luego, este cambio estructural dentro de una subunidad se traduce en cambios estructurales en la interfase entre las subunidades.

Estudios termodinámicos y estructurales [17] han mostrado que el tetrámero Hb es fundamentalmente un sistema de dímeros interactuantes, designados por  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_2$ , en el cual básicamente tres pares de contactos entre subunidades son alterados con la

oxigenación, a saber:  $\alpha_1\beta_2$ ,  $\alpha_2\beta_1$  y  $\alpha_1\alpha_2$ . Asimismo, los principales cambios se producen en los contactos entre las cadenas alfa y beta, los cuales están estrechamente conectados a los grupos hemo. Entonces, el cambio en la estructura terciaria de la primera cadena alfa ligada provoca un cambio conformacional en las cadena restantes y se producen rupturas de gran parte de puentes o enlaces salinos (interacciones electrostáticas no covalentes) entre las cuatro subunidades de la Hb. Esto hace que la fijación subsiguiente sea facilitada porque se requiere romper un número menor de enlaces salinos; así también se produce un giro de un par alfa-beta respecto al otro par alfa-beta en 15 grados incrementado la afinidad de los hemo restantes por el oxígeno. Lo anterior refleja el mecanismo de *cooperatividad* de la Hb, es decir, el fenómeno por el cual la entrada de un  $O_2$  ayuda a la entrada de los siguientes. Así, la unión de la cuarta molécula de  $O_2$  es más fácil que la primera.

Finalmente se puede decir que la desoxihemoglobina es una molécula tensa, más contraída que la oxihemoglobina a causa de los enlaces salinos antes mencionados. Por esta razón la estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina se denomina forma *T* (tensa) (Fig. 2.8) y la estructura de la oxihemoglobina, forma *R* (relajada) (Fig. 2.9).

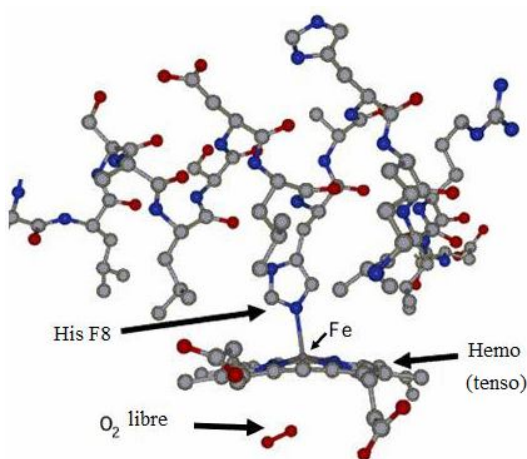


Figura 2.8. Estructura de una de las cadenas de la desoxihemoglobina: estructura *T* [12].

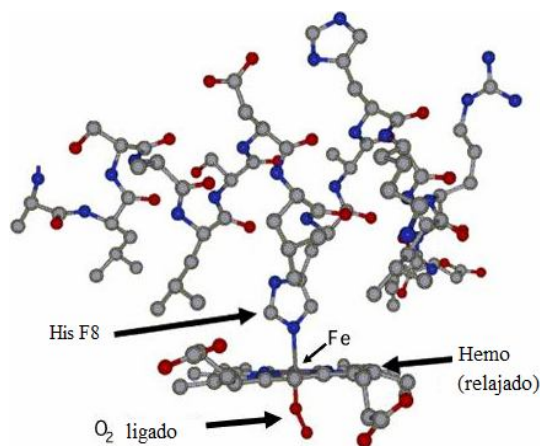


Figura 2.9. Estructura de una de las cadenas de la oxihemoglobina: estructura *R* [12].

Casi todas las moléculas de desoxihemoglobina están en la forma *T*. La unión de sucesivas moléculas de  $O_2$  hace a la forma *R* cada vez más probable. Así pues, la primera molécula de  $O_2$  se une a la forma *T*, mientras que la cuarta molécula se une a la forma *R*. La forma *T* tiene una afinidad por el  $O_2$  300 veces menor que la forma *R*, porque el

desplazamiento de la histidina proximal hacia el plano del hemo está más dificultado en la forma T por la presencia de enlaces salinos.

Ahora se puede entender que los factores que disminuyen la afinidad de la Hb por el oxígeno ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}^+$  y DPG) lo hacen estabilizando la forma T por medio de crear enlaces salinos adicionales.

A pesar de que el proceso de transformación de las estructuras  $\text{T} \rightarrow \text{R}$  ha sido explicado a través de la sucesiva ruptura de enlaces salinos, también ha sido planteado como un proceso que involucra la *dimerización de la Hb* [18,20,21]. Lo mismo se ha esbozado para la transformación  $\text{T} \leftarrow \text{R}$ .

Por otro lado, mientras algunos autores han asociado a la transición de desoxihemoglobina a oxihemoglobina una menor superficie de exposición por parte de la proteína al solvente y vice versa [22], otros plantean todo lo contrario [23].

### 2.1.2. Hemoglobinas anómalas

Se denomina *hemoglobinopatía* a cierto tipo de defecto de carácter hereditario, que tiene como consecuencia una estructura anormal en una de las globinas de la molécula de hemoglobina. Sin embargo, suele reservarse el término hemoglobinopatía para las anomalías de la Hb producidas por el simple cambio de un aminoácido en una de las cadenas de globina debido a una mutación puntual, es decir, la sustitución de un nucleótido de ADN por otro, lo que modifica el código genético y puede inducir un cambio en un aminoácido de la globina resultante. Por otro lado, el término *talasemias* se reserva para las hemoglobinopatías debidas a la falta de síntesis, total o parcial, de una cadena completa de globina.

En la actualidad se conocen más de 600 hemoglobinopatías, aunque no todas producen problemas clínicos. Las hemoglobinopatías por afectación de la cadena beta son algo más frecuentes que las de la alfa.

Las principales hemoglobinopatías pueden clasificarse de la siguiente manera [12, 13]:

- 1) *Hemoglobinopatías estructurales*: consisten en Hb con alteraciones en la secuencia de aminoácidos que causan alteraciones de la función o de las propiedades físicas o químicas de la misma. Entre ellas se destacan:

• **Hemoglobinopatía S:** es debida a la presencia de la hemoglobina S (Hb S) resultado de una mutación genética de la Hb normal. Es la variante de la hemoglobina más común clínicamente y la más estudiada [3,4,5,6,7].

La modificación genética en la Hb S es debido a la alteración del gen que codifica a la cadena  $\beta$  de la hemoglobina. De las cuatro cadenas polipeptídicas que forman la hemoglobina (dos alfa y dos beta), las alfa son idénticas a las de la hemoglobina normal (hemoglobina A), pero existe una alteración en las cadenas beta. Éstas tienen en el puesto número 6 un aminoácido valina en el lugar que normalmente ocupa un ácido glutámico ( $\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$ ). El intercambio es consecuencia de una mutación puntual en la mencionada posición 6. Como el aminoácido valina es apolar, aparece un “parche” hidrófobo en la superficie de la molécula, mientras que el ácido glutámico es polar. Esta alteración reduce marcadamente la solubilidad de la hemoglobina S desoxigenada, pero tiene poco efecto sobre la solubilidad de la Hb S oxigenada. La menor solubilidad de la forma reducida de esta hemoglobina da lugar a la formación [3]de una red gelatinosa de polímeros fibrosos, es decir, genera la *polimerización* de la hemoglobina S, así las moléculas de esta proteína se unen entre sí por medio de una reacción química formando macromoléculas en forma de cadenas. Este proceso es debido a que en la hemoglobina S desoxigenada los parches hidrófobos se pegan unos a otros por su tendencia a excluir el agua, haciendo que la hemoglobina polimerice.

La formación de estas largas cadenas dentro de los glóbulos rojos los endurece y deforma, haciendo que estos tomen una estructura rígida y en forma de hoz o media luna (figura 2.10), tal que atraviesan vasos finos con dificultad o no las atraviesan en absoluto (figura 2.11) generando una interrupción de la circulación de la sangre que puede dañar los órganos de cualquier parte del cuerpo.

Por otro lado, el componente hemo de la hemoglobina tiende a liberarse de la proteína debido a episodios repetidos de la polimerización de la hemoglobina S. Algunos de estos grupos hemo libres tienden a alojarse en la membrana de los hematíes, donde el hierro de este grupo



Figura 2.10. Glóbulos rojos normales (redondos) y falciformes (en forma de media luna).

promueve la formación de componentes muy peligrosos llamados especies reactivas de oxígeno. Estas moléculas dañan los componentes lipídicos y proteicos de la membrana de los glóbulos rojos, produciendo su destrucción (hemólisis). Sumando a esto el corto tiempo de vida de estos hematíes falciformes (10 a 20 días en el torrente sanguíneo, glóbulos normales 120 días), la sangre tiene insuficiencia permanente de glóbulos rojos (anemia).

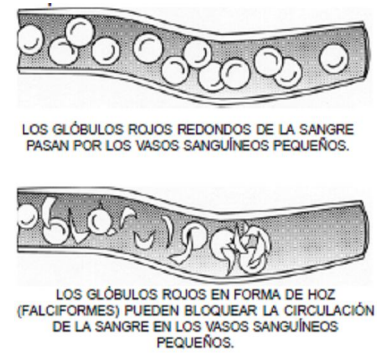


Figura 2.11.

La polimerización de la Hb S desoxigenada que trae como consecuencia hematíes falciformes y anemia permanente, da lugar a una enfermedad hereditaria que puede ser muy grave, la *anemia drepanocítica o anemia de células falciformes*, nombre motivado en que los eritrocitos tienen forma de hoz o media luna (drepanocitos). Afecta predominantemente a la población afroamericana y amerindia.

- **Hemoglobinopatía C:** es debida a la presencia de la hemoglobina C (Hb C) resultado de una mutación genética de la Hb normal, la cual se caracteriza por la sustitución del ácido glutámico de la posición 6 de la cadena beta por lisina ( $\beta^6 \text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$ ). Es una hemoglobinopatía propia del África Occidental, característica de la raza negra. El estado homocigoto (CC), es decir, ambas cadenas betas son anormales, se produce una ligera anemia hemolítica crónica con esplenomegalia (agrandamiento patológico del bazo más allá de sus dimensiones normales).

- **Hemoglobinopatía M:** también llamada *metahemoglobinemia*, es debida a la presencia de la hemoglobina M (Hb M) resultado de una mutación genética de la Hb normal. En esta hemoglobinopatía la capacidad de transportar oxígeno se ve deteriorada debido a la propiedad de la Hb M de oxidarse formando metahemoglobina inusualmente estable. La metahemoglobina (ferrihemoglobina) es un derivado de la hemoglobina en la cual el hierro ferroso se oxida a su forma férrica. La metahemoglobina forma parte de la hemoglobina "inactiva" pues es incapaz de combinarse de modo reversible con el oxígeno.

Existen varios tipos de Hb M y son una consecuencia de diferentes sustituciones en aminoácidos que estabilizan al Fe en el estado férrico (por ejemplo: Hb M<sub>Iwata</sub>, la mutación es  $\alpha 87 \text{ His} \rightarrow \text{Tyr}$ ), o por mutaciones que disminuyen o producen deficiencia de las enzimas (metahemoglobina reductasa) que reducen la metahemoglobina a Hb por medio de mantener el hierro como Fe(II). Esto genera cianosis (color azulado de la piel debido a la falta de oxígeno) en el individuo que la porta.

2) Talasemias: los dos tipos principales de talasemia se denominan talasemia alfa y talasemia beta. Los individuos afectados por el primer tipo no producen suficiente cantidad de globina alfa y los afectados por el segundo, de globina beta. A su vez, cada uno de estos tipos de talasemia puede adoptar formas diferentes, con síntomas que van de leves a severos. Tanto la alfa como la beta talasemia ocasionan disminución de la Hb dentro del eritrocito, lo que da lugar a una disminución del color (hipocromia) y del tamaño (microcítica) del hematíe. Otras talasemias descriptas son la delta y la gamma, de escasa frecuencia.

3) Persistencia hereditaria de la Hb fetal: consiste en la persistencia en adultos de concentraciones altas de HbF, así mismo, no son detectables efectos nocivos ni anemia. Esto se debe a una mutación que afecta el mecanismo que activa la producción de cadenas beta y disminuye la producción de cadenas gamas.

4) Hemoglobinopatías adquiridas: consiste en la aparición de Hb anormales por causas externas al individuo. Algunas de ellas son:

- **Metahemoglobinemia adquirida**: se debe a la exposición a toxinas, en particular los compuestos que tienen nitratos y nitritos, que oxidan el Fe del hemo formando ferrihemoglobina.

- **Carboxihemoglobina**: es la hemoglobina resultante de la unión con el CO (HbCO). Es letal en grandes concentraciones (40%) pues interfiere con la función de transporte de O<sub>2</sub> de la sangre por combinación con la Hb para formar carboxihemoglobina. El CO presenta una afinidad 200 veces mayor que el oxígeno por la Hb desplazándolo a éste fácilmente. La mayor afinidad significa que las

personas expuestas en forma inadvertida a pequeñas concentraciones de CO en el aire, como por ejemplo, durante un incendio, pueden tener una gran proporción de su Hb como HbCO y por lo tanto no disponible para transporte de O<sub>2</sub>, produciendo hipoxia tisular.



# Capítulo 3

## Experimental

En este capítulo se presenta la forma en que se prepararon las muestras de hemoglobina, se describen la secuencia de pulsos utilizada en las mediciones del tiempo de relajación espín-red de protones ( $T_1$ ) en función del tiempo y la técnica de relajación en el sistema rotante que se utilizó para la medición de campos locales. Además, se describen brevemente los experimentos complementarios realizados, a saber: cromatografía de filtración molecular, filtraciones por centrifugación y espectroscopía de infrarrojo. Finalmente, se muestran los resultados obtenidos.

### 3.1. Preparación de solución de hemoglobina

Una vez que se posee la muestra de sangre en un tubo con anticoagulante, el procedimiento que se sigue para extraer la solución de Hemoglobina (Hb) es la siguiente:

1. Se vierten de 5 a 10 ml de sangre en un tubo de ensayo y se centrifuga a razón de 2500 r.p.m. durante 10 minutos para separar el plasma sanguíneo y el paquete de glóbulos.
2. Se extrae el plasma usando la técnica convencional de aspiración con una pipeta.

3. Se completa el volumen inicial con Solución Buffer Fosfato Salino frío (PBS) a pH 7.4 y se agita cuidadosamente para no romper las células. El buffer puede prepararse con agua deuterada ( $D_2O$ ) si se deseara relevar protones del soluto.
4. Se centrifuga la muestra con los mismos parámetros de centrifugación que el paso 1, los cuales se mantienen idénticos para el resto del procedimiento.
5. Se extrae el sobrenadante de forma similar al paso 2.
6. Se repiten los pasos 3 - 5 por tres veces consecutivas de forma tal que queden bien lavados los glóbulos. Al término del último enjuague, el sobrenadante debe quedar bien claro. Si no ocurre es porque hubo hemólisis. En tal caso se lava de nuevo.
7. Posteriormente la muestra resultante es congelada para provocar la hemólisis de las células.
8. Finalmente la muestra es descongelada y centrifugada con los mismos parámetros del paso 1 para separar la solución de Hb (parte superior del tubo) y los restos de membrana (fondo del tubo).
9. Se toma el volumen necesario de hemoglobina para el experimento de la parte superior del tubo de ensayo, lo cual se coloca en un tubo limpio con su extremo superior tapado con cinta de teflón o parafilm.

Luego del paso número nueve la muestra de hemoglobina queda lista para ser utilizada en el experimento. Durante el procedimiento de preparación, se utiliza guardapolvo, guantes de látex, barbijo y anteojos protectores y se trabaja a temperatura ambiente.

## 3.2. Técnicas experimentales

### 3.2.1. Medición de $T_1$

Dos de las secuencias de pulsos más empleadas en la determinación de  $T_1$  es la *recuperación de saturación* (RS) y la secuencia de *recuperación por inversión* (RI). La secuencia de RS consiste en dos pulsos de  $\pi/2$  ( $90^\circ$ ), mientras que la RI consiste en un pulso inicial de  $\pi$  ( $180^\circ$ ) seguido por uno de  $90^\circ$ . Debido a que la secuencia usada en este trabajo es la RI, solo ésta se describirá más detalladamente.

La muestra es colocada en un campo magnético externo  $B_0$ , cuya dirección definimos con el eje  $z$  positivo en el sistema de laboratorio. Después de un tiempo del

orden o superior a  $3T_1$ , tenemos una magnetización macroscópica  $M_0$  paralela a  $B_0$  (Fig. 3.1-a). Luego se aplica un pulso  $B_1$  de radiofrecuencia (RF) de  $\pi$  en la dirección  $x$  en el sistema rotante, es decir, un sistema de referencia que rota a la frecuencia de Larmor. Cuando la RF es aplicada exactamente en resonancia, la magnetización en el sistema rotante sólo experimenta al campo  $B_1$ . En este sistema, el pulso genera un torque sobre la magnetización (Fig. 3.1-b) y la rota hacia el eje  $z$  negativo (Fig. 3.1-c), es decir, este pulso de radiofrecuencia tiene la amplitud y duración correspondientes para que tenga el efecto de rotar la magnetización en  $180^\circ$  respecto a su dirección original. Inmediatamente después, en el sistema de laboratorio la magnetización queda fija a lo largo de la dirección  $-z$ .

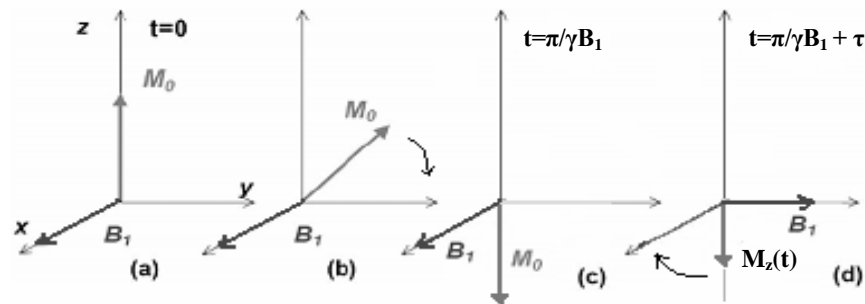


Figura 3.1. Comportamiento de la magnetización en el sistema rotante bajo la aplicación de la secuencia RI en resonancia.

Posteriormente, se deja evolucionar la magnetización por un tiempo  $\tau$  y luego se aplica el segundo pulso de radiofrecuencia según la dirección  $y$  positiva que rota la magnetización en  $90^\circ$  (Fig. 3.1-d), dejándola en el plano  $x$ - $y$ . La medición se realiza cuando se corta el pulso de  $\pi/2$  y se monitorea la FID resultante como se muestra en la figura 3.2.

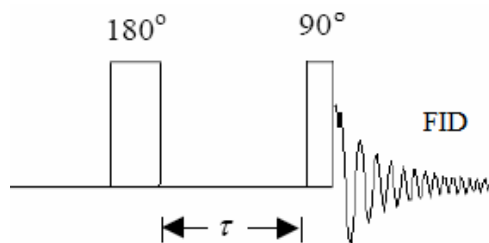


Figura 3.2. Serie de pulsos en la secuencia Recuperación por Inversión.

A fines de obtener el valor del tiempo de relajación espín-red  $T_1$  asociado a la evolución de  $M_z(t)$ , se aplica la secuencia RI varias veces cambiando el valor de  $\tau$  cada vez y se mide la intensidad de la señal de RMN en cada caso, la cual es representativa de la componente  $M_z$ . Así, se obtienen pares de puntos  $(\tau, M_z)$ . Luego, de las ecuaciones de Bloch (ecuación 1.5) se puede ver que  $M_z(\tau)$  cumple la siguiente expresión:

$$M_z(\tau) = M_0 (1 - 2e^{-\tau/T_1}) \quad (3.1)$$

donde  $\tau$  es el tiempo de demora entre ambos pulsos. Finalmente, si se ajustan los pares medidos a la ecuación 3.1, se obtiene el valor de  $T_1$ .

### 3.2.2. Relaxometría en el sistema rotante: medición de campos locales

La técnica de relaxometría en el sistema rotante permite obtener información sobre la magnitud de los campos locales residuales en materiales con algún grado de organización molecular a lo largo de la dirección impuesta por el campo magnético externo [9,10]. Entendemos por *campo local residual* al valor correspondiente del campo en la posición de un espín nuclear dado, debido a las contribuciones no promediadas (debido a la presencia de la dinámica molecular) de todos los demás espines de la muestra. El campo local es, en cierto punto, un parámetro asociado con el orden y la dinámica efectiva del sistema molecular a una dada temperatura.

Esta técnica consiste en el estudio del comportamiento de la señal de RMN en función de la intensidad del *pulso de lock* ( $B_{lock}$ ), luego de un pulso de  $\pi/2$ , para una duración del lock fija. A partir de la curva obtenida  $Señal(B_{lock})$  y con un modelo apropiado [9,10], se puede estimar la componente longitudinal de los campos locales de la muestra. Se pueden distinguir dos casos.

#### 3.2.2.1. Caso 1: Campos locales despreciables frente a $B_1$

La técnica se asienta básicamente en el denominado *spin lock* (o anclaje de espín). La muestra se coloca en un campo magnético externo  $B_0$ , formando en condiciones de equilibrio una magnetización macroscópica  $M_0$  paralela a  $B_0$  (Fig. 3.3-a). Luego se aplica

un pulso  $B_1$  de  $\pi/2$  en la dirección  $x$  en el sistema rotante, el cual rota la magnetización al plano  $x$ - $y$  (Fig. 3.3-b). Inmediatamente después del pulso, en el sistema de laboratorio la magnetización precesa en este plano, mientras que en el sistema rotante está fija a lo largo de la dirección  $y$  (Fig. 3.3-c). Si la amplitud de  $B_1$  es reducida y su fase cambiada en  $90^\circ$  (pulso de lock), el campo  $B_1$  rotará y permanecerá a lo largo de la magnetización en el sistema rotante (Fig. 3.3-d).

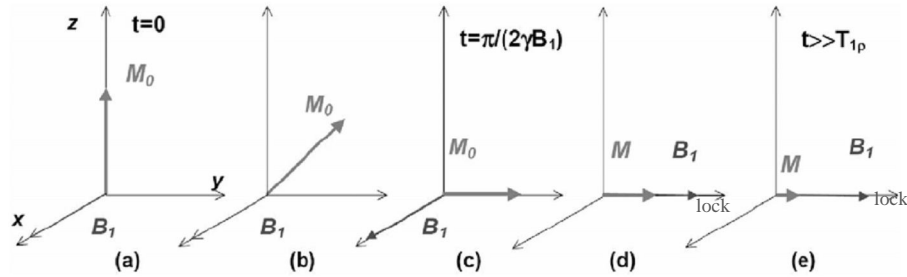


Figura 3.3. Comportamiento de la magnetización en el sistema rotante durante un experimento de *spin lock*. Este es el caso en que el campo de RF se aplica en resonancia, y los campos locales son despreciables frente a la intensidad de  $B_1$ .

Bajo la condición de resonancia, la magnetización en el sistema rotante sólo experimenta al campo  $B_{1lock}$ . Por lo tanto, el campo  $B_{1lock}$  en el sistema rotante ahora sería el análogo al campo  $B_0$  en el sistema de laboratorio, y la magnetización se dice que está anclada al campo  $B_{1lock}$ . Luego, relaja a un valor de equilibrio con una constante  $T_{1p}$  (tiempo de relajación espín-red en el sistema rotante) (Fig. 3.3-e). La medición se realiza cuando se corta el pulso de *lock* y se monitorea la FID resultante como se muestra en la figura 3.4. A fines de obtener información de la dispersión de la magnetización, se mide la intensidad de la señal de RMN en función de la amplitud del campo  $B_{1lock}$  a un tiempo fijo de *lock*  $\tau_{lock}$ .

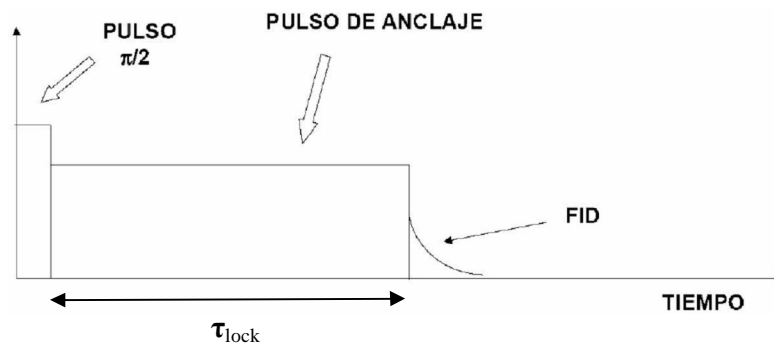


Figura 3.4. Secuencia de pulsos para un experimento de *spin lock*.

### 3.2.2.2. Caso 2: Campos locales del mismo orden de magnitud que $B_1$

En el caso de que exista una componente  $z$  de los campos locales comparable en intensidad a  $B_1$ , la situación es diferente. Los primeros pasos del experimento hasta que se apaga el pulso de RF resonante de  $\pi/2$  son exactamente los mismos al caso anterior (Fig. 3.3-a,b,c), pues la amplitud de este campo es mucho más grande que la de los campos locales. Sin embargo, a diferencia del caso 1, cuando se aplica el pulso de lock  $B_{lock}$ , cuya amplitud podría ser comparable a la de los campos locales, la magnetización precesará alrededor del campo efectivo  $B_{ef}$ , el cual es la suma de  $B_{lock}$  y  $B_{Lz}$  (componente del campo local en la dirección  $z$ ), en el caso de que estemos en resonancia (Fig. 3.5). Por lo tanto, luego de un tiempo  $T_{2pef}$  (tiempo de relajación asociado a la pérdida de coherencia de los espines precesando en torno a  $B_{ef}$ ) tendremos una magnetización paralela a  $B_{ef}$  y ésta relajará con una constante de tiempo  $T_{1pef}$  (tiempo de relajación asociado a la componente de la magnetización paralela a la dirección impuesta por  $B_{ef}$ ). Notar que a medida que  $B_1$  tiende a cero, el campo efectivo se aproxima al campo local y la magnitud de la componente de la magnetización proyectada en el plano  $(x, y)$  tiende a cero.

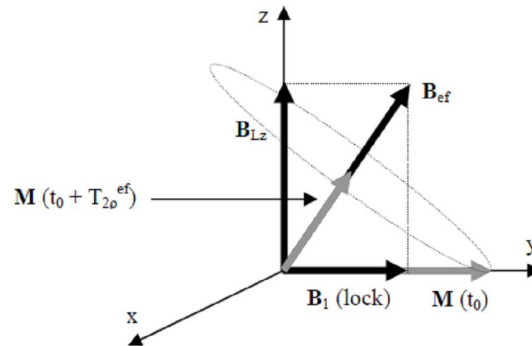


Figura 3.5. Comportamiento de la magnetización durante la aplicación del pulso de lock en resonancia, y cuando los campos locales son del mismo orden de magnitud que  $B_{lock}$ . El tiempo  $t_0$  corresponde al momento en que se apaga el pulso resonante de  $\pi/2$  y se enciende el campo de lock.

En el caso en el cual el campo local tiene una componente en el plano  $(x,y)$  el único cambio respecto al análisis previo es que el campo efectivo no estará contenido en el plano  $(y,z)$ .

Por otro lado, la situación descrita es idéntica al caso en el cual se reemplaza el campo local por una componente de campo según el eje  $z$  proveniente de una cantidad

fuera de resonancia [9,10]. En una muestra líquida isótropa (la cual posee un campo local residual despreciable debido a la promediación impuesta por la dinámica molecular) y bajo la condición de resonancia, la magnetización en el plano, que es proporcional a la intensidad de la señal de RMN detectada, no tiene dispersión o dependencia con la amplitud del campo  $B_1$  a un tiempo fijo de *lock*  $\tau_{lock}$ .

Considerando un modelo apropiado, se comprueba que la evolución de la magnetización en el sistema rotante después de un anclaje de espín en resonancia y en presencia de campos locales es [9,10]:

$$M(B_1) = \frac{M_0}{1 + \left(\frac{B_{Lz}}{B_1}\right)^2} \exp \left[ \frac{-\tau_{lock}}{B_1^2 + B_{Lz}^2} \left[ \frac{B_1^2}{T_b} + \frac{B_{Lz}^2}{T_D \exp\left(\left(\frac{B_1}{B_{Lz}}\right)^2\right)} \right] \right] \quad (3.2)$$

donde  $B_1$  es la amplitud del campo de lock,  $M_0$  es el valor de equilibrio de la magnetización antes del *lock*,  $B_{Lz}$  es la magnitud de la componente  $z$  de los campos locales,  $\tau_{lock}$  es la duración del pulso de *lock*,  $T_D$  es el tiempo de relajación dipolar y  $T_b$  es el tiempo de relajación espín-red a lo largo de la dirección de *lock* para valores grandes de  $B_1$ . Para hacer el análisis, se consideran como parámetros desconocidos al tiempo de relajación dipolar  $T_D$  y la magnitud de los campos locales  $B_{Lz}$  (valor que se desea conocer) y se ajustan los pares de puntos  $(B_1, M)$  medidos a la ecuación (3.2). Por lo tanto es necesario, como mínimo, tener una estimación del valor de  $T_b$ . Cuando no se conoce su valor numérico, generalmente se tiene en cuenta que para valores de la intensidad del campo de RF que superan varias veces la de los campos locales se cumple  $T_b \approx T_{1\rho}$ , y por otro lado se cumple  $T_b < T_1$ .

El valor de  $B_{Lz}$  obtenido debe considerarse como la proyección sobre el eje  $z$ , promediada espacialmente en toda la muestra y temporalmente por el efecto de la dinámica molecular involucrada.

### 3.2.3. Relaxometría en el sistema rotante: medición de campos locales en soluciones acuosas de Hemoglobina

En una solución acuosa de Hb podemos encontrar, al menos, tres poblaciones de protones ( $^1\text{H}$ ) que contribuyen de forma significativa a la relajación: los  $^1\text{H}$  de la estructura macromolecular (M), los de las moléculas de agua ligada a la proteína,  $\text{H}_2\text{O}^{\text{B}}$ , y los de las moléculas de agua libre,  $\text{H}_2\text{O}^{\text{F}}$  [7,24,25]. Los tiempos de relajación de los  $^1\text{H}$  en la estructura de las proteínas son del orden de los microsegundos, mucho menores que en los demás estados (B y F), y que los tiempos muertos de la mayoría de los equipos usados para medir relajación. Por ello, en general, en soluciones acuosas de Hb, la contribución predominante a la relajación magnética protónica es atribuida a los  $^1\text{H}$  del  $\text{H}_2\text{O}^{\text{B}}$  y el  $\text{H}_2\text{O}^{\text{F}}$  [7,26].

En condiciones de pH, concentración, y temperatura fisiológicas se establece un intercambio rápido de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  entre los estados B y F, tal que el tiempo medio de residencia  $\tau_B$  de una molécula de agua en el estado ligado es mucho más grande que el tiempo de correlación rotacional de la macromolécula (la molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  permanece enlazada a la Hb el tiempo suficiente para que el movimiento de rotación molecular de la proteína influya significativamente en la relajación protónica) y mucho más chico que los tiempos de relajación. Así, el  $T_1$  medido se expresa de la siguiente forma [7,24,25,26]:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{P_B}{T_{1B} + \tau_B} + \frac{P_F}{T_{1F}} \quad (3.3)$$

donde  $P_B$  y  $P_F$  son las fracciones de  $\text{H}_2\text{O}^{\text{B}}$  y  $\text{H}_2\text{O}^{\text{F}}$  respectivamente, y  $T_{1B}$  y  $T_{1F}$  son los tiempos de relajación correspondientes a cada población protónica. Esto significa que, durante la relajación, una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  se intercambia entre los estados B y F un número suficiente de veces tal que el  $T_1$  medido es el promedio sopesado de la relajación en ambas fases. Esta expresión tiene en cuenta los casos de soluciones diluidas y concentradas de la proteína.

Ahora bien, la señal de RMN proveniente de una solución acuosa de Hb será una superposición de las señales provenientes de los protones de las tres poblaciones antedichas, pero como la procedente de  $^1\text{H}$  en  $\text{H}_2\text{O}^{\text{F}}$  es la señal más intensa (representa la mayoría de los protones presentes en la solución) y más larga temporalmente ( $T_{2F} \gg T_{2B}$ )



“oculta” las señales correspondientes a protones de agua ligada y propios de la proteína. Esto, sumado al hecho que una muestra líquida isotrópica como el agua libre en resonancia no presenta dispersión con la amplitud de un pulso de lock [9,10], lleva a la necesidad de tener que modificar la secuencia de lock descripta para medir campos locales de forma tal que nos permita analizar la dispersión de la señal oculta que se mencionó anteriormente.

Basándonos en el hecho de que los  $^1\text{H}$  de las tres poblaciones distintas presentes en la solución de Hb tienen valores de  $T_1$  diferentes, es posible suprimir durante la medición la señal proveniente de los protones del agua libre por medio de agregar un pulso de  $\pi$  antes de la secuencia de lock (Fig. 3.6).

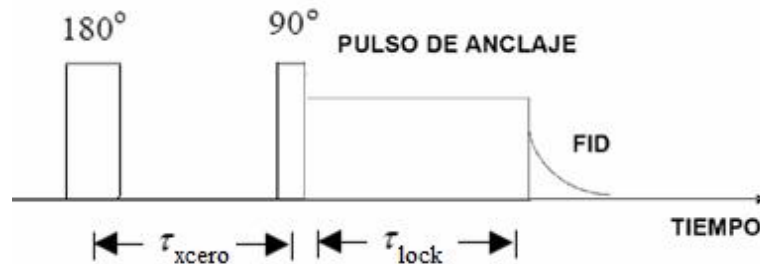


Figura 3.6. Secuencia de pulsos para un experimento de *spin lock* con supresión de la señal de protones de moléculas de agua libre.

Con este pulso adicional de  $180^\circ$  se combina la secuencia RI con la de anclaje. Según la ecuación 3.1, existe un valor para el tiempo de separación entre los pulsos de  $180^\circ$  y  $90^\circ$ , denominado  $\tau_{xcero}$ , para el cual la magnetización se anula, y está dado por:

$$\tau_{xcero} = T_1 \ln(2) \quad (3.4)$$

Ajustando  $\tau_{xcero} = T_{1F} \ln(2)$ , se logra aplicar el anclaje en el momento en el cual la componente de la magnetización asociada a los protones de agua libre pasa por cero, suprimiendo dicha componente en la magnetización anclada. Es decir, solamente se realiza el anclaje de la magnetización asociada a protones del agua ligada y propios de la Hb, y con ello se analiza su posible dispersión.

### 3.2.4. Cromatografía de filtración molecular

La cromatografía en general es una técnica muy empleada en soluciones de proteínas para la separación de las mismas según su tamaño, forma, carga, carácter hidrófobo y afinidad por otras moléculas. En particular, la *cromatografía de filtración molecular* separa a las proteínas de acuerdo con su tamaño. Consiste en una columna cilíndrica cuyas paredes interiores están formadas por cuentas porosas. La solución de proteína se coloca en la parte superior de la columna y luego se bombea una gran cantidad de solvente a través de ella. Así, las moléculas proteicas que son lo suficientemente pequeñas como para entrar en los orificios de las cuentas se desplazan más lentamente a través de la columna, pues quedan retenidas por un tiempo en los poros de las bolitas. Las proteínas de mayor tamaño, que no pueden entrar en los poros de las bolitas son lavadas de la columna en primer lugar.

### 3.2.5. Filtración por centrifugación

Consiste en sembrar o colocar la muestra que se desea estudiar en un tipo de filtro denominado *centricon*, que consiste en un pequeño tubito transparente de diámetro circular, el cual posee a la mitad de su altura un pequeño disco que sólo deja pasar moléculas con peso molecular menor a un determinado valor. Para acelerar esta filtración por tamaño se coloca el centricon con la muestra en una centrifugadora. La cantidad de muestra que no pasa a través del filtro, sino que queda donde se colocó, se denomina *retenido*, mientras que lo que sí es filtrado se llama *eluido*. Esta técnica permite estudiar la existencia de algún proceso de agregación de moléculas.

### 3.2.6. Espectroscopía infrarroja

La espectroscopia infrarroja (espectroscopia IR) es la rama de la espectroscopia que trata con la parte infrarroja del espectro electromagnético. La porción infrarroja del espectro electromagnético se divide en tres regiones; el infrarrojo cercano, medio y lejano, así nombrados por su relación con el espectro visible. El infrarrojo lejano, aproximadamente en el rango de  $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$  ( $1000\text{-}30\text{ }\mu\text{m}$ ) se encuentra adyacente a la

región de microondas, posee una baja energía y puede ser usado en espectroscopia rotacional. El infrarrojo medio, aproximadamente en el rango de  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  ( $30-2,5\text{ }\mu\text{m}$ ) puede ser usado para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional, mientras que el infrarrojo cercano,  $14000-4000\text{ cm}^{-1}$  ( $2,5-0,8\text{ }\mu\text{m}$ ) puede excitar vibraciones armónicas.

La espectroscopia infrarroja se basa en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las cuales rotan y vibran, es decir, los movimientos de rotación y vibración moleculares tienen niveles de energía discretos (modos normales vibracionales).

El espectro de infrarrojo de una muestra es colectado por medio de hacer que un haz de luz infrarroja atraviese la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda. Esto puede lograrse escaneando el espectro con un rayo monocromático, el cual cambia de longitud de onda a través del tiempo, o usando una transformada de Fourier (FTIR) para medir todas las longitudes de onda a la vez. En esta última técnica, el haz de radiación infrarroja, luego de pasar por la muestra, es guiado a través de un interferómetro siendo así la señal medida un patrón de interferencia. Luego, la transformada de Fourier de esta señal resulta en el espectro IR convencional.

Así, el espectro de transmitancia o absorbancia obtenido, el cual muestra a cuales longitudes de onda la muestra absorbe el IR, permite una interpretación de cuales enlaces están presentes, además de revelar detalles de la estructura molecular de la muestra.

Determinados grupos químicos dan bandas de vibración características, independientemente de la molécula a la que pertenezcan. El rango de frecuencias en el que aparecen esas bandas se ve afectado por factores inter e intramoleculares. Entre los factores intramoleculares se encuentra la masa atómica de los grupos adyacentes, el acoplamiento mecánico entre grupos similares, la formación de puentes de hidrógeno, simetría, electronegatividad, etc.

El espectro de infrarrojo de polipéptidos y proteínas contiene diversas bandas de absorción relativamente grandes asociadas con el enlace peptídico, representado por el grupo CONH denominado grupo amida, por lo que las bandas asociadas a los mismos se denominan *bandas amida*. Un grupo CONH plano hipotéticamente aislado posee nueve bandas amida, que se llaman amida A, amida B y amidas I a VII, en orden decreciente de frecuencia. La amida I se produce fundamentalmente por vibraciones de tensión del enlace C=O del enlace peptídico, acopladas con vibraciones de tensión del enlace C-N y

de deformación de C-C-N. Por otro lado, la amida II, se produce por vibraciones de tensión del enlace N-H. La frecuencia de las vibraciones depende de los puentes de H que establezcan los grupos C=O y N-H, y el patrón de puentes de H depende a su vez de la estructura secundaria que adopte la proteína, de ahí la sensibilidad de las bandas amida I y II a cambios en la conformación de las proteínas y péptidos.

Existe otra forma de monitorear cambios en la estructura de una proteína utilizando FTIR. Ella se basa en el hecho de que cuando una proteína está disuelta en agua, el átomo de H unido al N del grupo amida puede intercambiarse con un átomo de H de una molécula de agua, siendo este intercambio inherente a la dinámica del equilibrio químico. Para observar este intercambio, el H<sub>2</sub>O en la cual está disuelta la proteína es reemplazada por D<sub>2</sub>O, llamada comúnmente agua pesada, la cual contiene otro isótopo del átomo de hidrógeno (<sup>2</sup>H). El <sup>2</sup>H posee propiedades químicas idénticas a las del <sup>1</sup>H, pero con aproximadamente el doble de masa. Así, cuando los hidrógenos amidas son reemplazados por los deuterios <sup>2</sup>H, las frecuencias vibracionales de los enlaces involucrados en el grupo amida se ven afectadas, como así también, de manera consecuente, las bandas amidas I y II del espectro de IR de la proteína. Entonces, como la tasa de intercambio depende fuertemente de que la proteína esté plegada o no, debido a la menor o mayor accesibilidad del agua al grupo amida, respectivamente, un estudio sistemático de esta tasa por medio de FTIR, nos da información de cambios en la estructura secundaria de la proteína.

### 3.3. Trabajo experimental

#### 3.3.1. Preparativos y verificaciones

Se describen a continuación algunos preparativos que se realizaron antes de comenzar con los experimentos para medir campos locales y la evolución temporal de T<sub>1</sub>. El equipo de campo fijo utilizado en estos experimentos fue un Bruker Minispec mq-20 (20MHz), para el cual primero se determinó la curva de calibración de la frecuencia asociada al campo de RF ( $f_1 = \omega_1/2\pi = \gamma B_1/2\pi$ ), es decir, se estableció la relación existente entre la atenuación de un pulso de RF y la frecuencia asociada al mismo, lo cual es de vital conocimiento para la aplicación de la secuencia de lock. Por otro lado, se hizo un

análisis de temperatura de la muestra en función de la amplitud del pulso de lock de duración fija, variando el número de mediciones y el tiempo entre cada adquisición, para así evitar que un calentamiento dieléctrico excesivo de la muestra producido por el pulso de lock (principalmente a frecuencias superiores a 20 kHz) pueda llevar a falsas dispersiones.

### 3.3.1.1. Determinación de la curva frecuencia vs. intensidad de un pulso de RF

Para determinar la relación entre la frecuencia ( $f_1$ ) y la intensidad del pulso RF se usó la siguiente relación:

$$\theta_1 = \omega_1 \Delta t = 2\pi f_1 \Delta t \quad (3.5)$$

donde  $\theta_1$  es el ángulo de nutación de la magnetización a causa de  $B_1$ , y  $\Delta t$  es la duración del pulso. Así, de (3.5) se obtiene:

$$f_1 = \theta_1 / 2\pi \Delta t \quad (3.6)$$

Si en particular se considera un pulso de  $90^\circ$  tal que  $\theta_1 = \pi/2$ , nos queda una relación directa entre la frecuencia de nutación y la duración del pulso dada por:

$$f_1 = 1/4\Delta t \quad (3.7)$$

Entonces si se aplica un pulso de una dada intensidad, definido, en nuestro caso, mediante el grado de atenuación (Att) respecto a la máxima potencia disponible, y se busca la duración del mismo tal que resulte en un pulso de  $\pi/2$ , a través de la ecuación 3.7 se puede determinar el valor de frecuencia  $f_1$  asociada.

A fin de determinar la correspondencia entre  $f_1$  y atenuación para varias frecuencias se utilizó una muestra de agua a la cual se le aplicaron pulsos en resonancia con atenuación en el rango de 2 dB hasta 40 dB. Cambiando su duración (en el rango de los  $\mu s$ ) se determinó para cada caso el valor que resultara en un pulso de  $\pi/2$ . La elección de este tiempo se hizo buscando la máxima intensidad de la señal después del pulso en función de la duración, para una intensidad fija del mismo. El error asignado al  $\Delta t$  fue de

0,1  $\mu$ s, lo cual conduce a las bandas de error en los valores de frecuencia que se muestran en el gráfico 3.1. A continuación se muestra la curva de calibración obtenida:

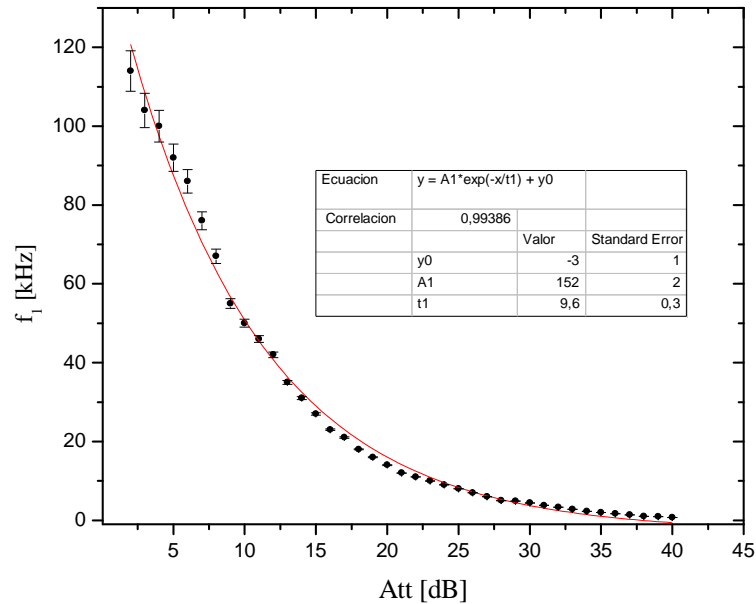


Gráfico 3.1. Curva de calibración de la frecuencia en función de la atenuación de un pulso de RF.

A modo de corroboración de la calibración presentada anteriormente, se aplicó la secuencia de spin-lock a una muestra de agua, tanto en resonancia como fuera de resonancia en una cantidad conocida, y a una muestra de cristal líquido 8CB en fase nemática (posee campo local no nulo) en resonancia, a una temperatura de  $(38,0 \pm 0,3)^\circ\text{C}$ . En ambas muestras la duración del pulso de  $\pi/2$  fue fijada en  $t = 2,7 \mu\text{s}$ . Esta elección se hizo buscando la máxima intensidad de la señal después de un pulso de  $\pi/2$  en función de la duración, para una intensidad fija del mismo. Por otro lado, la duración del pulso de *lock* fue de  $5 \text{ ms}$ . Este tiempo se eligió de forma tal que sea lo suficientemente largo como para lograr el anclaje de la magnetización con el campo de RF y, al mismo tiempo, lo suficientemente corto como para evitar el calentamiento dieléctrico de la muestra.

Para la muestra de agua, la cual fue levemente dopada con una sal paramagnética (sulfato de cobre) para disminuir el  $T_1$  a  $108 \text{ ms}$ , cada adquisición de la señal correspondió a un promedio de 24 mediciones realizadas con ciclado de fase. El tiempo entre cada adquisición fue de  $0,8 \text{ s}$ . La medición de la intensidad de la señal en resonancia fue en el

rango de frecuencias de 1 kHz hasta 42 kHz y para el caso fuera de resonancia en una cantidad de 10kHz fue de 5 kHz a 42 kHz. En el gráfico 3.2 se muestran los resultados y se comparan con los obtenidos por otros autores con otro instrumento [9,10].

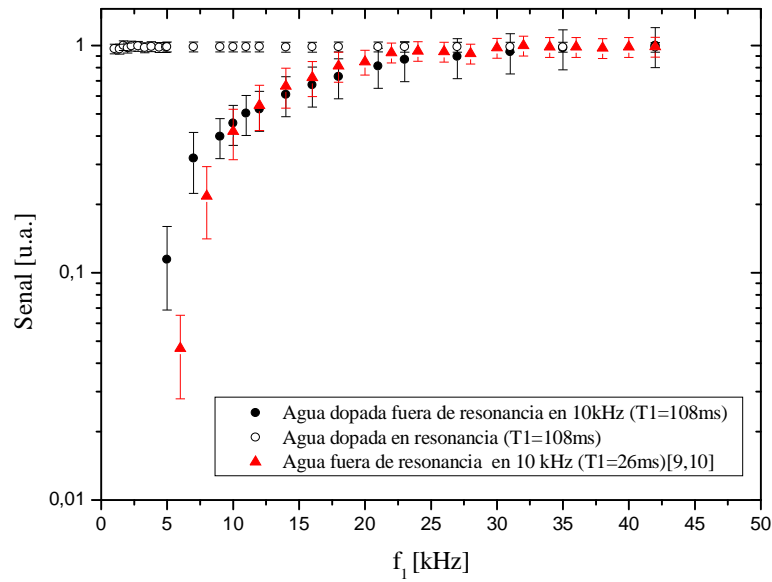


Gráfico 3.2. Intensidad de la señal en función de la frecuencia del pulso de lock para agua dopada con  $T_1=108$  ms, en resonancia y fuera de resonancia en 10kHz a  $T=38^\circ\text{C}$ . A modo de comparación, se muestra la curva de agua fuera de resonancia en 10 kHz con  $T_1=26$  ms [9,10].

Para la muestra 8CB, cada adquisición de la señal correspondió a un promedio de 4 mediciones. El tiempo entre cada adquisición fue de  $1s$ , suficiente para que el sistema alcance el equilibrio nuevamente. El intervalo de frecuencias asociadas al pulso de lock fue de 0,7 kHz hasta 31 kHz. En el gráfico 3.3 se muestran los resultados con la correspondiente curva de ajuste dada por la ecuación 3.2. El valor de  $T_b$  fue considerado igual a  $100$  ms [9,10].

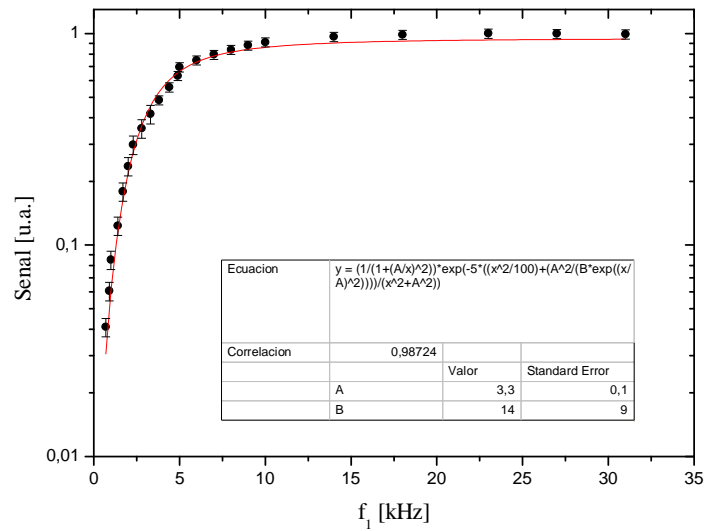


Gráfico 3.3. Intensidad de la señal en función de la frecuencia del pulso de lock para el cristal líquido 8CB en fase nemática, en resonancia y a T=38°C.

Los parámetros de ajuste A y B corresponden a los valores de  $B_{Lz}$  y  $T_D$  respectivamente por lo que:  $B_{Lz} = (3,3 \pm 0,1)$  kHz y  $T_D = (14 \pm 9)$  ms. Si se comparan estos valores con los obtenidos por otros autores anteriormente [9] a T = 36°C, se ve lo que se muestra en el gráfico 3.4.

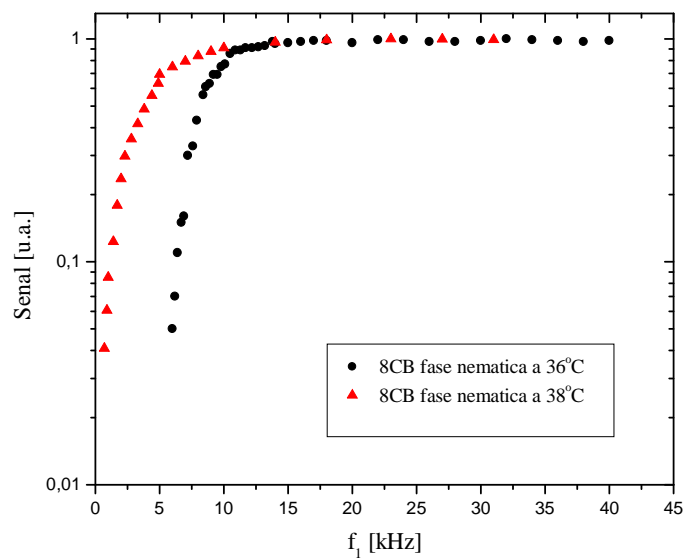


Gráfico 3.4. Comparación de las curvas de dispersión para el cristal líquido 8CB en fase nemática, en resonancia para T=36°C [9] y T=38°C.



De [9] se tiene  $B_{Lz} = (4,1 \pm 0,1)$  kHz y  $T_D = (0,06 \pm 0,02)$  ms para 8CB a 36°C. La notable diferencia entre los valores de estos parámetros medidos y los obtenidos por otros autores con sólo dos grados de diferencia en la temperatura, se justifica con el hecho de que a  $T_{NI}=40,5$  °C se produce la transición de fase nemática a isotrópica en 8CB. Tal como puede observarse en el gráfico 3.5, particularmente para este compuesto, las propiedades elásticas varían en forma crítica al acercarse a dicha temperatura [27], mostrando grandes cambios en un rango de temperatura muy pequeño.

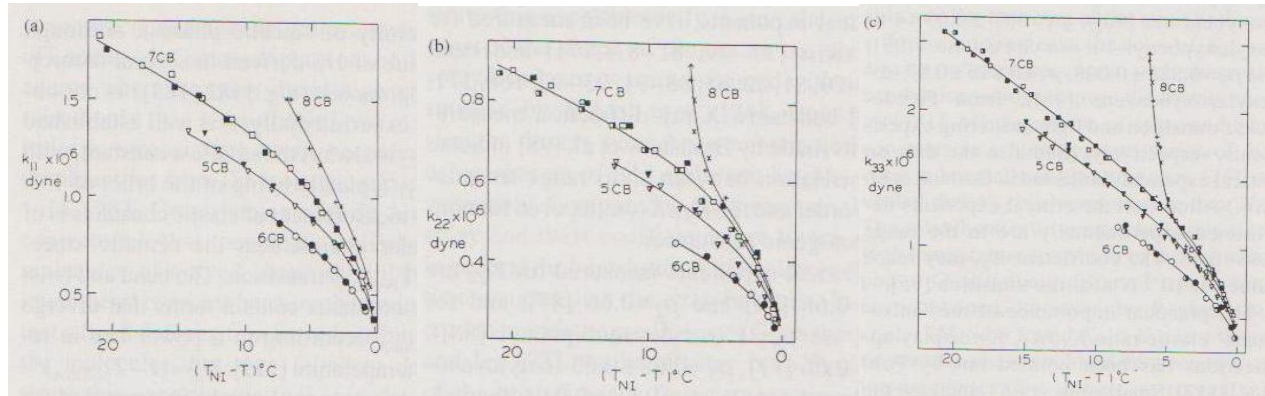


Gráfico 3.5. Contantes elásticas para los cristales líquidos 5CB, 6CB, 7CB y 8CB en función de la temperatura relativa a  $T_{NI}$  [27].

Luego, de la comparación de las curvas de dispersión en agua y 8CB medidas con las de otros autores [9,10] podemos decir que la calibración mostrada en el gráfico 3.1 es correcta, por lo cual será la utilizada en todas las posteriores mediciones de campo local.

### 3.3.1.2. Análisis de temperatura de la muestra luego de una secuencia de spin-lock

Se consideró una muestra de gelatina porcina a la cual se le aplicó la secuencia de *spin lock* para diferentes valores de frecuencia del pulso de lock en el rango de 1 kHz hasta 42 kHz. Para cada frecuencia, se midió la temperatura de la muestra al finalizar la secuencia de pulsos con una termocupla, para diferentes valores del número de mediciones ( $N$ ) y tiempo entre adquisiciones ( $rd$ ). Los valores de  $N$  utilizados fueron de 8 y 16 y los de  $rd$  fueron de 1s, 1,5s, 2s, 2,5s y 3s. El experimento fue realizado a una

temperatura de  $(37,8 \pm 0,3)^\circ\text{C}$ . La duración del pulso de  $\pi/2$  fue fijada en  $t = 2,7 \mu\text{s}$  y la duración del pulso de lock fue de  $5 \text{ ms}$ .

En los gráficos 3.6 y 3.7 se muestran los resultados.

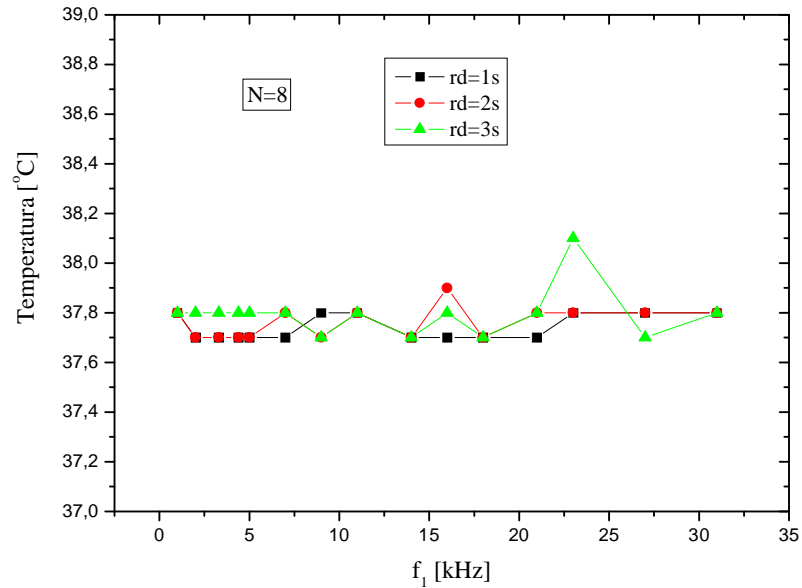


Gráfico 3.6. Temperatura de una muestra de gelatina porcina en función de la frecuencia del pulso de lock, para  $N = 8$  y diferentes valores de  $rd$ . Las líneas son sólo a modo ilustrativo, para poder seguir la tendencia de los puntos.

De los gráficos 3.6 y 3.7 se observa que la temperatura de la muestra no se incrementa más de  $0,3^\circ\text{C}$  luego de la secuencia de spin-lock en el rango de frecuencias de interés (1-35 kHz), es decir, la variación queda dentro del error. Además, podemos decir que estas variaciones no dependen significativamente de  $N$  y  $rd$  en el rango de 1-35 kHz. Así mismo, se concluye que  $rd$  debe ser el mayor posible (dentro de las limitaciones experimentales), mientras  $N$  crece. En los casos analizados, para  $N=8$ ,  $rd$  puede ser 1 o 2 s, y para  $N=16$ ,  $rd = 3\text{s}$ .

### 3.3.2. Mediciones de campo local

#### 3.3.2.1. Gelatina porcina

Se aplicó la secuencia de spin-lock a una muestra de gelatina porcina en polvo a  $T = (38 \pm 0,3)^\circ\text{C}$  en resonancia. La duración del pulso de  $\pi/2$  fue fijada en  $t = 2,7 \mu\text{s}$  y la duración del pulso de lock fue de  $5 \text{ ms}$ . Cada adquisición de la señal correspondió a un

promedio de 32 mediciones realizadas con ciclado de fase. El tiempo entre cada adquisición fue de 0,8 s. El intervalo de frecuencias fue de 3 kHz hasta 55 kHz. Los resultados se muestran en el gráfico 3.8.

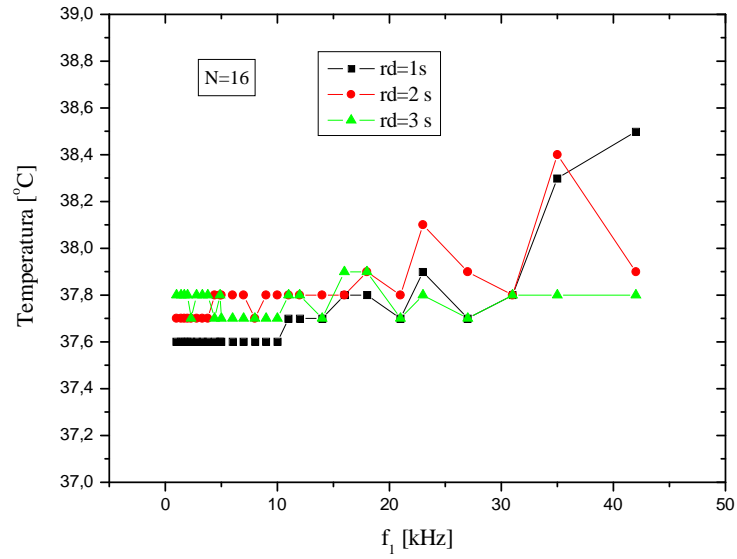


Gráfico 3.7. Temperatura de una muestra de gelatina porcina en función de la frecuencia del pulso de lock, para  $N=16$  y diferentes valores de  $rd$ . Las líneas son sólo a modo ilustrativo, para poder seguir la tendencia de los puntos.

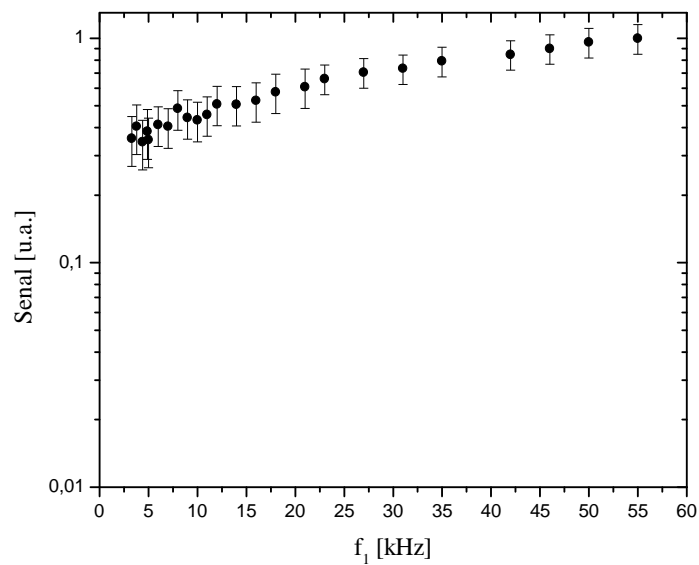


Gráfico 3.8. Intensidad de la señal en función de la frecuencia del pulso de lock para gelatina porcina, en resonancia y a  $T=38^\circ\text{C}$ .

Luego, se preparó la gelatina en polvo con agua a punto de hervor para desnaturalizarla, en la cual se repitieron las mediciones de señal en función de la frecuencia aplicando la secuencia de espín-lock convencional (Fig. 3.4) y la con supresión de la señal de protones de agua libre (Fig. 3.6) con  $\tau_{xcero} = (80 \pm 3)ms$ . El  $\tau_{xcero}$  se determinó buscando el tiempo de separación entre los pulsos de  $180^\circ$  y  $90^\circ$  que anula la FID a tiempos largos, que corresponde solo a la señal asociada a protones de agua libre. El tiempo a partir del cual se buscó la nulidad de la señal fue fijado en 3,5 ms, basándonos en previas observaciones experimentales que demostraban que a partir de los 3 ms la señal que quedaba correspondía sólo a protones de agua libre. El resto de los parámetros de medición fueron los mismos que en el caso anterior, excepto por el rango de frecuencia que fue de 3-31 kHz y de 3-21 kHz respectivamente. Los resultados aparecen en los gráficos 3.9 y 3.10.

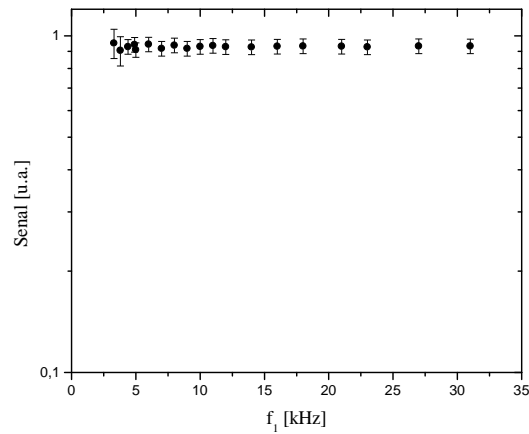


Gráfico 3.9. Intensidad de la señal, sin supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para gelatina porcina desnaturalizada, en resonancia y a T=38°C.

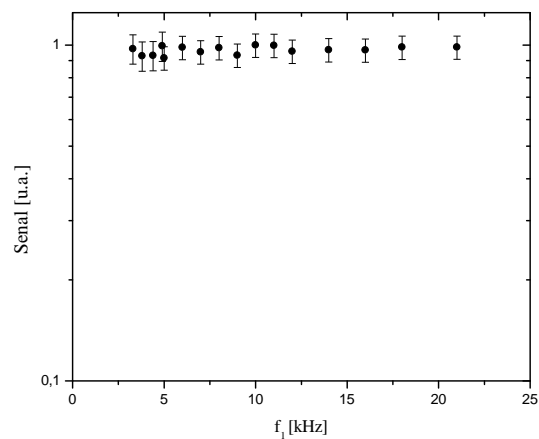


Gráfico 3.10. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para gelatina porcina desnaturalizada, en resonancia y a T=38°C.

De los gráficos 3.8, 3.9 y 3.10 se puede observar una variación de más del 70% para la gelatina en polvo, mientras que para la gelatina desnaturalizada, con y sin supresión de señal de agua libre, no se observa variación de la señal con la frecuencia, dentro del error experimental. Las bandas de error fueron asignadas según la dispersión que había para determinar el valor de señal a una dada frecuencia (se usó el mismo criterio en todas las mediciones de señal en función de la frecuencia de este trabajo).

### 3.3.2.2. Ovoalbúmina

Se aplicó la secuencia de spin-lock con supresión de la señal de agua libre a una muestra de clara de huevo (90% ovoalbúmina) a  $T = (38 \pm 0,3)^\circ\text{C}$  en resonancia. El valor del  $\tau_{xcero}$  fue de  $950\text{ ms}$ , la duración del pulso de  $\pi/2$  fue fijada en  $t = 2,7\ \mu\text{s}$  y la del pulso de lock fue de  $5\text{ ms}$ . Cada adquisición de la señal correspondió a un promedio de 4 mediciones realizadas con ciclado de fase. El tiempo entre cada adquisición fue de  $6\text{ s}$ . El intervalo de frecuencias fue de  $3\text{ kHz}$  hasta  $23\text{ kHz}$ . Los resultados se muestran en el gráfico 3.11.

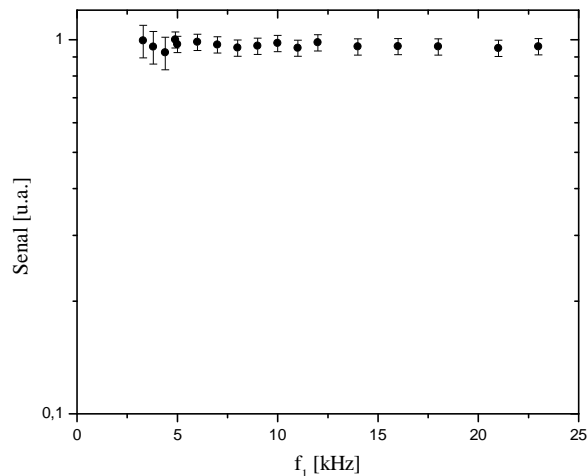


Gráfico 3.11. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para clara de huevo, en resonancia y a  $T=38^\circ\text{C}$ .

Luego, la clara de huevo fue cocinada, desnaturalizando la proteína y se le aplicó nuevamente la secuencia de spin-lock con supresión utilizando los mismos parámetros que el caso anterior, excepto por el  $\tau_{xcero}$  que fue establecido en  $(670 \pm 3)\text{ ms}$ . Los resultados aparecen en el gráfico 3.12.

Para completar los resultados que aparecen en los gráficos 3.11 y 3.12, en el gráfico 3.13 se muestran los resultados de un estudio de  $T_1$  en función de la frecuencia de Larmor utilizando la técnica de relaxometría con ciclado de campo (también conocida como *fast field cycling o FFC*) para una muestra de clara de huevo en su estado natural y desnaturalizada. La medición fue realizada con la colaboración del Dr. Carlos Mattea en la Universidad de Ilmenau- Alemania.

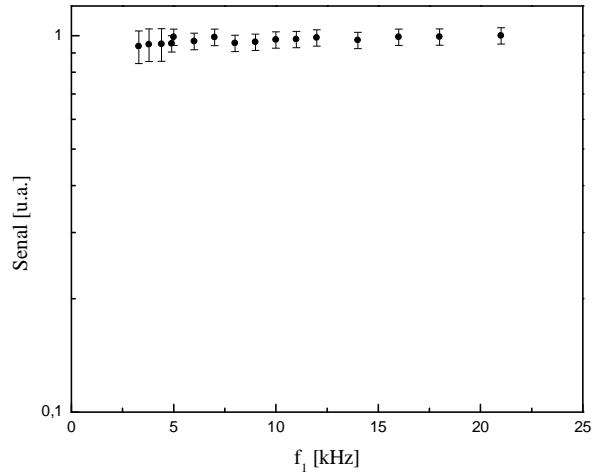


Gráfico 3.12. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para ovoalbúmina desnaturalizada, en resonancia y a  $T=38^\circ\text{C}$ .

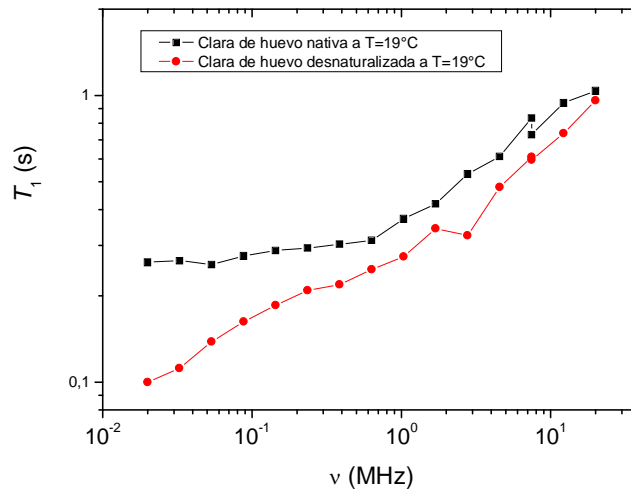


Gráfico 3.13.  $T_1$  en función de la frecuencia de Larmor para clara de huevo nativa y desnaturalizada a  $T = 19^\circ\text{C}$ .

En los gráficos 3.11 y 3.12, que corresponden a clara de huevo natural y desnaturalizada, respectivamente, no se observan variaciones de la señal con la frecuencia,

dentro del error experimental. Por otro lado, se observan marcadas diferencias entre las curvas  $T_1(\nu)$  para estas muestras en el rango de las decenas de kHz como se muestra en el gráfico 3.13.

### 3.3.2.3. Hemoglobina A

Se aplicó la secuencia de spin-lock con supresión de la señal de agua libre a una muestra de Hemoglobina A humana a  $T = (38 \pm 0,3)^\circ\text{C}$  en resonancia. El valor del  $\tau_{xcero}$  fue de  $(160 \pm 3)$  ms, lo que da según la ecuación 3.4 un valor de  $T_{IF} = (230 \pm 4)$  ms. La duración del pulso de  $\pi/2$  fue fijada en  $t = 2,7$   $\mu\text{s}$  y la del pulso de lock fue de 5 ms. Cada adquisición de la señal correspondió a un promedio de 16 mediciones realizadas con ciclado de fase. El tiempo entre cada adquisición fue de 1,2 s. El intervalo de frecuencias fue de 3 kHz hasta 23 kHz. Los resultados se muestran en el gráfico 3.14.

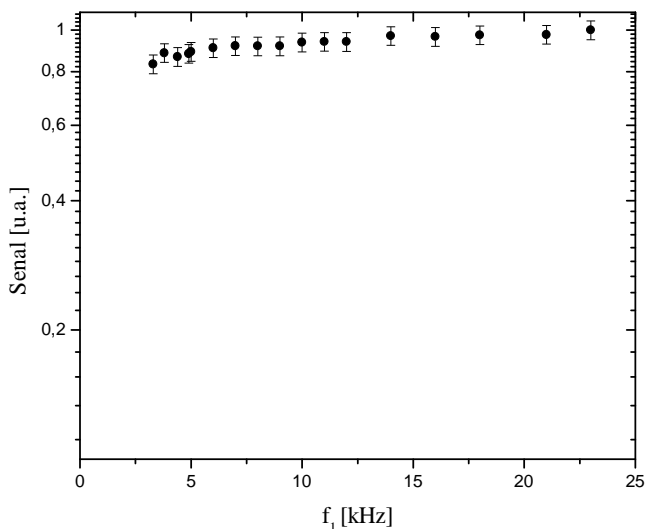


Gráfico 3.14. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para Hemoglobina A humana ( $HbA_1$ ), en resonancia y a  $T=38^\circ\text{C}$ .

Notar que, en el gráfico 3.14 se observa una disminución de alrededor del 20% en la señal a medida que la frecuencia disminuye.

Esta muestra de hemoglobina A fue etiquetada como  $HbA_1$ . Considerando que se trataba de una muestra ya preparada y almacenada congelada un par de meses antes de realizar el experimento mostrado en el gráfico 3.14, se procedió a repetir el experimento

con una muestra fresca. La nueva muestra de hemoglobina A proveniente de donante masculino sano, etiquetada como  $HbA_2$ , fue preparada de la forma explicitada en la sección 3.1, tal que fue congelada para hemólisis durante 127 hs y a una temperatura de  $-20^\circ\text{C}$ . Una vez lista la muestra, se le aplicó la secuencia de spin-lock con supresión de la señal de agua libre a  $T = (38 \pm 0,3)^\circ\text{C}$  en resonancia. La duración del pulso de  $\pi/2$  fue fijada en  $t = 2,8 \mu\text{s}$  y la del pulso de lock fue de  $5 \text{ ms}$ . Cada adquisición de la señal correspondió a un promedio de 16 mediciones realizadas con ciclado de fase. El tiempo entre cada adquisición fue de  $3 \text{ s}$ . El intervalo de frecuencias fue de  $3 \text{ kHz}$  hasta  $31 \text{ kHz}$ . El valor del  $\tau_{xcero}$  fue de  $(200 \pm 3) \text{ ms}$ , lo que da según la ecuación 3.4 un valor de  $T_{1F} = (289 \pm 4) \text{ ms}$ . Los resultados se muestran en el gráfico 3.15.

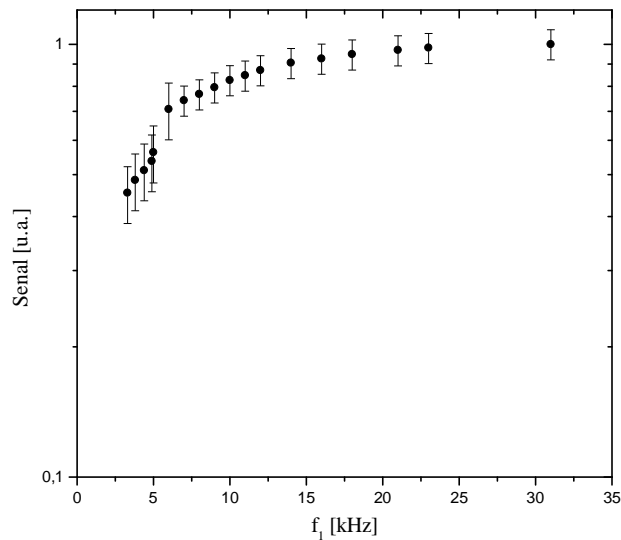


Gráfico 3.15. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para Hemoglobina A humana, ( $HbA_2$ ) en resonancia, a  $T=38^\circ\text{C}$  y  $T_{1F} = 289 \text{ ms}$ .

Notar que, en el gráfico 3.15 se observa una disminución de alrededor del 60% en la señal a medida que la frecuencia disminuye.

Dos inconvenientes se observaron en las mediciones en  $HbA_1$  y  $HbA_2$ , los que llevaron a suponer que el valor de  $T_{1F}$  tiene algún tipo de evolución temporal. Primero, el valor para  $T_{1F}$  para  $HbA_1$  es bastante distinto del obtenido para  $HbA_2$ , siendo la última una muestra mucho más fresca. Segundo, se observaron variaciones en el  $\tau_{xcero}$  entre 5 a 10 ms durante la medición en  $HbA_2$  lo cual altera la curva de dispersión.



Así, se repitió el experimento del gráfico 3.15 con  $HbA_2$ , pero luego de 44 hs contadas a partir de la primera medición. Durante este tiempo la muestra se mantuvo refrigerada, sin congelar. En este caso, el valor del  $\tau_{xcero}$  fue de  $(170 \pm 3)$  ms y con ello  $T_{1F} = (245 \pm 4)$  ms. Los resultados se muestran en el gráfico 3.16.

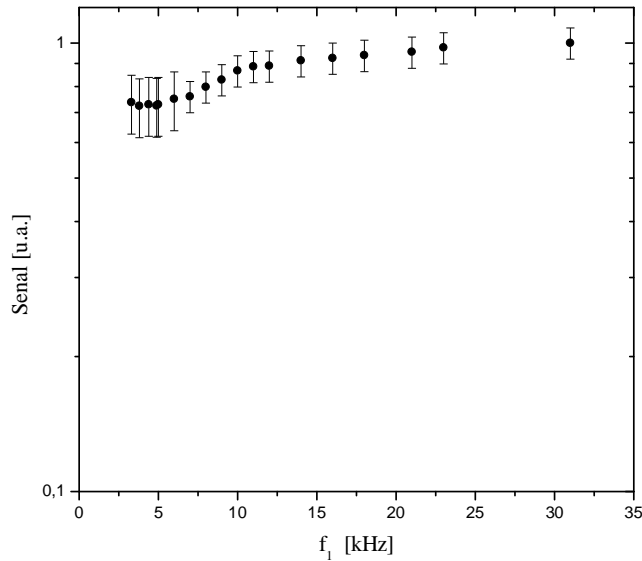


Gráfico 3.16. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para Hemoglobina A humana, ( $HbA_2$ ) en resonancia, a  $T=38^\circ\text{C}$  y  $T_{1F} = 245$  ms.

Notar que, en el gráfico 3.14 se observa una disminución de alrededor del 25% en la señal a medida que la frecuencia disminuye.

### 3.3.3. Mediciones de $T_{1F}$ en función del tiempo en HbA

Considerando las variaciones de  $T_{1F}$  con el tiempo observados en  $HbA_2$ , se decidió realizar un estudio de la evolución temporal de  $T_{1F}$  en una nueva muestra de HbA para así poder determinar la validez de las curvas de la intensidad en función de la frecuencia obtenidas aplicando la secuencia de spin-lock con supresión de señal de protones de agua libre.

Se dispuso de una muestra de sangre de donante masculino sano, de la cual se preparó la muestra de hemoglobina A,  $Hb A_5$ , de la forma explicitada en la sección 3.1. Fue congelada en freezer para hemólisis durante 21 hs y a una temperatura de  $-20^\circ\text{C}$ . Se

hizo un duplicado de la muestra a modo de corroboración, Hb A<sub>5</sub>′, la cual se preparó una semana después de conservar la sangre sin procesar en la heladera.

Los valores de  $T_{IF}$  se determinaron para los diferentes tiempos aplicando la secuencia RI, descrita en la figura 3.2 y luego, usando la ecuación 3.4. El  $\tau_{xcero}$  se determinó por medio de buscar el tiempo de separación entre los pulsos de 180° (de duración de 5,6  $\mu$ s) y 90° (de duración de 2,8  $\mu$ s) que anula la señal a tiempos largos, que corresponde solo a la señal de protones en agua libre, lo cual se estableció a partir de los 3,5 ms, luego de una promediación de 40 mediciones separadas temporalmente en 3s. Se trabajó a  $T = (36,7 \pm 0,3)^\circ\text{C}$  (temperatura fisiológica). Los resultados para Hb A<sub>5</sub> y Hb A<sub>5</sub>′ se muestran en el gráfico 3.17, en el cual se puede observar que la curva obtenida consta de dos partes con características marcadamente diferentes, separadas por un valor mínimo  $T_{IF}$ . El tiempo  $t = 0 \text{ min}$  es el momento en el que se hizo la primera medición de  $T_{IF}$ . En este caso correspondió a una hora después de descongelar la muestra. Se asignaron los errores de 10 min y 4 ms a los valores de  $t$  y  $T_{IF}$  respectivamente, lo que se usó en todas las curvas  $T_{IF}$  vs.  $t$  de este trabajo.

Se observó un notable aumento de viscosidad y una evolución del color en las dos muestras de HbA, habiendo partido de color rojo carmín a  $t = 0 \text{ min}$  y transformándose a bordó oscuro, luego de pasar el mínimo de la curva  $T_{IF}$  vs.  $t$ .

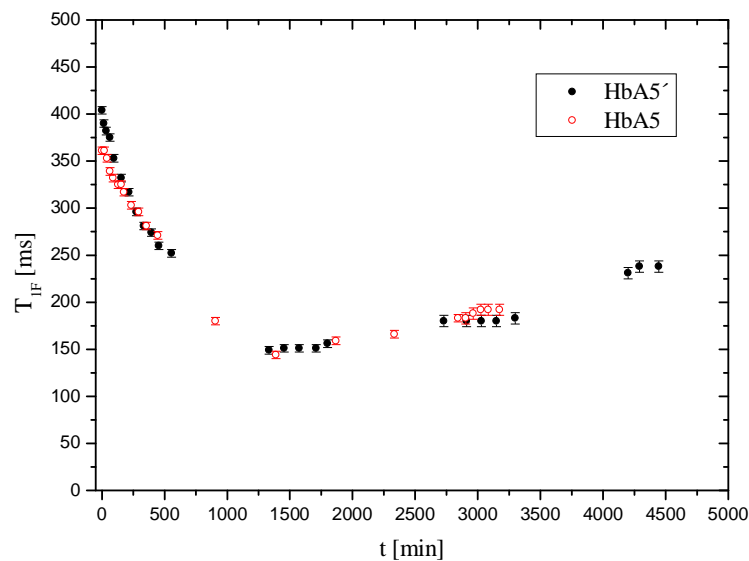


Gráfico 3.17. Evolución temporal de  $T_{IF}$  para HbA del mismo donante: HbA<sub>5</sub> y HbA<sub>5</sub>′ a  $T = 36,7^\circ\text{C}$ .

Para estudiar los factores externos que influyen en la evolución temporal de  $T_{IF}$  se repitió el experimento realizado en Hb A<sub>5</sub> y Hb A<sub>5</sub>' en varias muestras distintas de Hb A tal que, en algunas de ellas se modificó la forma de congelación para hemólisis, otras fueron agitadas, refrigeradas y/o congeladas durante la evolución de  $T_{IF}$ , y por último una de ellas fue expuesta a centrifugación a un número elevado de rpm antes de medir el primer punto de la curva de  $T_{IF}$ .

### 3.3.3.1. Estudio de la influencia del modo de congelación para la hemólisis en $T_{IF}$ vs t

Se dispuso de una muestra de sangre de donante masculino sano, de la cual se prepararon dos muestras de hemoglobina A, Hb A<sub>8</sub>' y Hb A<sub>8</sub>'', de la forma explicitada en la sección 3.1. pero variando la manera de practicar la hemólisis por congelación. La Hb A<sub>8</sub>' fue congelada por exposición a aire líquido a  $T = -200^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos y la Hb A<sub>8</sub>'' fue congelada en el freezer a  $T = -20^{\circ}\text{C}$  durante 50 hs. Los valores de  $T_{IF}$  determinados para los diferentes tiempos usando la ecuación 3.4., se obtuvieron con los mismos parámetros experimentales que Hb A<sub>5</sub> y Hb A<sub>5</sub>'. Los resultados se muestran en el gráfico 3.18. A modo de comparación, se superponen las curvas obtenidas para Hb A<sub>5</sub> y Hb A<sub>5</sub>'.

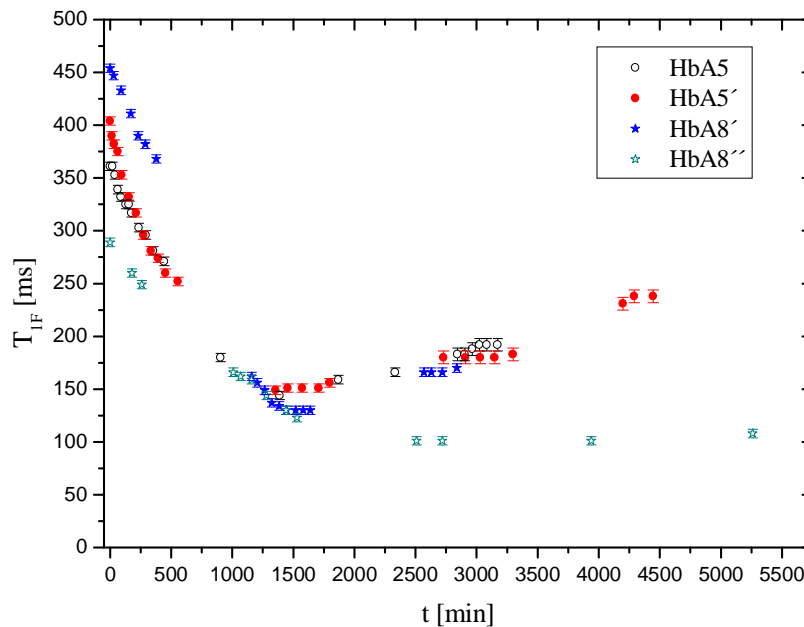


Gráfico 3.18. Evolución temporal de  $T_{IF}$  para HbA del mismo donante: HbA<sub>8</sub>' y HbA<sub>8</sub>'' a  $T = 36,7^{\circ}\text{C}$ . Se muestran además las curvas de HbA<sub>5</sub> y HbA<sub>5</sub>' a modo de comparación.

Se observa el mismo comportamiento para las muestras HbA5, HbA5' y HbA8', a pesar de que presentan un poco de dispersión en los valores iniciales y mínimos de  $T_{1F}$ , dependiendo del donante. Por otro lado, la curva de la muestra HbA8'' aún no muestra la segunda parte (después del mínimo), para el rango temporal considerado.

Nuevamente, se observó un aumento en la viscosidad y un color bordó oscuro en las dos muestras de HbA luego de pasar el mínimo de la curva  $T_{1F}$  vs.  $t$ .

### 3.3.3.2. Estudio de la influencia de agitamientos, refrigeración y congelación en $T_{1F}$ vs $t$

Se preparó la muestra de hemoglobina A, Hb A<sub>4</sub> de la forma explicitada en la sección 3.1. la cual fue congelada para hemólisis en el freezer a  $T = -20^{\circ}\text{C}$  durante 4 hs. Los valores de  $T_{1F}$  determinados para los diferentes tiempos usando la ecuación 3.4., se realizaron a  $T = (38,0 \pm 0,3)^{\circ}\text{C}$  siendo los restantes parámetros experimentales iguales al caso anterior. Durante la evolución de este parámetro, la muestra fue expuesta dos veces a leves agitamientos manuales durante 1 min, tal que el primer agitamiento fue a  $t = 135\text{min}$  y el segundo a  $t = 980\text{min}$ , siendo estos tiempos contados a partir de la primera medición de  $T_{1F}$ . Posteriormente, a  $t = 1180\text{min}$  la muestra fue congelada a  $T = -20^{\circ}\text{C}$  durante 19 hs, luego de lo cual se continuó midiendo  $T_{1F}$ . Los resultados se muestran en el gráfico 3.19, en los cuales se puede observar que aún no se ha alcanzado un valor mínimo de  $T_{1F}$  en el rango temporal considerado.

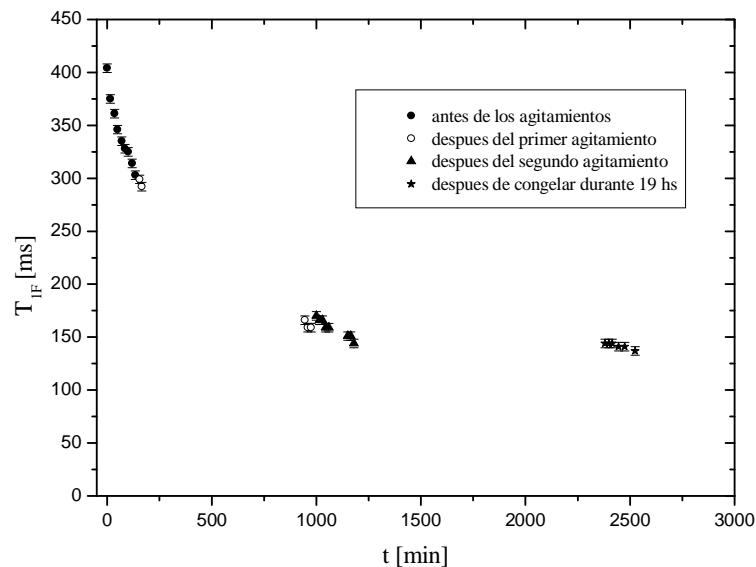


Gráfico 3.19. Evolución temporal de  $T_{1F}$  para HbA<sub>4</sub> a  $T = 38^{\circ}\text{C}$ , expuesta a dos agitamientos y a congelación.

Para estudiar un poco mejor la influencia de los agitamientos, se preparó una nueva muestra de HbA, Hb A<sub>12</sub>, en la cual la hemólisis por congelación se hizo en freezer a  $T = -20^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 21 hs. Las mediciones de  $T_{IF}$  en función del tiempo se hicieron a  $36,7^{\circ}\text{C}$  hasta pasar levemente al mínimo de la curva  $T_{IF}$  vs  $t$ , lo que correspondió a 2625 min (aproximadamente 44 hs). Para este tiempo, se hizo la primera agitación manual de la muestra durante un minuto con la posterior medida de  $T_{IF}$ . Se repitieron estos pasos periódicamente. Luego de la última medición de  $T_{IF}$  a los 4530 min, la muestra fue puesta en refrigeración en heladera (sin congelar) durante 258 hs (15480 min) y posteriormente se midió  $T_{IF}$  nuevamente. Los resultados se muestran en el gráfico 3.20, en el cual se puede apreciar que el agitar la muestra de Hb A en las proximidades del mínimo y en tiempos posteriores, altera la evolución temporal de  $T_{IF}$ . Se observa que, luego de cada agitamiento,  $T_{IF}$  toma valores que tenía para tiempos antes del agitamiento. Notar que luego de la refrigeración  $T_{IF}$  conserva el mismo valor que tenía antes de la refrigeración.

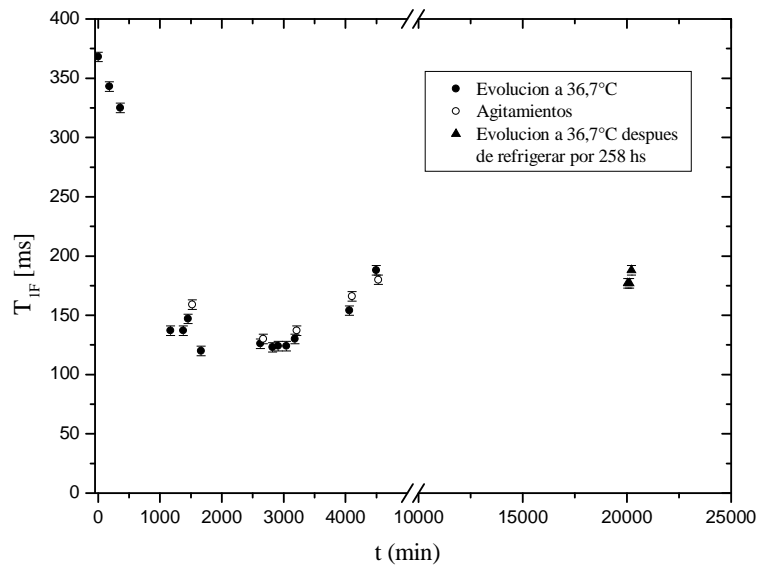


Gráfico 3.20. Evolución temporal de  $T_{IF}$  para HbA<sub>12</sub> a  $T = 36,7^{\circ}\text{C}$ , expuesta a cinco agitamientos y a posterior refrigeración.

Por último, para estudiar un poco mejor la influencia de la refrigeración y congelación en  $T_{IF}$  vs.  $t$ , se consideró otra muestra de HbA, Hb A<sub>2</sub>, en la cual la hemólisis por congelación se hizo en freezer a  $T = -20^{\circ}\text{C}$  durante 19 hs. Las mediciones de  $T_{IF}$  en función del tiempo se hicieron a  $38^{\circ}\text{C}$ . Luego de la primera medición de  $T_{IF}$ , se congeló la

muestra en freezer por segunda vez a  $T = -20^{\circ}\text{C}$  durante 108 hs (6480 min). Posteriormente, la muestra fue descongelada y se procedió a medir  $T_{IF}$  vs.  $t$ , aproximadamente cada 50 hs, tal que entre cada medición se mantenía la muestra refrigerada en la heladera. En el gráfico 3.21 se muestran los resultados obtenidos, en el cual nuevamente no se observa el valor mínimo de  $T_{IF}$ , a pesar de que el rango temporal es muy amplio.

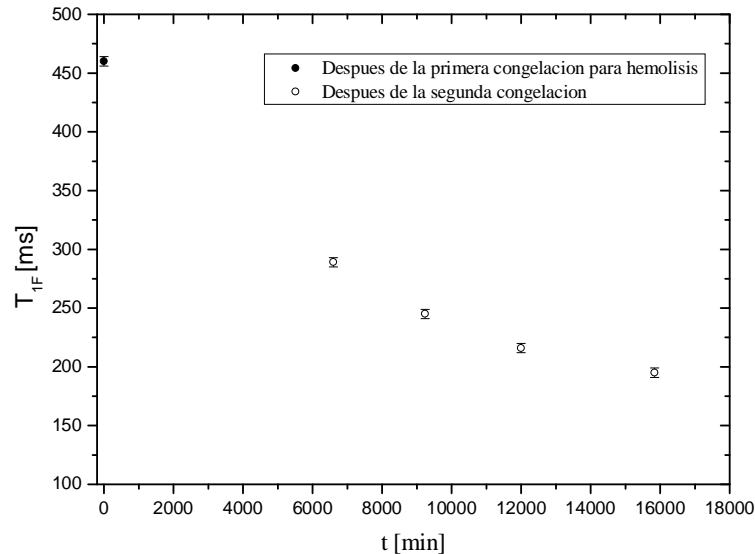


Gráfico 3.21. Evolución temporal de  $T_{IF}$  para  $\text{HbA}_2$  a  $T = 38^{\circ}\text{C}$ , expuesta a una congelación y varias refrigeraciones.

Nuevamente, en todas las muestras de esta sección se observó un aumento en la viscosidad y un color bordó oscuro luego de pasar el mínimo de la curva  $T_{IF}$  vs.  $t$ .

### 3.3.3.3. Estudio de la influencia de una centrifugación a 50.000 rpm al inicio de la curva $T_{IF}$ vs $t$

Se consiguieron dos muestras de sangre, una de donante femenino y otra de donante masculino de las cuales se extrajo la Hb A:  $\text{HbA}_9$  y  $\text{HbA}_{10}$  respectivamente. La hemólisis por congelación se hizo en freezer a  $T = -20^{\circ}\text{C}$  durante 18 hs en ambos casos. Luego de descongelarlas, fueron centrifugadas a 50.000 rpm durante 30 min y a  $T = 4^{\circ}\text{C}$ . Inmediatamente después se midió la evolución temporal de  $T_{IF}$  en las dos muestras. Los resultados se muestran en el gráfico 3.22, donde  $t = 0$  min corresponde a 3 hs y 5 hs después de descongelar las muestras  $\text{HbA}_9$  y  $\text{HbA}_{10}$  respectivamente. Se puede apreciar

que los últimos valores medidos de  $T_{1F}$  superan a los iniciales en más de 100 ms, comportamiento que nunca antes se había observado.

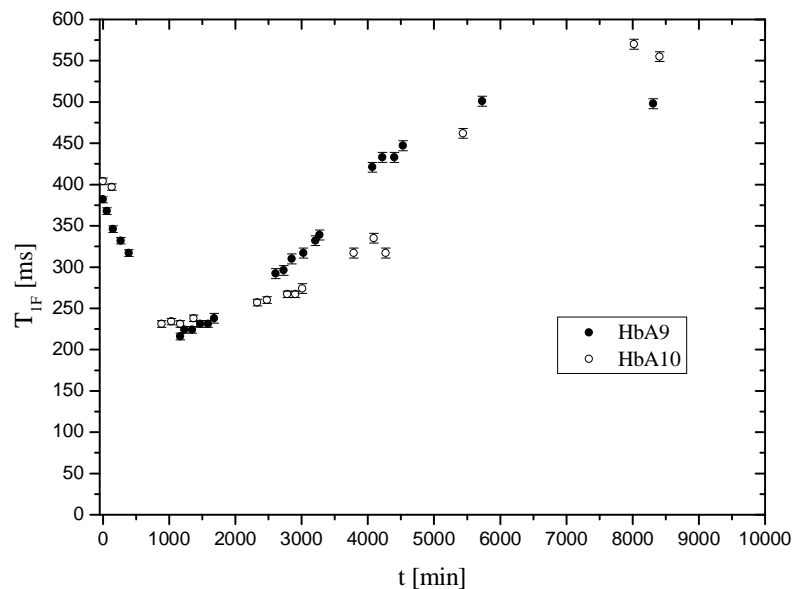


Gráfico 3.22. Evolución temporal de  $T_{1F}$  para HbA<sub>9</sub> y HbA<sub>10</sub> a  $T=36,7^{\circ}\text{C}$ , expuesta a una centrifugación inicial de 50.000 rpm.

Esta vez no se apreciaron cambios en la fluidez de ambas muestras, si no que solo se observó la evolución del color de las mismas, pasando gradualmente de rojo a bordó oscuro desde  $t = 0\text{min}$  hasta el mínimo de la curva.

En todas las mediciones de  $T_{1F}$  en función del tiempo en las muestras de HbA que se han considerado hasta el momento, se utilizaron los mismos parámetros experimentales que en el caso de HbA<sub>5</sub> y HbA<sub>5'</sub>, excepto la temperatura que fue especificada en cada caso.

### 3.3.4. Mediciones de $T_{1M}$ en función del tiempo en HbA

Para ver si se observa un comportamiento similar al de  $T_{1F}$  en el tiempo de relajación de los protones propios de la hemoglobina ( $T_{1M}$ ), el cual está íntimamente relacionado a la estructura de la proteína, se procedió a hacer un estudio de este tiempo de relajación en función del tiempo. Para ello, se obtuvo una nueva muestra de sangre de donante masculino, de la cual se extrajo la muestra HbA<sub>13</sub>. La manera de prepararla fue diferente a la convencional, pues los lavados de los glóbulos rojos se hicieron con PBS

preparado con D<sub>2</sub>O (agua compuesta por 99.9% de D<sub>2</sub>O suministrada por Nucleoeléctrica Argentina S.A. Central Nuclear Embalse, Div. Química y Procesos), habiendo sido con H<sub>2</sub>O en todos los casos anteriores. Esta modificación tenía como objetivo eliminar en el mayor grado posible las moléculas de agua en la solución de HbA pero con la consecuente formación de DOH por intercambios de protones de los grupos amida de la proteína con deuterios del D<sub>2</sub>O. Así, la señal de RMN provendría sólo de protones en enlaces covalentes de la estructura de la proteína y del DOH, siendo esperado el menor aporte por parte de estos últimos.

Se hicieron 5 lavados con PBS deuterado. El primero por 10 min, el segundo, tercero y quinto se los dejó incubar entre 2 y 3 hs c/u; el cuarto incubó por 16 hs. Estos lavados se hicieron por tiempos prolongados con el objetivo de reducir al mínimo la cantidad de DOH, permitiendo el intercambio antes mencionado a través de la membrana del glóbulo. La cantidad de DOH se fue controlando por medio de medir los espectros IR de la muestra y observar el pico correspondiente luego de cada lavado. A continuación de los lavados, se llevó a cabo la hemólisis por congelación, la cual se hizo en freezer a T=-20°C durante 19 hs. Posteriormente, se descongeló y luego de una hora, tomando este tiempo como t = 0 min, se obtuvo el primer valor de T<sub>1M</sub> a T=36,7°C. Para ello, fue necesario establecer tres valores para  $\tau_{xcero}$  al aplicar la secuencia 90°- $\tau_{xcero}$ -180°, pues se observó que en la FID existían más de un decaimiento exponencial, lo cual tiene que ver con la presencia de más de un tipo de población de protones caracterizadas por diferentes entornos atómicos. Además esto se evidenciaba en el hecho de que era imposible determinar un único  $\tau_{xcero}$ . Entonces, se buscó la anulación de la señal a partir de tres tiempos establecidos, a saber: 0,012 ms, 0,5 ms y 3,5 ms. Así, usando la ecuación 3.4 con los tres valores de  $\tau_{xcero}$  se determinaron tres valores de tiempos de relajación para cada tiempo medido: T<sub>1M(0,012)</sub>, T<sub>1M(0,5)</sub> y T<sub>1M(3,5)</sub>. Las duraciones de los pulsos de 90° y 180° fueron de 2,7 $\mu$ s y 5,4 $\mu$ s respectivamente. Cada medición de anulación de señal fue resultado de una promediación de 40 mediciones separadas temporalmente en 3s. Los resultados se muestran en los gráficos 3.23, 3.24 y 3.25.

Por otro lado, se hizo un espectro IR con la muestra HbA<sub>13</sub> antes de congelar para hemólisis, luego del quinto lavado, lo cual reveló que al momento de la primera medición de T<sub>1M</sub> la muestra ya no poseía <sup>1</sup>H de los grupos amida.



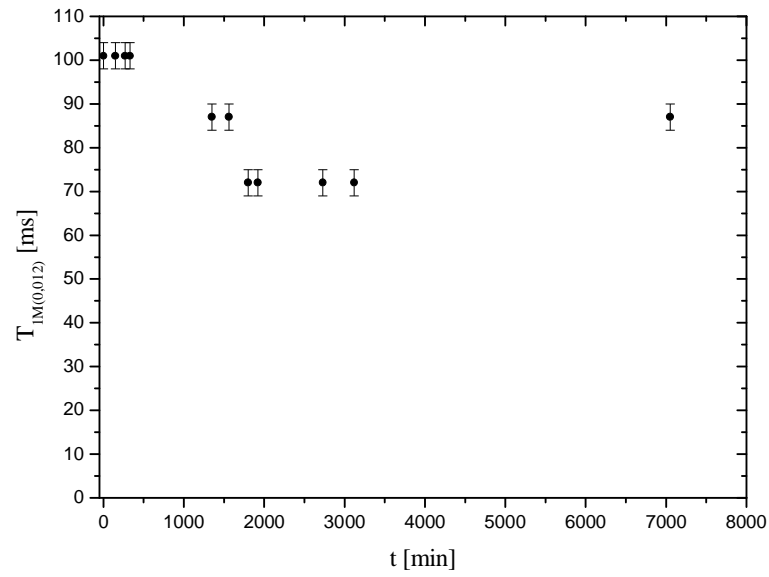


Gráfico 3.23. Evolución temporal de  $T_{IM(0,012)}$  para  $HbA_{13}$  a  $T=36,7^{\circ}C$ .

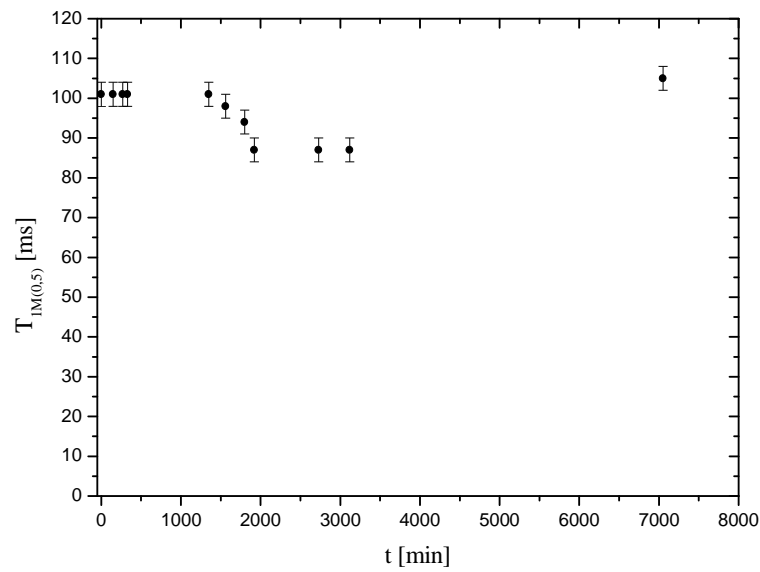


Gráfico 3.24. Evolución temporal de  $T_{IM(0,5)}$  para  $HbA_{13}$  a  $T=36,7^{\circ}C$ .

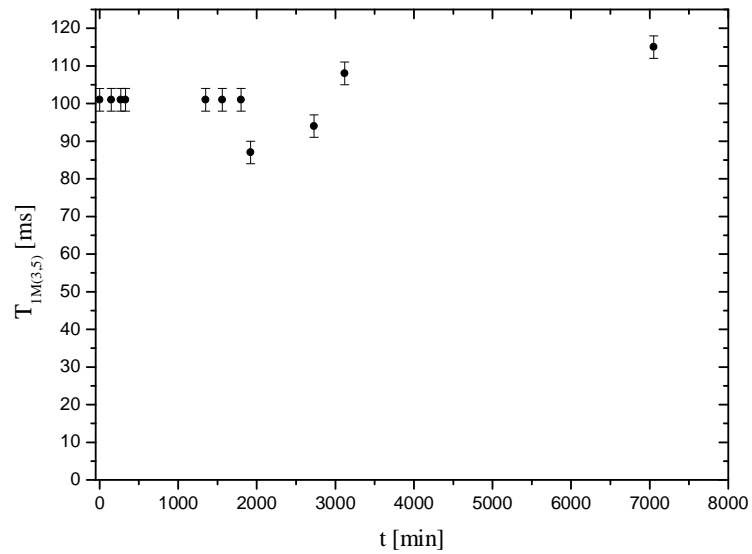


Gráfico 3.25. Evolución temporal de  $T_{IM(3,5)}$  para  $HbA_{13}$  a  $T=36,7^{\circ}C$ .

Notar que  $T_{IM}$  sigue un comportamiento que intenta reproducir el obtenido para  $T_{IF}$ , pero con una variación temporal respecto a su valor inicial mucho menor (no supera el 30%). Además, se observa un mínimo para un tiempo en promedio de  $(2500 \pm 10)$  min (aproximadamente 42 hs), que corresponde a 1200 min (20 hs) después del tiempo promedio del mínimo para  $T_{IF}$ .

### 3.3.5. Mediciones de campo local en Hb A considerando la evolución temporal de $T_{IF}$

Se consideró la muestra  $HbA_5'$  y se le aplicó la secuencia de spín-lock en resonancia con supresión de la señal de protones de agua libre donde  $\tau_{lock} = 5$  ms. El  $\tau_{xcero}$  se determinó por medio de buscar el tiempo de separación entre los pulsos de  $180^{\circ}$  (de duración de  $5,6 \mu s$ ) y  $90^{\circ}$  (de duración de  $2,8 \mu s$ ) que anula la señal a tiempos largos (cola de la FID), que corresponde solo a la señal de protones en agua libre, lo cual se estableció a partir de los 3,5 ms, luego de una promediación de 40 mediciones separadas temporalmente en 3s. Se trabajó a  $T = (36,7 \pm 0,3)^{\circ}C$ .

La curva de señal vs. frecuencia se midió solo para 4 valores de  $f_{\text{lock}}$  donde los valores de señal fueron el resultado de una promediación de 16 mediciones separadas temporalmente por 3s. No se determinó la curva para una cantidad mayor de frecuencias pues se deseaba evitar una variación relevante en  $T_{\text{IF}}$  que pueda llevar a una falsa dispersión de la señal con la frecuencia. De esta forma, según los parámetros experimentales utilizados, el tiempo empleado en medir cada punto de la curva señal vs.  $f_1$  es de 48 s, sumando un total de 192 s para los cuatro puntos, tiempo mucho menor que el correspondiente a un cambio relevante en  $T_{\text{IF}}$  según los resultados obtenidos en la sección 3.3.3. Las frecuencias utilizadas fueron 2,3 kHz, 7 kHz, 14 kHz y 31 kHz. Se midieron las curvas de dispersión en valores de tiempo que se consideraron relevantes según la evolución de  $T_{\text{IF}}$  para Hb A. Ellos fueron a  $t = 0\text{ min}$  ( $T_{\text{IF}} = 404\text{ ms}$ ),  $t = 555\text{ min}$  ( $T_{\text{IF}} = 252\text{ ms}$ ),  $t = 1335\text{ min}$  ( $T_{\text{IF}} = 149\text{ ms}$ ) que correspondió al mínimo de la curva  $T_{\text{IF}}$  vs.  $t$  y  $t = 4445\text{ min}$  ( $T_{\text{IF}} = 238\text{ ms}$ ). Los resultados se muestran en los gráficos 3.26, 3.27, 3.28 y 3.29.

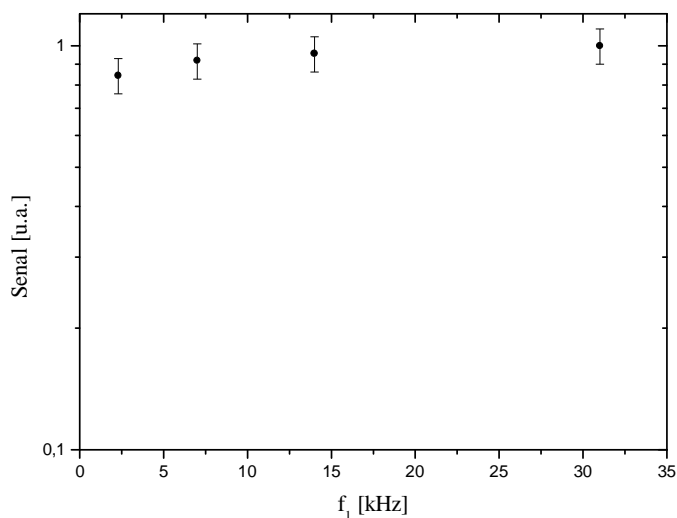


Gráfico 3.26. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para HbA<sub>5'</sub> en resonancia, a  $T=36,7^\circ\text{C}$  y  $T_{\text{IF}} = 404\text{ ms}$  ( $t = 0\text{ min}$ ).

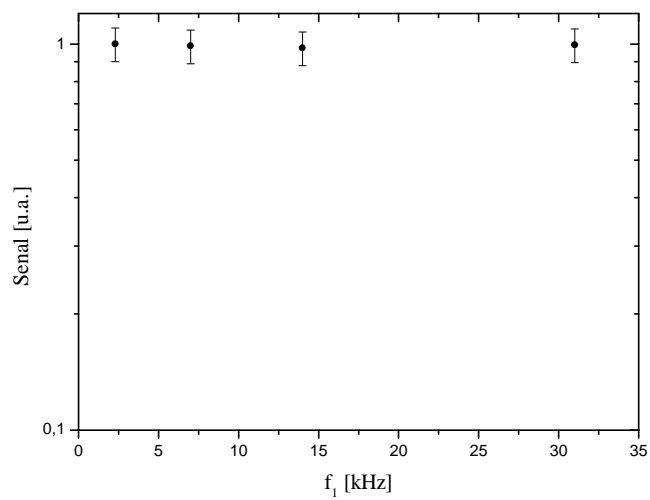


Gráfico 3.27. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para HbA<sub>5'</sub> en resonancia, a T=36,7°C y T<sub>1F</sub> = 252 ms (t = 555min).

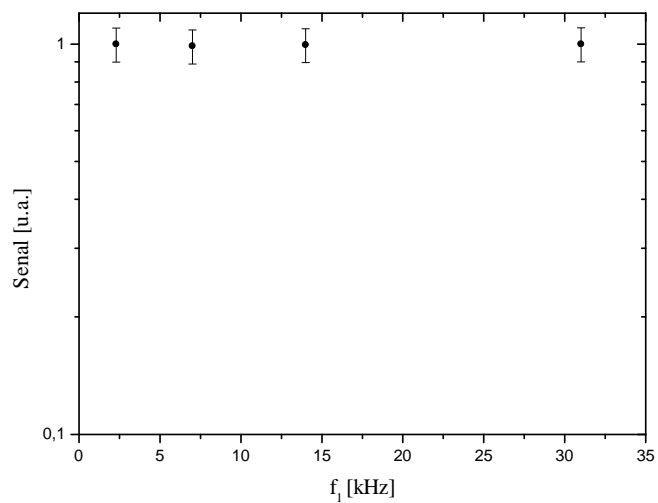


Gráfico 3.28. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para HbA<sub>5'</sub> en resonancia, a T=36,7°C y T<sub>1F</sub> = 149 ms (t = 1335 min).

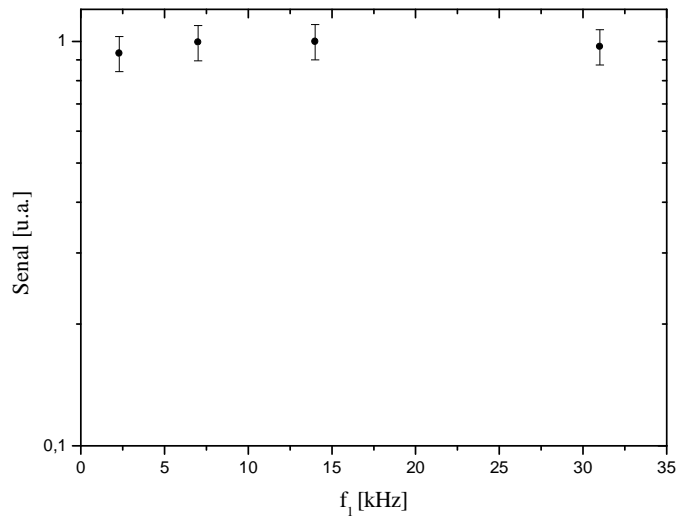


Gráfico 3.29. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para HbA<sub>5</sub>' en resonancia, a T=36,7°C y T<sub>1F</sub> = 238 ms (t = 4445 min).

Se observa una variación de la señal de alrededor del 20 % a medida que la frecuencia disminuye para t = 0 min (gráfico 3.26). Por otro lado, se puede apreciar que la señal medida no presenta variaciones, dentro del error de medición, en el rango de frecuencias consideradas para las mediciones a t = 555 min (gráfico 3.27), t = 1335 min (gráfico 3.28) y t = 4445 min (gráfico 3.29).

A modo de comparación con las curvas de dispersión obtenidas en HbA<sub>2</sub> y HbA<sub>5</sub>', se muestran a continuación resultados de mediciones de campo local en HbA y HbS realizadas conjuntamente con el Lic. en Física Yunió Cabrales Fontela, del Centro de Biofísica Médica de la Universidad de Oriente de Cuba, durante su estadía en el LaRTE. Utilizó la secuencia de spin-lock con supresión de señal de protones de agua libre y el experimento fue realizado en un aparato de campo fijo con imán Bruker-BE10 y una consola Stelar Spinmaster. La temperatura de la muestra durante la medición fue de (36 ± 1) °C. Los resultados con sus respectivos ajustes en 5 muestras de HbA se muestran en el gráfico 3.30.

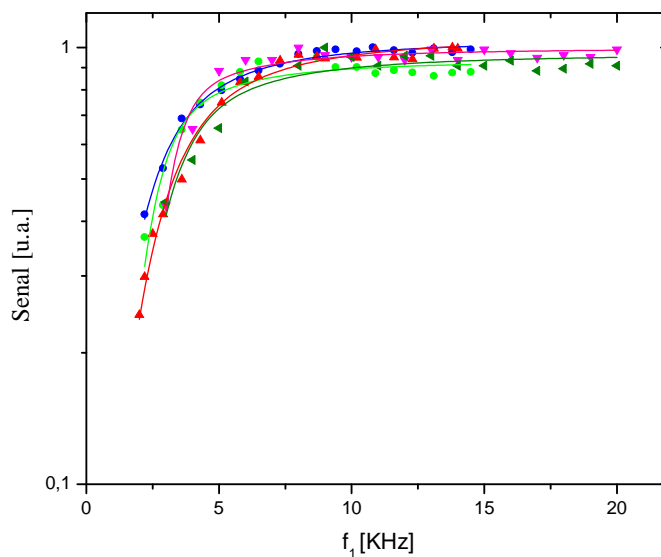


Gráfico 3.30. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para HbA en resonancia, a  $T=36^{\circ}\text{C}$ .

A partir del ajuste de las diferentes curvas experimentales utilizando la ecuación 3.2, se determinó que el campo local  $B_{Lz}$  tiene un valor de  $(2,8 \pm 0,2)$   $\text{KHz}$  mientras que el tiempo de relajación dipolar  $T_d$  fue de  $(2,0 \pm 0,8)$   $\text{ms}$ .

En caso de la Hb S se midieron campos locales antes y después de la polimerización en 5 muestras. Los resultados con sus correspondientes ajustes se muestran en los gráficos 3.31 y 3.32. Los valores obtenidos para  $B_{Lz}$  y  $T_D$  fueron  $(3,9 \pm 0,2)$   $\text{kHz}$  y  $(0,13 \pm 0,04)$   $\text{ms}$  respectivamente, para HbS antes de la polimerización, mientras que para HbS después de la polimerización fueron de  $(3,1 \pm 0,2)$   $\text{kHz}$  y  $(0,028 \pm 0,007)$   $\text{ms}$ .

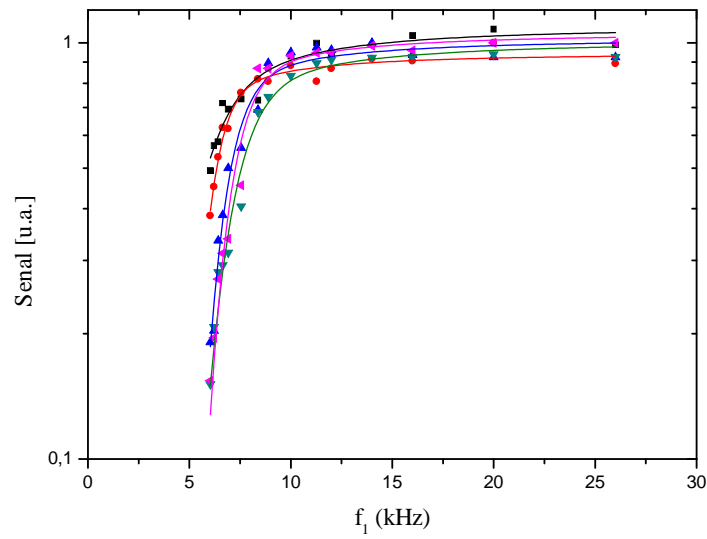


Gráfico 3.31. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para HbS en resonancia, a  $T=36^{\circ}\text{C}$ , y antes de la polimerización.

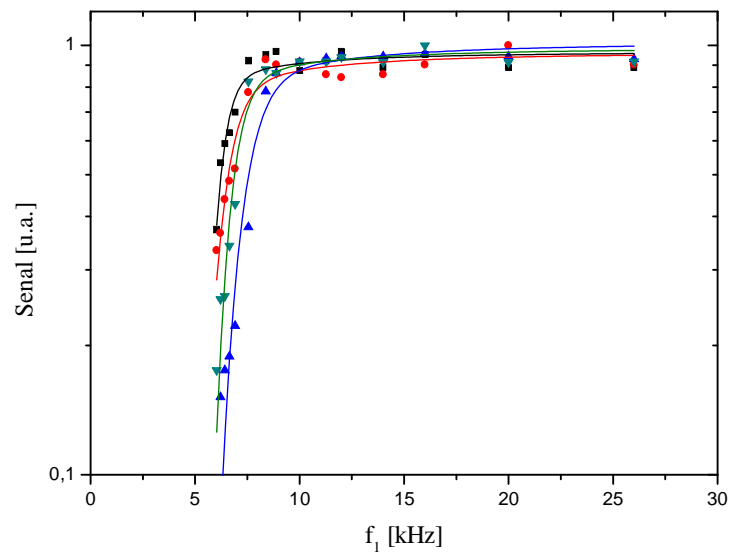


Gráfico 3.32. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para HbS en resonancia, a  $T=36^{\circ}\text{C}$ , y después de la polimerización.

### 3.3.6. Cromatografía de filtración molecular

Se consideró una muestra de HbA, denominada HbA<sub>6</sub>, la cual fue preparada de la forma descrita en la sección 3.1 habiendo sido congelada para hemólisis durante 17 hs a T= -20°C.

Luego, la muestra fue centrifugada a 50.000 rpm durante 1h a T = 30°C para eliminar cualquier agregado de moléculas o restos de membranas de glóbulos que pudieran haber quedado, pues partículas de tamaño grande no pasan directamente por la columna. Se tomó el sobrenadante así obtenido. Posteriormente, este sobrenadante fue diluido con agua dado que muestras muy viscosas, como es el caso de la Hb, tampoco pasan por la columna. Se utilizó una columna cromatográfica de filtración molecular Superdex 200 HR 10/30, de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC. Se hizo pasar la muestra por la columna una vez durante tres días consecutivos. El primer día pasó toda la muestra sin problema, el segundo día quedó la gran mayoría de esta atascada en la parte superior de la columna, sin poder pasar. El tercer día se le agregó una solución de CoCl<sub>2</sub>, lo cual hizo posible que la muestra atravesara la columna.

### 3.3.7. Filtración por centrifugación

Se preparó una nueva muestra de Hb A denominada HbA<sub>7</sub> la cual fue preparada de la forma descrita en la sección 3.1 pero fue hemolisada por exposición en aire líquido a T = -200°C durante 1min. Luego, la muestra fue centrifugada a 50.000 rpm durante 30 min a T = 8°C para eliminar cualquier agregado de moléculas o restos de membranas de glóbulos que pudieran haber quedado. Se tomó el sobrenadante (SN) así obtenido. Posteriormente, este sobrenadante fue diluido con agua en una proporción 1:10, es decir, del volumen total de solución solo el 10% era Hb. Luego, la muestra fue pasada por dos tipos de filtros (centricones), uno de ellos que dejaba pasar partículas con peso molecular menor a 3.000 y el otro con peso molecular menor a 100.000. Para llevar a cabo estas filtraciones se sembraron las muestras en el extremo superior de estos dos tipos de filtros y luego fueron centrifugados a 6500 rpm para acelerar el proceso de filtración, durante 12 min el filtro de 100.000 y 52 min el de 3000.



Una vez terminada la filtración por centrifugación, a los retenidos (R) y eluidos (E) así obtenidos se les hizo un espectro de absorción de radiación ultravioleta (UV) para identificar de que estaban compuestos. Para cada una de estas mediciones se hicieron duplicados denotándolos como A y B. Este experimento, incluyendo filtración con el posterior espectro UV, se realizó dos veces separadas temporalmente en 24 hs. En el gráfico 3.33 se muestran los resultados, en el cual solo aparecen los correspondientes a absorbancia para los retenidos (RA100 y RB100) y eluidos (EA100 y EB100) obtenidos del filtro de peso molecular menor a 100.000 pues, en el de 3000, no se diferenció el retenido del sobrenadante sembrado en el filtro (RA300=RB300 = SN).

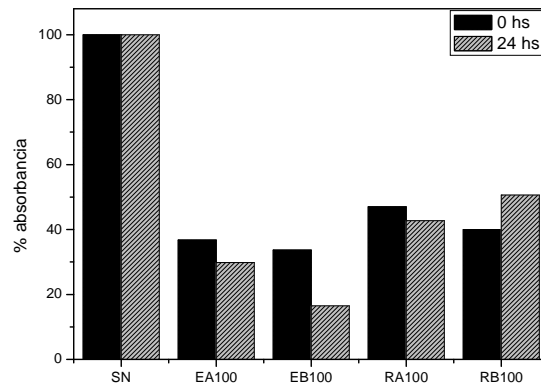


Gráfico 3.33. Porcentaje de absorbancia para eluidos (E) y retenidos (R) obtenidos de la filtración por centrifugación en HbA<sub>7</sub> utilizando filtros que dejan pasar partículas de peso molecular menor a 100.000.

Notar que, para cada muestra las barras de eluido mas la de retenido deberían sumar la correspondiente a SN, pero no es así debido a que siempre se pierde parte de la muestra en el filtro. Se puede observar que tanto para EA100 como EB100, porcentualmente son menores a las 24hs respecto a su valor a las 0 hs.

### 3.3.8. Espectroscopía infrarroja

Se consideró parte de la muestra HbA<sub>12</sub> inmediatamente después de ser preparada. Fue diluida con D<sub>2</sub>O en la proporción 1:10 (10 µl de Hb por cada 100µl de D<sub>2</sub>O) para luego monitorear los cambios que se van produciendo en el pico de la amida II (asociada a vibraciones de tensión del enlace N-H del grupo amida) del espectro de IR con los consecutivos intercambios de H de los grupos amida de la proteína con D del D<sub>2</sub>O, determinando así la tasa de intercambio.

Se realizó este experimento, registrando los cambios en el espectro IR cada 5 min durante 1h a 3hs, de dos a tres veces al día durante 4 días consecutivos, con lo cual se determinaron las tasas de intercambio en los siguientes tiempos, contados a partir de que la muestra HbA<sub>12</sub> fue preparada: 2hs (120 min), 6hs (360 min), 9hs (540 min), 26hs (1560 min), 31hs (1860 min), 50hs (3000 min), 56 hs (3360 min) y 74 hs (4440 min). La muestra de Hb sin diluir con D<sub>2</sub>O fue conservada a 37°C entre experimentos de diferentes días.

Los espectros IR fueron medidos con un espectrómetro FT-IR Nicolet Nexus de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC, usando una celda desmontable para muestras líquidas construida de CaF<sub>2</sub>, la cual posee 75 µm de un espaciador de teflón. El compartimento que contenía la muestra fue continuamente purgado con aire seco para eliminar el vapor de agua que produce distorsiones en el espectro. Los espectros obtenidos fueron resultado de una promediación de 50 mediciones.

En el gráfico 3.34 se muestran los espectros medidos para HbA<sub>12</sub> a t = 6hs de haber sido preparada, en el cual se aprecian las variaciones en el pico amida II.

Para los tiempos restantes se obtuvieron espectros similares. Posteriormente, se hicieron ajustes exponenciales de las curvas de evolución del valor pico de la amida II para cada tiempo de medición. La ecuación de ajuste fue de la forma:  $y = A_1 * \exp(x/t_1) + y_0$ , donde  $x$  es el tiempo del experimento e  $y$  el valor pico. Los resultados se muestran en la tabla 3.1. En el gráfico 3.35 aparece la curva de evolución del valor pico de la amida II para t = 6hs, con su correspondiente ajuste. Curvas similares se obtuvieron para los restantes tiempos.

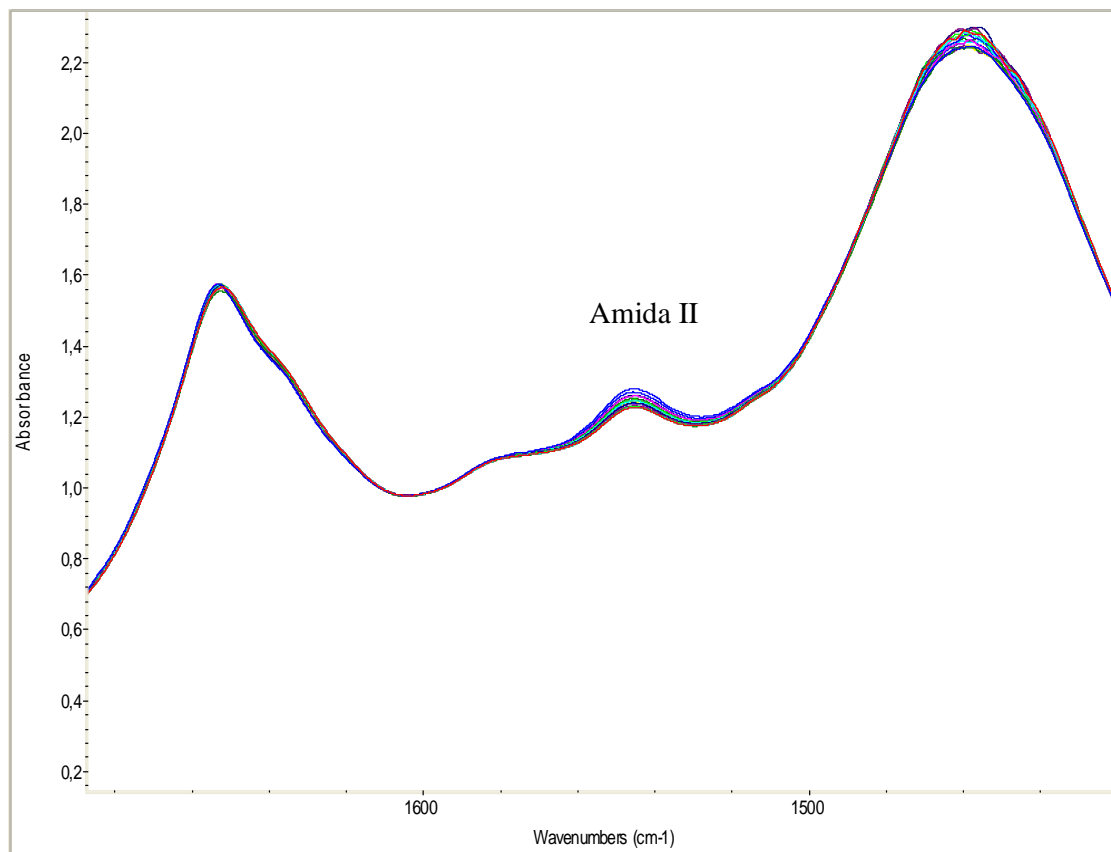


Gráfico 3.34. Espectros de IR para HbA<sub>12</sub> a t = 6hs de haber sido preparada. Se muestra la evolución del pico amida II cada 5 minutos durante 1h y 30 min.

t	Constante de decaimiento t <sub>1</sub>	Error cte decaim.
[min]	[min]	[min]
120	28	3
360	35	5
540	35	4
1560	45	8
1860	24	2
3000	25	2
3360	18	2
4440	29	3

Tabla 3.1. Constante de decaimiento t<sub>1</sub> del valor pico de la amida II, asociada a la tasa de intercambio entre H amidas y D del D<sub>2</sub>O.

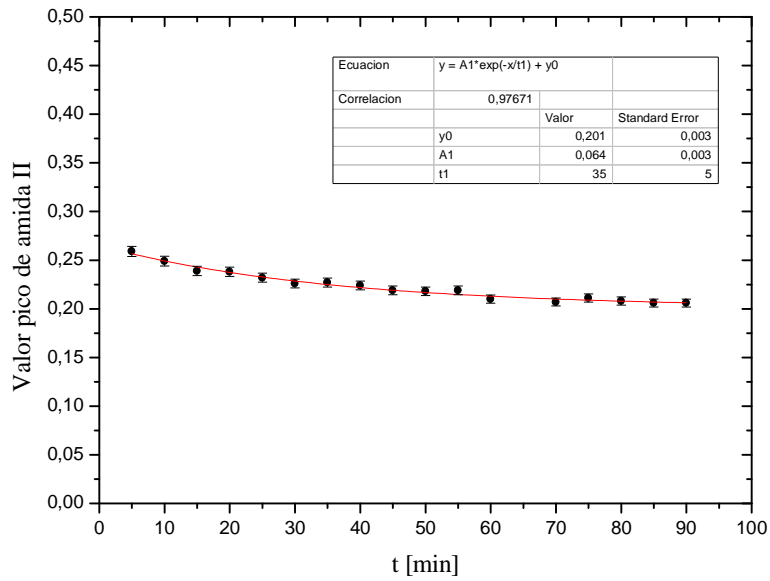


Gráfico 3.35. Valor del pico de la amida II en función del tiempo para HbA<sub>1c</sub> a t =6 hs.

Del gráfico 3.35 puede concluir que el decaimiento del valor pico de la Amida II es exponencial. Por último, se muestra en el gráfico 3.36 los valores de  $t_1$  que aparecen en la tabla 3.1 en función del tiempo.

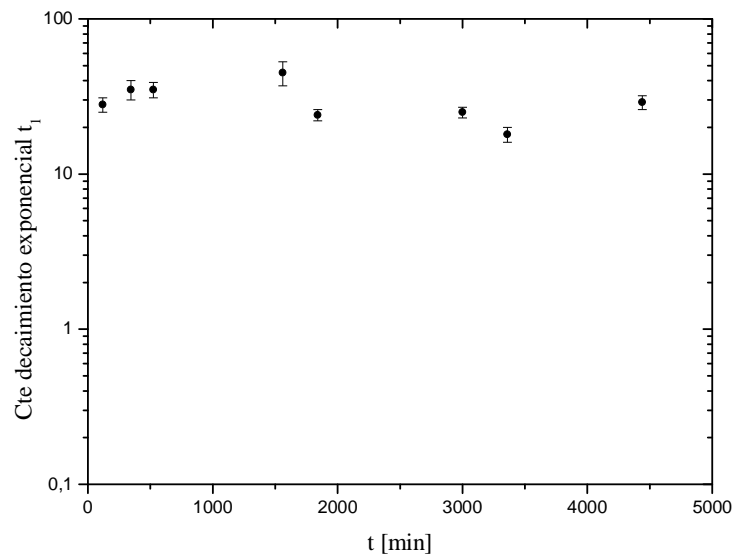


Gráfico 3.36. Constante de decaimiento  $t_1$  del valor pico de la amida II en función del tiempo.

Del gráfico 3.36, se puede observar que no existen variaciones temporales en la constante de decaimiento exponencial del valor pico de la Amida II, dentro del error experimental y en el rango temporal considerado.

# Capítulo 4

## Análisis e interpretación de resultados

En este capítulo se presenta, en primer lugar, el análisis cuantitativo de las mediciones relacionadas a los campos locales de las muestras de gelatina porcina y clara de huevo durante procesos de desnaturalización. Luego, se muestran el análisis cualitativo e interpretación de los resultados relacionados a la evolución temporal de  $T_{IF}$  en Hb A, incluyendo no solo el análisis de las curvas  $T_{IF}$  vs.  $t$  sino también el de los resultados obtenidos con la cromatografía de filtración molecular, filtraciones por centrifugación y espectroscopía de infrarrojo. Por último, se presentan el análisis cuantitativo e interpretación de las mediciones de campo local de las muestras de Hb A.

### 4.1. Estudio de campos locales en gelatina porcina

Considerando la curva mostrada en el gráfico 3.8 del capítulo 3 correspondiente a una muestra de gelatina en polvo, se procedió a calcular el valor de campo local. Se estima de antemano que no es cero debido a que se observa una disminución de alrededor del 70 % en la señal a medida que la frecuencia disminuye.

Se intentó utilizar la ecuación (3.2) para realizar el ajuste de los puntos medidos, pero no fue posible dado que como se trata de un sólido, el valor del campo local puede

ser muy alto y por lo tanto se necesitaría más información a frecuencias altas (mayores a 50 kHz). En nuestro caso, se necesitarían mediciones de señal a frecuencias mayores a 60 kHz pues la curva del gráfico 3.8 sugiere un valor entre 30 y 60 kHz para  $B_{Lz}$ .

Por otro lado, considerando los resultados para gelatina desnaturalizada (gráficos 3.9 y 3.10), se concluye que el campo local es muy débil, ya que la señal medida no presenta variaciones, dentro del error de medición, en el rango de frecuencias consideradas. Luego, podemos decir que, en la nueva fase de gel que adquieren las proteínas presentes en gelatina (como consecuencia de la desnaturalización), los campos locales se promedian.

## 4.2. Estudio de campos locales en ovoalbúmina

De los gráficos 3.11 y 3.12 se concluye que tanto para la ovoalbúmina nativa como desnaturalizada, el campo local es muy débil, debido a que la señal medida no presenta variaciones, dentro del error de medición, en el rango de frecuencias consideradas. Luego, podemos decir que la desnaturalización de esta proteína lleva a cambios en la estructura de la misma que no influyen apreciablemente en el valor del campo local. Del gráfico 3.13, en el cual se ven las curvas de  $T_1$  en función de la frecuencia (en el rango de frecuencias de 10 kHz a 100 kHz), las cuales son muy distintas para la proteína nativa y desnaturalizada, podemos concluir que la dinámica molecular es diferente para cada caso. Esto podría verse reflejado en valores desiguales de campos locales en los dos estados. Sin embargo, las mediciones de campo local se hicieron a 38°C mientras que el estudio de  $T_1(\nu)$  fue a 19°C. Debería hacerse un estudio de campo local en función de la temperatura de la muestra, para ver si las diferencias en el comportamiento dinámico son reflejadas en el campo local. De hecho, mediciones de campo local realizadas a 25°C conjuntamente con el Lic. en Física Yuniór Cabrales Fontela, del Centro de Biofísica Médica de la Universidad de Oriente de Cuba, durante su estadía en el LaRTE, si muestran diferencias en el caso de la proteína nativa y desnaturalizada. Estos resultados indican entonces que, en aquellos casos donde la dinámica molecular es eficiente en promediar los campos locales, los experimentos de  $T_1$  pueden ser extendidos a frecuencias muy bajas. Si bien, el experimento de relaxometría en el sistema rotante puede ser poco sensible a los cambios asociados a diferentes configuraciones estructurales de las proteínas,  $T_1$  si lo es. Pero el

experimento en el sistema rotante garantiza que podemos medir  $T_1$  hasta frecuencias de Larmor de hasta unos pocos kHz.

### 4.3. Análisis de las curvas de evolución temporal de $T_{1F}$ y $T_{1M}$ en Hb A

De las curvas de evolución temporal de  $T_{1F}$  obtenidas experimentalmente para Hb A a  $T=36,7^\circ\text{C}$ , mostradas en el gráfico 3.17, se observan dos partes con características marcadamente diferentes.

En la primera parte, el valor de  $T_{1F}$  disminuye con el tiempo hasta alcanzar un mínimo. El valor inicial de  $T_{1F}$ , es decir, el correspondiente a  $t = 0$  min, varía, aún para el mismo donante. Ello depende de cuánto tiempo transcurrió desde la descongelación de la muestra, tal que mientras más tiempo pase a partir de la hemólisis y antes de la medición del primer valor de  $T_{1F}$ , más bajo es el valor inicial de  $T_{1F}$ . Esto se observa en el hecho de que aún para el mismo donante el valor inicial de  $T_{1F}$  varía de 361 ms para Hb A<sub>5</sub> a 404 ms para Hb A<sub>5</sub>'. El tiempo para el cual se alcanza el mínimo de  $T_{1F}$  fue en promedio de  $(1300 \pm 100)$  min, lo cual corresponde a aproximadamente 22 hs y el valor de  $T_{1F}$  para este tiempo fue de  $(147 \pm 4)$  ms. Esto da una disminución de aproximadamente de un 60% en  $T_{1F}$  respecto a su valor inicial.

Por otro lado, en la segunda parte de la curva el valor de  $T_{1F}$  aumenta con el tiempo hasta el tiempo promedio de  $(3700 \pm 100)$  min (62 hs) en el cual se estabiliza en un valor de  $(215 \pm 8)$  ms, diferente del valor inicial.

Esta evolución temporal en  $T_{1F}$  sugiere que la tasa de intercambio entre moléculas de agua libres y ligadas a la proteína está cambiando (considerando a este intercambio como el principal mecanismo de relajación), incrementándose temporalmente la eficiencia de este mecanismo en la primera parte de la curva y disminuyendo, hasta un valor de saturación, en la segunda parte de la curva. Lo más probable es atribuir esta variación en la tasa de intercambio a algún tipo de cambio de estructura en la Hb que modifica el área de exposición de la proteína al agua, siendo mayor en el primer tramo y menor en el segundo. Esto podría estar asociado a algún proceso que es disparado al extraer la proteína del glóbulo.

El posible cambio de estructura de la proteína, está directamente asociado a cambios en la oxigenación de la Hb, a su vez avalado por el cambio de color de la muestra (Fig.



2.3), y con el cambio de viscosidad, apreciándose la formación de un tipo de “gel” a partir del mínimo de la curva [14-19].

Antes de intentar estimar de qué tipo de proceso se trata, analicemos la influencia de los diferentes factores externos en la evolución temporal de  $T_{1F}$  dada por los gráficos 3.18 al 3.22.

#### **4.3.1. Influencia del modo de congelación para la hemólisis en $T_{1F}$ vs t**

De las curvas de evolución temporal de  $T_{1F}$ , mostradas en el gráfico 3.18, en donde se analiza el efecto del modo de congelación en la curva  $T_{1F}$  vs. t, se observa el mismo comportamiento general que para las muestras HbA5, HbA5' y HbA8'. Existe dispersión en los valores iniciales y mínimos de  $T_{1F}$ , y el tiempo correspondiente al mínimo, dependiendo en este caso, no solo de la elección de  $t = 0$  min como se mencionó antes, sino también del donante. Así mismo, podemos decir que el comportamiento general de  $T_{1F}$  no depende significativamente del método de congelación para hemólisis, es decir, congelar en freezer a  $T = -20^{\circ}\text{C}$  durante 21 hs o solo unos minutos de exposición al aire líquido a  $T = -200^{\circ}\text{C}$ .

La forma de la curva de la muestra HbA8'' indica que este proceso de evolución de  $T_{1F}$  comienza en el momento en el cual se practica la hemólisis, lo cual ocurre durante la congelación, pero en forma bastante lenta en comparación de cómo lo hace para  $T=36,7^{\circ}\text{C}$ . Así, los valores de  $T_{1F}$  que se obtengan luego de la descongelación son dependientes del tiempo de congelación. Esto se evidenció en HbA8'', debido a que estuvo bajo congelación (50 hs) más del doble de tiempo empleado habitualmente (21 hs).

Luego, podemos decir que la evolución temporal de  $T_{1F}$  no depende ni de la temperatura ni de la forma de congelación, pero si del tiempo de congelación. En otras palabras, la muestra congelada ya evoluciona durante dicho estado.

#### **4.3.2. Influencia de agitaciones, refrigeración y congelación en $T_{1F}$ vs t**

De los gráficos 3.19 y 3.20, se puede apreciar que el agitar la muestra de Hb A en las proximidades del mínimo y en tiempos posteriores, altera la evolución temporal de  $T_{1F}$ . Se observa que, luego de cada agitación,  $T_{1F}$  toma valores que tenía para tiempos antes del agitación. Asimismo, la evolución temporal de  $T_{1F}$  no es inhibida, sino que es retrasada, alcanzando el mínimo a los  $(2820\pm 5)$  min (47 hs) en promedio (gráfico 3.20). Con esto

podemos decir que el agitar la muestra durante su evolución a 36,7°C retrasa el proceso observado en  $T_{IF}$  pero no lo inhibe.

Por otra parte, de los gráficos 3.19 al 3.21 se puede observar que el refrigerar y/o congelar la muestra durante la evolución, retrasan el proceso. Esto se evidencia en el gráfico 3.21, en el cual aún a los 16000 minutos (aproximadamente 267 hs) no se ha alcanzado el mínimo, y en los gráficos 3.19 y 3.20, el valor de  $T_{IF}$  conserva el valor que tenía antes de la congelación o refrigeración, respectivamente, sin continuar su posible evolución. Concluimos que las bajas temperaturas retrasan parcialmente la evolución temporal de  $T_{IF}$ , pero no la inhiben.

#### **4.3.3. Influencia de una centrifugación a 50.000 rpm al inicio de la curva $T_{IF}$ vs t**

Del gráfico 3.22 se observa que la curva de evolución de  $T_{IF}$  tiene las mismas características generales de las curvas obtenidas sin la centrifugación inicial, mostradas en el gráfico 3.17. La diferencia principal que muestra el gráfico 3.22 es que los últimos valores medidos de  $T_{IF}$  superan a los iniciales en más de 100 ms, comportamiento que nunca antes se había observado. La centrifugación inicial a 50.000 rpm de la muestra altera principalmente la segunda parte de la curva, en coincidencia al hecho de que la muestra conserva su estado de fluidez inicial a lo largo de todo el experimento, es decir, no llega a formarse el “gel” que se observaba en todos los casos anteriores, luego del mínimo de la curva.

Concluimos que la centrifugación inicial a 50.000 rpm de la muestra inhibe en cierto punto la “gelificación” que observábamos en la Hb centrifugada inicialmente a 2500 rpm. Este resultado sugiere que en dicha centrifugación se eliminan clusters y grupos moleculares que poseen un rol protagónico en el proceso de gelificación.

#### **4.3.4. Discusión del posible proceso que ocasiona la evolución temporal de $T_{IF}$**

Con la intención de deducir el proceso que pudiera estar ocasionando la evolución de  $T_{IF}$  con el tiempo, una vez que la Hb es extraída del glóbulo, consideramos lo siguiente.

En las mediciones de  $T_{IM}$  en función del tiempo en Hb A (gráficos 3.23, 3.24 y 3.25),  $T_{IM}$  sigue un comportamiento que intenta reproducir el obtenido para  $T_{IF}$ , por lo menos en los gráficos 3.23 y 3.24, pero con una variación temporal respecto a su valor

inicial mucho menor (no supera el 30%). Esto nuevamente sugiere que la tasa de intercambio, ahora entre moléculas de DOH libres y ligadas a la proteína, está cambiando, incrementándose temporalmente la eficiencia de este mecanismo en la primera parte de la curva y disminuyendo, hasta un valor de saturación, en la segunda parte de la curva. La variación de  $T_{1M}$  no tan pronunciada como en el caso de  $T_{1F}$  es debida a la menor población de DOH respecto al  $H_2O$ , en estados libres y ligados a la Hb. Una vez más, esto nos da la idea de algún tipo de cambio de estructura de la proteína, con la consecuente modificación del área de exposición de la misma al DOH, en este caso.

Los resultados de los espectros de IR (gráfico 3.36), permiten observar que no existen variaciones temporales en la constante de decaimiento exponencial del pico de Amida II. Esto implica que, durante el proceso que ocasiona la evolución temporal de  $T_{1F}$ , *no hay cambios en la estructura secundaria de la Hb*, lo cual no elimina la posibilidad de cambios en la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína.

Como se mencionó previamente, a la evolución temporal de  $T_{1F}$  la acompaña un cambio en el color de la Hb, partiendo de un color rojo intenso a  $t = 0$  min y terminando luego del mínimo con un color bordó oscuro. Sabemos que el color de la Hb está íntimamente relacionado a su condición de oxigenación (Fig. 2.3), presentando un aspecto rojo o escarlata intenso cuando está oxigenada y un color rojo oscuro o bordó cuando está desoxigenada. A esto, sumamos el hecho de que en este trabajo se usaron muestras de sangre venosa, la cual transporta Hb que ya liberó el oxígeno a los tejidos y está saturada entre un 30 % a un 70% dependiendo si se trata de tejidos activos o en reposo, respectivamente (Fig. 2.7).

La evolución temporal de  $T_{1F}$  es acompañada por un cambio de viscosidad de las muestras de Hb A, alcanzando la máxima viscosidad aproximadamente al pasar el mínimo de la curva, apreciándose la formación de un algún tipo de “gel”. Esto es consistente con los resultados de la cromatografía de filtración molecular y filtraciones por centrifugación, en las cuales se observa que, a las 24 hs de preparación de la Hb (luego de pasar levemente el mínimo de la curva  $T_{1F}$  vs.  $t$ ), se produce algún tipo de agregación de moléculas de la proteína. En el caso de la cromatografía, la columna no permitió pasar la mayoría de la muestra para este tiempo, indicando la presencia de partículas muy grandes, que directamente no pueden atravesar la columna. En el caso de las filtraciones, se observa del gráfico 3.33 que el eluido (cantidad de muestra que es filtrada) es menor a las

24 hs respecto al medido a las 0 hs. Luego, podemos decir que este proceso de agregación o “gelificación” comienza en el momento en que la muestra de Hb es preparada y es completado en el tiempo correspondiente al mínimo de la curva  $T_{1F}$  vs.  $t$ . Así mismo, este proceso de agregación de moléculas de Hb es lo suficientemente débil como para ser revertido. Esto se puede apreciar de los resultados de la cromatografía donde la mezcla de la solución de  $\text{CoCl}_2$  con la muestra de Hb atascada en la parte superior de la columna, le permitió pasar a esta última, tal vez por efecto de fuerza iónica. Además, de los resultados para Hb A centrifugada a 50000 rpm analizados en la sección 4.3.3 tenemos que, con una centrifugada intensa, esta “gelificación” se destruye parcialmente.

Finalmente, considerando estos cuatro resultados experimentales, sumado a resultados obtenidos por otros autores [14-22], permiten deducir, en primera instancia, que el proceso que es disparado al extraer la proteína del glóbulo es una desoxigenación espontánea de la Hb A. En realidad, una desoxigenación del 30% al 70%, según corresponda, de la Hb presente en la muestra, por provenir de sangre venosa. Esta desoxigenación produce cambios en las estructuras terciaria y cuaternaria de la HbA, con la posible dimerización del tetrámero de Hb, exponiendo así la proteína una mayor superficie a las moléculas de agua, y aumentando en consecuencia la tasa de intercambio de moléculas de agua que van desde la superficie de la proteína al “bulk” o volumen. Este proceso se completa al momento en que  $T_{1F}$  toma su valor mínimo, es decir, en promedio a los  $(1300 \pm 100)$  min (22 hs). Esto explica la primera parte de la curva.

La segunda parte de la curva puede ser explicada por una gelificación débil asociada con la afinidad de los dímeros de Hb. Este proceso reduce el área de las proteínas expuestas al agua, haciendo menos eficiente el mecanismo de intercambio entre agua libre y ligada, con el consecuente incremento de  $T_{1F}$ . La evolución observada se completa al momento en que  $T_{1F}$  toma un valor de saturación, es decir, en promedio a los  $(3700 \pm 100)$  min (62 hs).

Es importante mencionar que otros autores [7] han observado en Hb A bajo desoxigenación espontánea, leves decaimientos en los tiempos de relajación en rangos temporales que no superan los 800 min, siendo mucho menores a los contemplados en este trabajo. Esto fue adjudicado al cambio de magnetismo de la Hb, pasando de diamagnética cuando está oxigenada a paramagnética cuando está desoxigenada. Este

cambio de magnetismo no ha sido considerado en este trabajo, pero será tenido en cuenta en posteriores estudios.

## 4.4. Estudio de campos locales en hemoglobina A

Considerando la curva mostrada en el gráfico 3.14 del capítulo 3 correspondiente a una muestra de Hb A (Hb A<sub>1</sub>), se procedió a calcular el valor de campo local, el cual se estima de antemano que no es cero debido a que se observa una disminución de alrededor del 20 % en la señal a medida que la frecuencia disminuye. Para ello se utilizó la ecuación (3.2). Se hicieron varios ajustes fijando  $T_D$  y dejando como parámetro libre  $B_{Lz}$  y se encontró que la dependencia de  $B_{Lz}$  con  $T_D$  era despreciable en un amplio rango de valores de este último. Por esta razón, se decidió fijar su valor en  $T_D = (10 \pm 5)$  ms, el mínimo valor del rango de este parámetro para el cual  $B_{Lz}$  era el más apropiado a la curva medida. En el gráfico 4.1 se muestran los resultados para Hb A<sub>1</sub> a 38°C con su correspondiente curva de ajuste para una duración del pulso de lock  $\tau = 5$  ms,  $M_0=1$ ,  $T_b = 100$  ms y  $T_D = 10$  ms. Del ajuste se obtuvo  $B_{Lz} = (1,3 \pm 0,1)$  kHz.

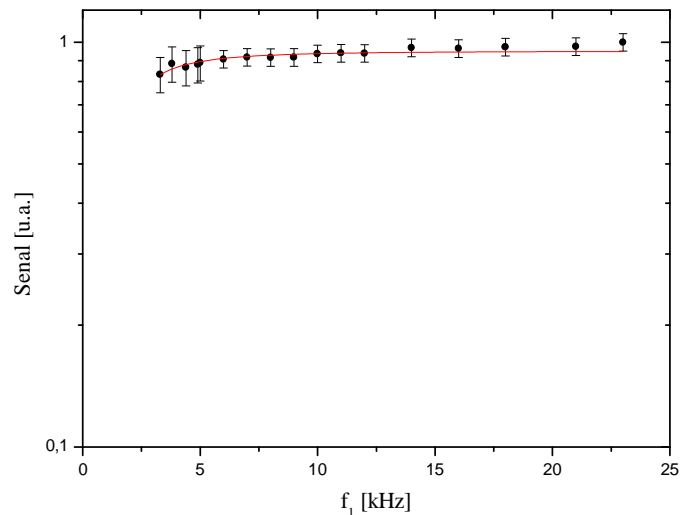


Gráfico 4.1. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para Hemoglobina A humana (HbA<sub>1</sub>), en resonancia, a T=38°C y  $T_{IF} = 230$  ms ( $t = 0$  min). El ajuste arrojó el valor de campo local  $B_{Lz} = (1,3 \pm 0,1)$  kHz.

Procediendo de forma análoga, se hicieron los correspondientes ajustes con las curvas experimentales de los gráficos 3.15 y 3.16, obtenidas para Hb A<sub>2</sub> en dos valores diferentes de T<sub>IF</sub>. Se usaron los mismos parámetros que en Hb A<sub>1</sub> excepto T<sub>D</sub> que fue fijado en (100 ± 50) ms usando el mismo criterio antes mencionado. En los gráficos 4.2 y 4.3 se muestran los resultados para Hb A<sub>2</sub> a 38°C con sus correspondientes curvas de ajuste.

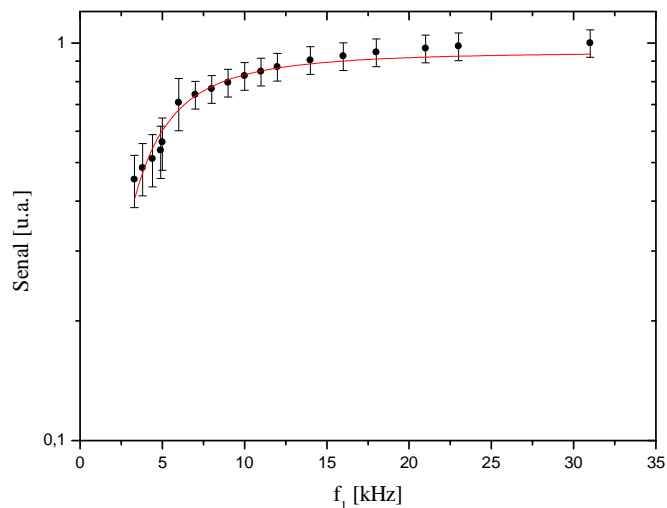


Gráfico 4.2. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para Hemoglobina A humana, (HbA<sub>2</sub>) en resonancia, a T=38°C y T<sub>IF</sub>= 289 ms (t= 0 min) El ajuste arrojó el valor de campo local B<sub>Lz</sub> = (3,9 ± 0,1) kHz.

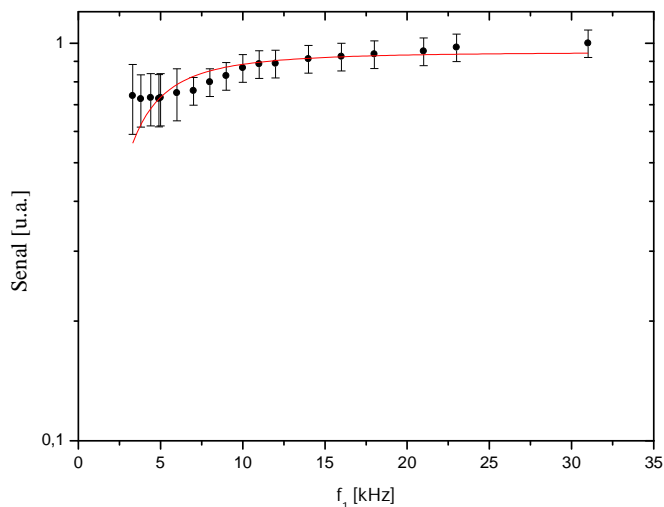


Gráfico 4.3. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para Hemoglobina A humana, (HbA<sub>2</sub>) en resonancia, a T=38°C y T<sub>IF</sub>= 245 ms (t = 2640 min). El ajuste arrojó el valor de campo local B<sub>Lz</sub> = (2,8 ± 0,2) kHz.

Los valores para los campos locales en Hb A<sub>2</sub> se muestran en la tabla 4.1.

Hb A <sub>2</sub>		
t [min]	T <sub>1F</sub> [ms]	B <sub>Lz</sub> [kHz]
0	289	3,9 ± 0,1
2640	245	2,8 ± 0,2

Tabla 4.1

Por último, se consideraron las curvas de los gráficos 3.26 al 3.29 para Hb A<sub>5</sub>′, cada uno de ellos mostrando la intensidad de la señal en función de la frecuencia del pulso de lock para valores de tiempo elegidos estratégicamente de acuerdo a la evolución temporal de T<sub>1F</sub>. Se observó que, la señal medida no presenta variaciones, dentro del error de medición, en el rango de frecuencias consideradas para las mediciones a t = 555 min (gráfico 3.27), t = 1335 min (gráfico 3.28) y t = 4445 min (gráfico 3.29). Por esta razón no fue necesario hacer ajustes en estos casos, pudiendo concluir directamente que el campo local es muy débil para estos tiempos. Así mismo, en el gráfico 3.29 se observa en la curva medida la tendencia de disminución de la señal para los valores más chicos de frecuencia, dando la idea de que para tiempos mayores a los 4445 min se pudiera establecer un valor de campo local no nulo. Por otro lado, si se hizo el correspondiente ajuste para la medición a t = 0 min (gráfico 3.26) pues se podía apreciar una variación de la señal de alrededor del 20 % a medida que la frecuencia disminuía. Se usaron los mismos parámetros que en Hb A<sub>2</sub>. En el gráfico 4.4 se muestran los resultados para Hb A<sub>5</sub>′ a 36,7°C con su correspondiente curva de ajuste.

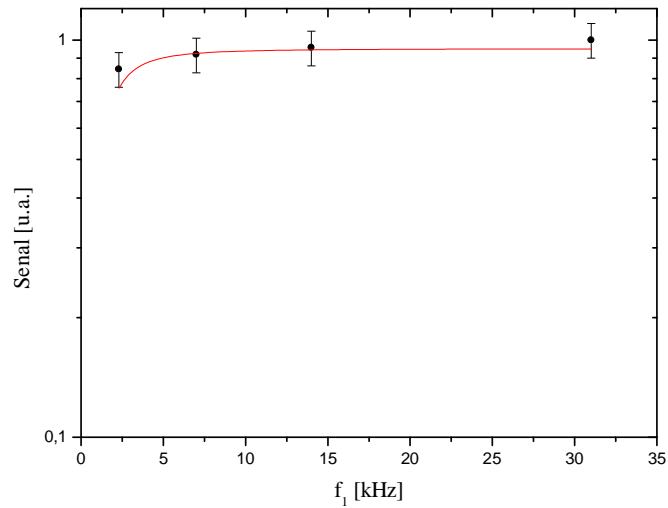


Gráfico 4.4. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para HbA<sub>5</sub>' en resonancia, a T=36,7°C y T<sub>1F</sub>= 404 ms (t = 0 min). El ajuste arrojó el valor de campo local B<sub>Lz</sub> = (1,2 ± 0,2) kHz.

El valor de campo local para HbA<sub>5</sub>' a t = 0 min (T<sub>1F</sub> = 404 ms) fue de (1,2 ± 0,2) kHz. En la tabla 4.2 se muestran los valores de campo local para todas las muestras de Hb A analizadas, con sus correspondientes valores de T<sub>1F</sub> mostrados cronológicamente, donde en todos los casos los valores de t = 0 min corresponden al momento en el cual se realiza la primera medición de T<sub>1F</sub> y de la correspondiente curva de dispersión. En esta tabla se puede observar que a t = 0 min, para todas las muestras, existe un campo local no nulo, cuyo valor depende fuertemente de las condiciones previas a las cuales estuvo sometida la muestra. Notar que estas condiciones previas siempre involucraron tener la muestra a bajas temperaturas (refrigerada o congelada), las cuales retrasan la evolución temporal de T<sub>1F</sub>, como se mencionó en la sección anterior. Luego, dependiendo de si la muestra es dejada evolucionar a 36,7°C o refrigerada, el valor del campo local se anula (HbA<sub>5</sub>' ) o disminuye (HbA<sub>2</sub>), respectivamente. De las mediciones en HbA<sub>5</sub>' que se extienden para tiempos más largos, muestran que el valor del campo local partiendo de un valor no nulo, se anula en el camino al mínimo de la curva T<sub>1F</sub> vs. t, intentando recuperarse a un valor distinto de cero para tiempos bastante mayores al del mínimo (4445 min).

Finalmente, podemos concluir que durante el proceso de desoxigenación espontánea, con su consecuente gelificación, al cual es expuesta la Hb A genera cambios en el valor del campo local. En el primer tramo de la curva T<sub>1F</sub> vs. t, se produce un cambio



de estructura en la proteína que modifica el valor de campo local inicial, a tal punto que el valor resulta muy bajo. Luego de pasar el mínimo de dicha curva, en donde empieza a tener relevancia la nueva estructura gelatinosa débil que se está formando por afinidad de los dímeros de Hb, la muestra no tiene asociado un valor de campo local no nulo, al menos en los tiempos medidos. Así mismo, se estima que si el rango temporal es ampliado, el campo local toma un valor no nulo correspondiente a la nueva estructura de gel que se ha conformado, de acuerdo a los resultados de HbA<sub>5</sub>'.

VALORES DE CAMPO LOCAL PARA Hb A				
muestra	t [min]	T <sub>IF</sub> [ms] Error 4ms	B <sub>Lz</sub> [kHz]	Características del experimento
HbA <sub>2</sub>	0	289	3,9 ± 0,1	Congelada para hemólisis durante 127 hs. Entre cada medición a 38 °C se refrigeró la muestra.
	2640 (antes del mínimo)	245	2,8 ± 0,2	
HbA <sub>1</sub>	0	230	1,3 ± 0,1	Muestra preparada y conservada congelada por dos meses. Medición a 38°C.
HbA <sub>5</sub> '	0	404	1,2 ± 0,2	Congelada para hemólisis durante 21 hs. Entre cada medición la muestra se mantuvo a 36,7°C. Cada medición fue realizada a esta temperatura.
	555	252	indistinguible	
	1335 (mínimo)	149	indistinguible	
	4445	238	tendencia a un valor no nulo	

Tabla 4.2.

Por otro lado, los valores de campo local para 5 muestras de Hb A del gráfico 3.30, cuyos valores de T<sub>IF</sub> varían en el rango de 200 ms a 300 ms a t = 0 min, no se corresponden con los obtenidos en la tabla 4.2. Pues, el valor promedio de campo local que se obtuvo de (2,8 ± 0,2) kHz para estas 5 muestras no se encuentra en el mismo rango que los obtenidos para t = 0min mostrados en la tabla 4.2. Esto puede deberse a

variaciones en la elección de  $t = 0$  min y de las condiciones previas a las cuales se sometió la muestra.

Por último, de los gráficos 3.31 y 3.32, se puede decir que la polimerización de la Hb S bajo desoxigenación espontánea lleva a una disminución del valor del campo local.

Así pues, mientras una desoxigenación espontánea en Hb S lleva a una polimerización de la misma con la consecuente disminución del campo local, en Hb A genera el mismo efecto en  $B_{Lz}$  por medio de modificar la estructura de la proteína con una consecuente gelificación. Cabe aclarar que el proceso descrito en Hb A, también puede estar ocurriendo en Hb S (lo que se debe verificar), pero las escalas de tiempo de estos dos procesos son muy diferentes.

# Capítulo 5

## Conclusiones

Motivados originalmente por la idea de estudiar el característico proceso de polimerización en Hb S por medio de técnicas de RMN, este trabajo permitió estudiar otros procesos que también involucran cambios conformacionales en diferentes sistemas proteicos, principalmente Hb A.

A través de las mediciones del tiempo de relajación espín-red de protones en función del tiempo, y de los experimentos de cromatografía de filtración molecular, filtraciones por centrifugación y espectroscopía de infrarrojo realizadas en Hb A, sumado a resultados obtenidos por otros autores [14-22], se pudo deducir, en primera instancia, que al extraer la proteína del glóbulo se dispara el proceso de desoxigenación espontánea de la Hb A. En realidad, una desoxigenación del 30% al 70%, según corresponda, de la Hb presente en la muestra, por provenir de sangre venosa. Esta desoxigenación produce cambios en las estructuras terciaria y cuaternaria de la HbA, con la posible dimerización del tetramero de Hb, exponiendo así la proteína una mayor superficie a las moléculas de agua de la solución.

Los resultados experimentales permitieron indagar sobre la evolución temporal de  $T_{1F}$ . Un resultado importante es la determinación del tiempo de evolución de cada etapa del proceso. Éste registra un claro cambio de tendencia al momento en que  $T_{1F}$  toma su valor mínimo, el cual ocurre en promedio a los  $(1300 \pm 100)$  min (22 hs). Este valor resulta

independiente del donante y es reproducible dentro de la incerteza para las mismas condiciones de extracción de la Hb A. La evolución que precede al mínimo fue interpretada en términos de una dimerización del tetrámero de Hb A, inducida por el proceso de desoxigenación.

La segunda parte de la curva se interpreta en términos de una gelificación débil por afinidad de los dímeros de Hb. Dicho proceso reduce el área expuesta de las proteínas al agua, haciendo menos eficiente el mecanismo de intercambio entre agua libre y ligada, con el consecuente incremento de  $T_{1F}$ . Este proceso se completa al momento en que  $T_{1F}$  toma un valor de saturación, es decir, en promedio a los  $(3700 \pm 100)$  min (62 hs).

Por otro lado, las mediciones de campo local en el sistema rotante, mostraron sensibilidad bajo procesos que involucran cambios estructurales en proteínas. De hecho, en este trabajo se comprobó en muestras de gelatina y clara de huevo bajo desnaturalización, y Hb S bajo polimerización, que los campos locales se ven alterados. Esto era de esperar dado que se trata de procesos que involucran cambios estructurales importantes en proteínas. Lo mismo se verificó en Hb A bajo desoxigenación espontánea.

Cabe destacar la potencialidad de la RMN de baja resolución para la detección y seguimiento de diferentes procesos evolutivos en macromoléculas de relevancia como la Hb. Los tiempos característicos medidos podrían resultar alterados en casos de Hb mutadas, tal como el caso de la Hb S. Por otro lado, también se pudieron observar las capacidades de la técnica experimental para el estudio de la evolución de muestras sometidas a diferentes ciclos y tratamientos criogénicos.

Finalmente, vale la pena recalcar que este trabajo brinda resultados que abren una vez más el debate sobre la variación en la superficie de exposición por parte de la proteína al solvente, en la transición de oxihemoglobina a desoxihemoglobina [22,23]. Los resultados de este trabajo brindan apoyo a investigaciones realizadas por otros autores que han asociado a la transición de oxihemoglobina a desoxihemoglobina una mayor superficie de exposición por parte de la proteína al solvente y vice versa [22].

Los pasos a seguir para completar este trabajo son:

- 1) Proponer un modelo teórico para la curva de evolución temporal de  $T_{1F}$ .
- 2) Extender los estudios realizados en Hb A a Hb S, para analizar como el proceso de polimerización en Hb S se ve afectado por el descrito en este trabajo para Hb normal.

- 3) Estudiar  $T_1$  en función de la frecuencia de Larmor, en las diferentes etapas del proceso de evolución, de lo cual obtendremos información de los procesos dinámicos que intervienen en la relajación del sistema de espines y del rango de frecuencias en el cual son efectivos, para cada etapa.

---

# Referencias

1. C.P. Slichter, Principles of Magnetic Resonance (Springer Verlag, Berlín, 1978).
2. A. Abragam, The Principles of Nuclear Magnetism (Clarendon Press, Oxford, 1961).
3. O. Galkin, P. G. Vekilov, J. Mol. Biol. **336**, 43-59 (2004).
4. M. Lores, C. Cabal, O. Nascimento, A. M. Gennaro, Appl. Magn. Reson. **30**, 121-128 (2006).
5. A. Fernandez, E. Perez, M. Lorez, J. Losada, Revista Cubana de Química, **14**, 59-63 (2002).
6. Grisel del Toro García, et al, Bioquímica **28** (4), 4-10 (2003).
7. M. Lores, C. Cabal, Appl. Magn. Reson. **28**, 79-84 (2005).
8. R. Kimmich and E. Anoardo, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **44**, 257-320 (2004).
9. J. Perlo, E. Anoardo, Revista Mexicana de Física, **52** (3), 230-237 (2006).
10. J. Perlo, E. Anoardo, Journal of Magnetic Resonance, **181**, 262-270 (2006).
11. F. Bloch, Phys. Rev. **70**, 460 (1946).
12. Brandan Nora, et al, Hemoglobina, Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina. UNNE, (2008).
13. E. R. Huehns, E. M. Shooter, J. Med. Genet. **2**, 48-90 (1965).
14. L. Stryer, Bioquímica, segunda edición. Editorial Reverté, S.A. (1982).
15. R. E. Benesch, R. Benesch, M. E. Williamson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry, **48**, 2071-2075 (1962).
16. G. Viggiano, C. Ho, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry, **76**, 3673-3677 (1979).
17. M. L. Johnson et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biophysics, **81**, 1093-1097 (1984).

18. G. Weber, Protein Interactions (Routledge, Chapman & Hall, Inc. 1992).
19. B. R. Gelin, M. Karplus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Chemistry, **74**, 801-805 (1977).
20. R. E. Benesch et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry, **54**, 535-542 (1965).
21. R. Benesch et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry, **56**, 1268-1274 (1966).
22. A. Bellelli et al, J. Biol. Chem. **268**, 4742-4744 (1993).
23. A. G. Salvay et al, Biophysical Journal **84**, 564-570 (2003).
24. S. Kiihne, R.G. Bryant, Biophys. J. **78**, 2163-2169 (2000).
25. A. Van-Quynh, S. Willson, R.G. Bryant, Biophys. J. **84**, 558-563 (2003).
26. T. R. Linstrom, S. H. Koenig, Journal of Magnetic Resonance, **15**, 344-353 (1974).
27. D. Demus, J. Goodby, G. W.Gray, H.-W. Spiess, V. Vill, Handbook of Liquid Crystals Vol. 2 A: Low Molecular Weight Crystals I (WILEY-VCH Verlag GmbH. D-60469 Weinheim, República Federal de Alemania, 1998).