

INFLUENCIA DEL HEMATOCRITO EN EL TIEMPO DE RELAJACIÓN DE ERITROCITOS Y SOLUCIONES DE HEMOGLOBINAS

Lic. Yulianela Mengana-Torres¹, Dr. Adolfo Fernández-García² 

yulianela.mengana@cbiomed.cu, myulianela@yahoo.com

¹ Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba; ² Facultad de Ciencias Matemáticas y de Computación, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

● Resumen

En este trabajo se hizo una evaluación de la influencia del hematocrito en la preparación de muestras de paquetes de glóbulos rojos y solución de hemoglobinas para buscar la relación de los parámetros que caracterizan el proceso molecular primario con la evaluación clínica y los procedimientos terapéuticos habituales. No obstante, en los trabajos en que se miden y comparan los tiempos de relajación en los paquetes de eritrocitos de pacientes con anemia drepanocítica e individuos sanos no se deja claro la influencia y el aporte del hematocrito a los tiempos de relajación, lo que constituye el problema de esta investigación, ya que para evaluar con precisión el rango característico de valores de los tiempos de relajación de individuos sanos, hay que estandarizar los parámetros de preparación de la muestra dentro de los que se controla el pH, la temperatura, la pureza de la muestra, no así el hematocrito, el cual influye no solo en los tiempos de relajación del paquete de eritrocitos, sino además en las muestras analizadas de solución de hemoglobina. En general se conoce la relación de los pesos moleculares de diferentes proteínas con los tiempos de relajación y las relaciones dadas su concentración entonces debe existir una relación entre la densidad de una solución de hemoglobina y en consecuencia del paquete de eritrocito por lo que suponemos que deberá de existir una correlación indirecta con los tiempos de relajación, constituyendo este aspecto la hipótesis del trabajo.

Palabras clave: anemia de hematíes falciformes o sickleemia, hematocrito, eritrocito.

● Abstract

In this paper, an evaluation of the influence of hematocrit in the preparation of samples of packed red cells and hemoglobin solution to find the relationship of the parameters that characterize the primary molecular process with the clinical assessment and common therapeutic procedures. However, in work which are measured and compared the relaxation times in packs of erythrocytes of patients with sickle cell anemia and healthy individuals do not clear the influence and contribution of hematocrit to the relaxation times, which is our problem as to accurately assess the range of values characteristic relaxation times of healthy individuals, we must standardize the parameters for sample preparation in which controls the pH, temperature, purity of the sample, not and hematocrit which influences not only the relaxation times of the package of erythrocytes, but also in samples of Hb solutions. In general we know the ratio of molecular weights of proteins with different relaxation times and relationships because of its concentration then there must be a relationship between the density of a solution of hemoglobin and erythrocyte pack accordingly and we assume to be indirect correlation to exist with the relaxation times being this aspect of our working hypothesis.

Keywords: sickle cell anemia or sickle cell, hematocrit, erythrocyte.

● Introducción

La anemia de hematíes falciformes o sickleemia, es una patología genética causada por la sustitución del ácido glutámico por la valina en la posición seis de la cadena β de la molécula de hemoglobina /1/ dando lugar a una hemoglobina anómala llamada Hemoglobina S (Hb S). Cuando las moléculas de Hb S se encuentran desoxigenadas tienden a unirse unas a otras formando polímeros. Estos agregados moleculares alargan la célula y le dan un aspecto de media luna lesionando también la membrana celular, de manera que las células se vuelven muy frágiles y son propensas a impedir el curso de la sangre a través de los tejidos causando una disminución adicional de la tensión de oxígeno /2/.

El proceso de polimerización de la Hb S /3,4/ constituye el proceso molecular base de la anemia drepanocítica y es influida por múltiples factores, entre ellos, el porcentaje de oxigenación de la hemoglobina (Hb), la concentración de la HbS, la temperatura, el pH de la solución, y la presencia de otras hemoglobinas. El factor fundamental que determina la polimerización de la Hb S es la presión parcial de oxígeno, porque de ella depende la relación Hb oxigenada – Hb desoxigenada (oxi HbS - desoxi HbS).

Los métodos de resonancia magnética, por sus posibilidades reales para el estudio del mundo biológico, han tenido un auge en su aplicación al estudio de proteínas /5/, en particular de las hemoglobinas /6/. El Centro de Biofísica Médica ha estado trabajando en el entendimiento del proceso de polimerización de la Hb S en aras de encontrar mejores diagnósticos y tratamientos médicos para la enfermedad.

Una de las líneas de trabajo ha sido caracterizar el sistema "Solución de Hb S" donde se han obtenido algunos resultados importantes. Hasta la fecha se han caracterizado diferentes parámetros del sistema tales como: el tiempo de demora (td) /7/, el tiempo de correlación de la molécula de hemoglobina y del agua asociada a esta (tcH_2O) de forma cualitativa, la microviscosidad (η), los gradientes de campo eléctricos /8/, las interacciones moleculares

(*factor de Kraudin*) /9/, entre otros. Es por ello que tomando como referencia las características de paquetes de eritrocitos en individuos sanos y en pacientes drepanocíticos, se pondrá a análisis el comportamiento de estos durante la polimerización.

Existe una tendencia a emplear como evaluación del estado del paciente drepanocítico no solo su cinética de polimerización, sino el valor inicial del estado de dicha solución de Hb o del paquete de eritrocitos, lo cual como medida cuantitativa de la polimerización o el grado de su desarrollo, se obtiene en un menor tiempo que las evaluaciones realizadas anteriormente en nuestro laboratorio bajo condiciones controladas de pH, temperatura y bajo una desoxigenación espontánea. Es por esto que pretendemos evaluar la relación de la del paquete de los eritrocitos reflejado en el Hematocrito (Hto) respecto al comportamiento de los tiempos de relajación protónica a bajos campos con ayuda del equipo GIROMAG 02.

Los tiempos de relajación T1 y T2 van a proporcionar una valiosa información sobre la muestra, debido a que están asociados a procesos relacionados tanto con la interacción entre los espines nucleares y sus entornos moleculares (T1), como vale interacciones entre los propios espines nucleares (T2).

Objetivos: Determinar la relación entre el Hto del paquete de eritrocitos y los tiempos de relajación T1 y T2 en pacientes sanos y en pacientes drepanocíticos.

Tiempo de relajación longitudinal T1

Este tiempo está asociado a la relajación longitudinal por la que la colectividad de espines nucleares recupera el equilibrio térmico mediante transiciones entre los estados de espín - $\frac{1}{2}$ (mayor energía) y + $\frac{1}{2}$ (menor energía), recuperando la magnetización longitudinal (en el eje z). El equilibrio térmico se alcanza tras intercambios de energía asociados a dichas transiciones. Este fenómeno es debido al acoplo entre los espines nucleares y sus entornos moleculares y se denomina relajación espín-red.

Para medir este tiempo se usan secuencias multipulso, es decir se generan varios pulsos de radiofrecuencias separados por intervalos de tiempo determinados. Estas secuencias multipulso, permiten revelar diferentes

características de las muestras y son la base de la espectroscopía RMN moderna /10/.

En este caso se pueden usar dos secuencias diferentes:

a) Técnica de recuperación de saturación:

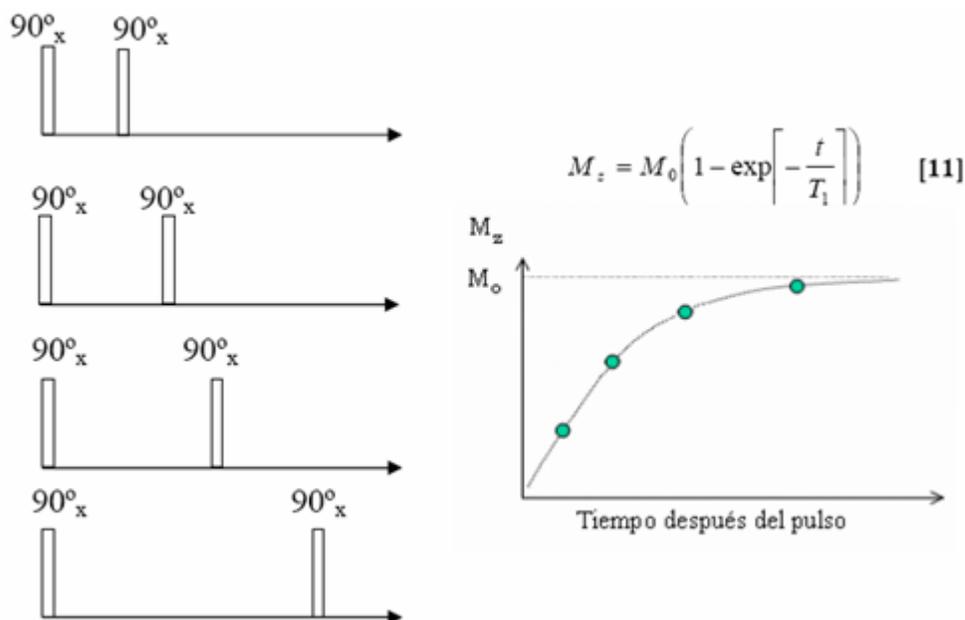


Fig. 1 Técnica de recuperación de saturación.

Como vemos, en la figura 1, se usan secuencias de dos pulsos de 90° separados por un tiempo (t) determinado. El primer pulso tumba la magnetización al plano xy , es decir anula M_z , luego se deja que la magnetización se recupere durante un tiempo (t) y finalmente se vuelve a tumbar al plano xy para poder medirla (recordar que el espectrómetro medía la componente x). Variando el tiempo (t) se obtienen puntos que se ajustan a una exponencial decreciente, obteniendo T_1 como parámetro del ajuste.

b) Técnica de recuperación de inversión: Tiene el mismo fundamento que el método anterior, solo que en este caso el primer pulso de las secuencias es de 180° (invierte el sentido de la magnetización) y por tanto la curva resultante es:

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

Tiempo de relajación transversal T_2

Este tiempo está asociado a la relajación transversal, mediante la cual los espines nucleares dejan de precesionar perdiendo, de este modo, la magnetización transversal (en el plano xy). Este desfase es producido por tres fenómenos:

- Interacciones entre espines: es la causa fundamental, debida a la interacción directa entre pares de espines, por ello se denomina relajación espín-espín.

- Desplazamiento químico: núcleos con diferente desplazamiento químico precesan a diferentes frecuencias.

- Inhomogeneidades en el campo magnético externo: núcleos bajo diferentes valores del campo magnético externo precesan a diferentes frecuencias.

Debido a las heterogeneidades del campo magnético (ΔH_0) la disminución de la magnetización transversal difiere de la causada por el T_2 propio del sistema, por lo que aparece un nuevo valor conocido como T_2^* . La relación que existe entre ambos valores de T_2 está dada por la expresión /11/:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta H_0 \quad (2)$$

Para medir el tiempo de relajación transversal o espín-espín existen dos secuencias de impulsos bien conocidas. La primera de ellas es la serie de Carr-Purcell, la que consiste en aplicar inicialmente un pulso de rf de 90° , el que hará que la magnetización cambie de dirección z a la dirección x o y en dependencia de la ubicación de dicho pulso. Seguidamente, al cabo de un tiempo τ cuando el sistema comienza a relajarse producto a los propios mecanismos de relajación y heterogeneidades del campo, se aplica un pulso de 180° que hace rotar la magnetización en ese mismo ángulo; esto provocará que los momentos magnéticos que se habían desfasado se vuelvan a reenfasar al cabo de un tiempo 2τ , donde se obtendrá el eco de espín. Si repetimos varios pulsos de 180° separados por un tiempo τ hasta que el sistema se relaje totalmente obtendremos una exponencial decreciente dada por la envolvente de las amplitudes de los ecos que se obtendrán /10/.

● Materiales y método

Obtención de las muestras de hemoglobina

Las muestras de Hb A fueron obtenidas a partir de sangre total venosa de individuos voluntarios del Banco de Sangre Renato Guitart Rosell, y las muestras de Hb S fueron obtenidas a partir de sangre total venosa de individuos que padecen la enfermedad, las cuales forman parte de los análisis que se le realizan mandadas por el médico. Estas fueron procesadas según la metodología empleada en el laboratorio, la cual incluye extracción del plasma por aspiración, después de extraer el plasma, el concentrado de glóbulos rojos fue lavado tres veces con buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4, SIGMA Chemicals Co.). El plasma y el Buffer después de cada lavado fueron extraídos por aspiración una vez

centrifugada la muestra. Después se pasó a la hemólisis por congelación /12, 13/, obteniéndose finalmente la solución de hemoglobina deseada, de la que se preparan muestras de $400\ \mu\text{l}$ en ampulas para RMN.

Obtención de la densidad de un paquete de glóbulos rojos

Para la obtención de la densidad de un paquete de glóbulos rojos se hizo mediante el picnómetro /14, 15/. La medición del Hematocrito se realizó por centrifugación /16,17/.

Método de RMN para la determinación de T_1 , T_2

Los tiempos de relajación T_1 , T_2 fueron determinados en el Relaxómetro Universal Cubano Giromag 01® a la frecuencia de 4 MHz. Para ello se emplearon las series de impulsos inversión por recuperación (180° - τ - 90°), de Hahn (90° - τ - 180°) respectivamente /11/. La determinación de T_1 , se efectuó por el método paso por cero.

● Resultados y discusión

Resultados

Experimento 1. Relación entre el hematocrito y los tiempos de relajación T_1 , T_2 , para donantes sanos y para una bolsa de sangre

Con el objetivo de hallar la correlación del hematocrito con los tiempos T_1 y T_2 para caracterizar la densidad del paquete de glóbulos, se halló la relación entre el hematocrito y los tiempos de relajación T_1 , T_2 , para donantes sanos y para una bolsa de sangre. La discusión de estos resultados se facilita mediante el análisis de las siguientes gráficas:

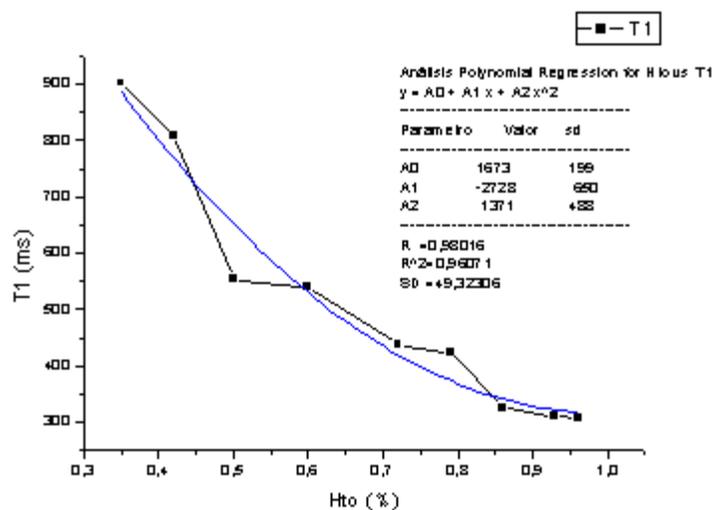


Gráfico 1. Dependencia del T1 con el Hematocrito para una bolsa de sangre.

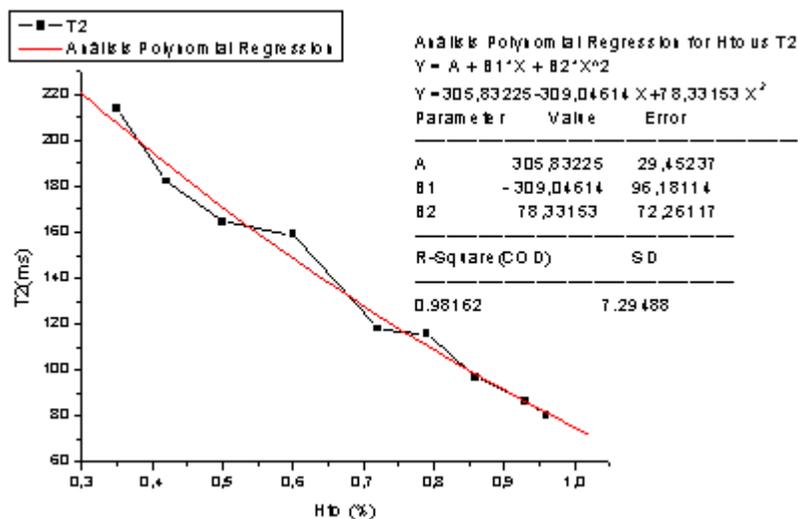


Gráfico 2. Dependencia del T2 con el Hematocrito para una bolsa de sangre.

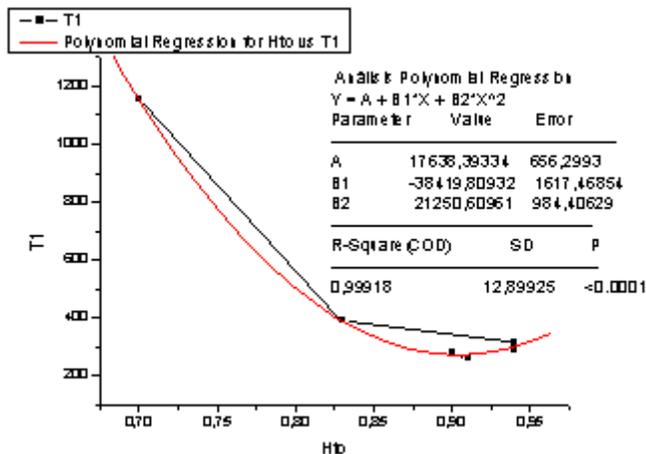


Gráfico 3. Dependencia del T1 con el Hematocrito para donantes sanos.

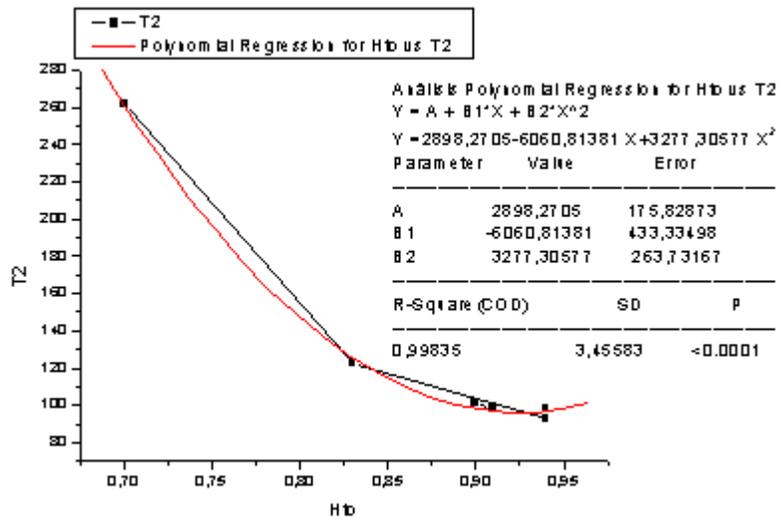


Gráfico 4. Dependencia de T2 con el Hematocrito para donantes sanos.

La dependencia de los tiempos T1 y T2 con el Hematocrito demuestra una dependencia no lineal entre los mismos, lo que nos indica que es necesario controlar el valor del hematocrito en la preparación de las muestras para que no exista una variación de los tiempos de relajación iniciales; lo que permite evaluar la relación entre las fracciones del agua intracelular y extracelular. Otro aspecto importante es que en la determinación del Hematocrito se necesita mucho menos muestras y si se realiza por la técnica de microhematocrito, es insignificante

la cantidad de muestra a utilizar, comparándolo con la empleada en la relajación (400 µL).

Experimento 2. Relación del Hematocrito con los tiempos T1 y T2 para pacientes drepanocíticos

Con el objetivo de hallar la correlación del hematocrito con los tiempos T1 y T2 para caracterizar la densidad del paquete de glóbulos, se halló la relación entre el hematocrito y los tiempos de relajación T1, T2, para pacientes drepanocíticos. La discusión de estos resultados se facilita mediante el análisis de las siguientes gráficas:

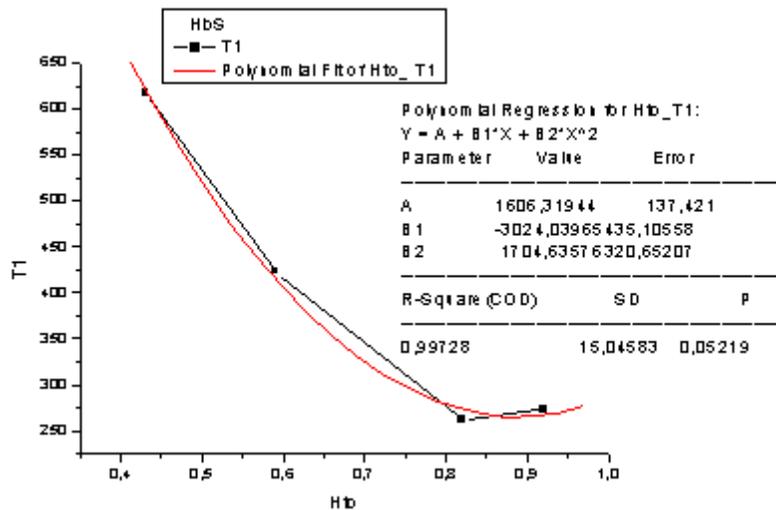


Gráfico 5. Dependencia del T1 con el Hematocrito para pacientes drepanocíticos.

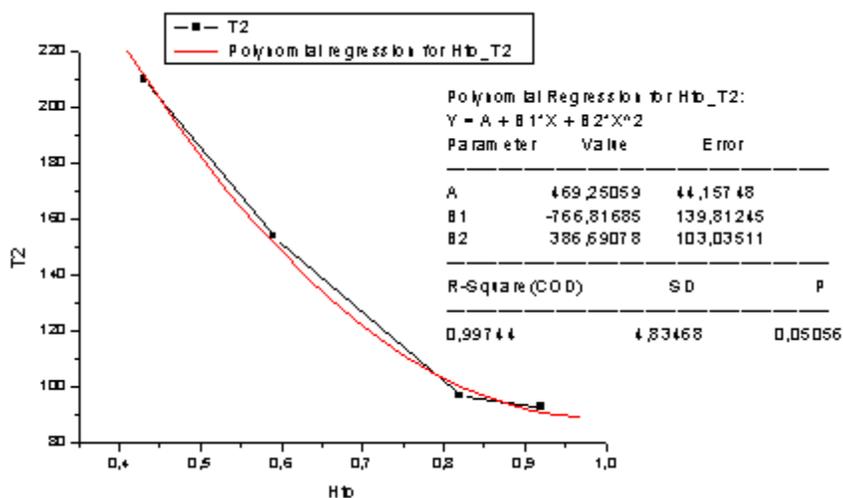


Gráfico 6. Dependencia del T2 con el hematocrito para pacientes drepanocíticos.

Experimento 3. Medir la densidad y el hematocrito y hallar la relación entre el mismo y los valores de T1 y T2 para donantes sanos

Con el objetivo de hallar la correlación del hematocrito con la densidad y con los tiempos T1 y T2, para caracterizar la densidad del paquete de glóbulos, se realizó el estudio para una bolsa de sangre. A continuación se muestran los siguientes gráficos:

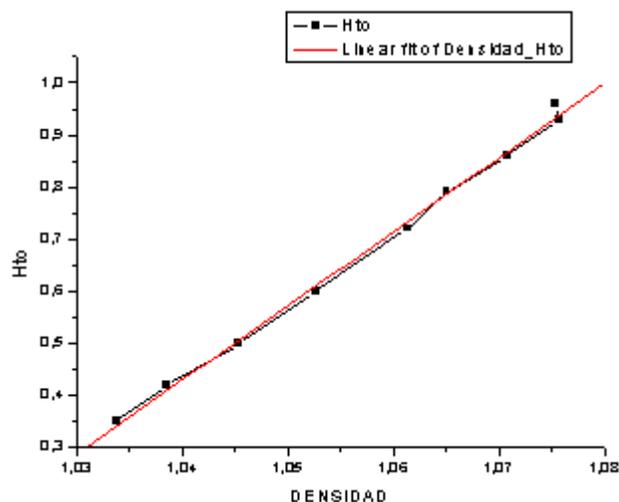


Gráfico 7. Relación de la densidad del paquete de eritrocitos con el Hematocrito.

La dependencia entre la velocidad de relajación T1 y la densidad de Hb es lineal para las cinco concentraciones más diluidas, lo mismo ocurre para la dependencia de la velocidad de relajación T2 y la densidad de Hb representada en el gráfico 9.

De los análisis correspondientes a la dependencia de la velocidad de relajación con la densidad, se concluye que esta solo mantiene un comportamiento lineal en las regiones muy diluidas, si la comparamos con la concentración de Hb normal dentro del glóbulo

rojo que es de 32 g/dL. Esto dice que al evaluar la dependencia de este parámetro en el paquete de glóbulos rojos se encontrará una diferencia significativa según su densidad, dado por dos aspectos el primero su concentración y el segundo por la naturaleza de la Hb, ya que en la anemia drepanocítica, esta mayoritariamente polimeriza, aumentado así su concentración relativa, y por lo tanto, unido a la pérdida de agua del glóbulo, su densidad será mayor que en los individuos sanos.

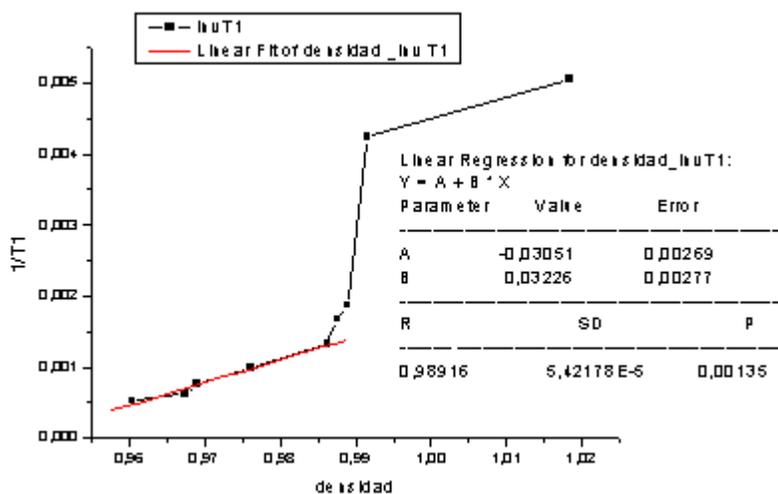


Gráfico 8. Relación de la densidad del paquete de eritrocitos con T1.

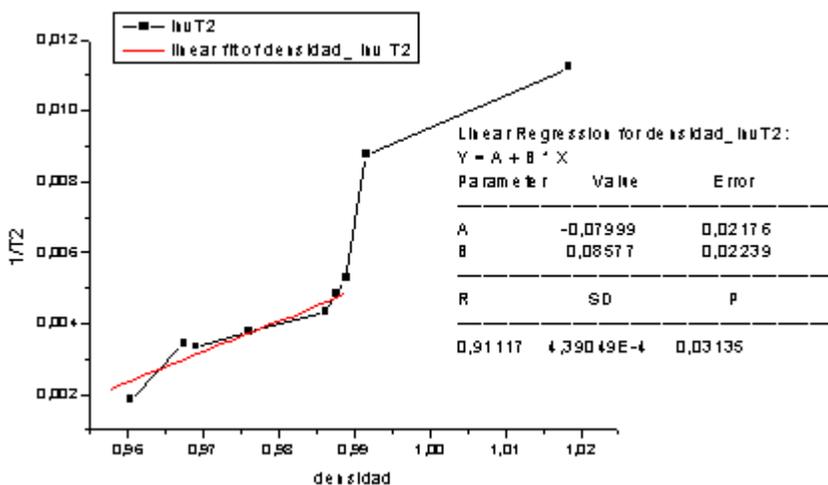


Gráfico 9. Relación de la densidad del paquete de eritrocitos con T2.



Conclusiones

◆ *La dependencia de la densidad de solución de Hb con el Hematocrito es lineal.*

◆ *La dependencia no lineal del hematocrito con los tiempos de relajación y fundamentalmente para valores altos mayores de 0,95; permite disminuir la variabilidad experimental en los valores de los T1 y T2 cuando se preparan paquetes de glóbulos con valores de hematocritos altos.*



Bibliografía

1. BUNN, H. F. "Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease". New Engl. J. Med, 1997.
2. GUYTON, Arthur C. *Tratado de Fisiología Médica I*. Edición Revolución. Sexta Edición. pág. 75, 1987.
3. EATON, W. A, J. Hofrichther. "Sickle Cell Hemoglobin Polymerization". *Advances in Protein Chemestr.* 40, 63-279, 1976.
4. Guía general para la determinación de la hemoglobina con el uso del espectrofotómetro ULTRAESPEC III. Procedimiento técnico PT14BQ. CBM.2000

5. SUÁREZ, J.; C. CRUZ; A. J. R. COLINA. Laboratorio Clínico. En: Carballo, TIT, Colina AJR. *Estudio de las anemias*. Ed. Ciencias Médicas, pp. 217-263, 2004.
6. FERNÁNDEZ, A. Tesis de doctorado. Centro de Biofísica Médica. Universidad de Oriente, 2004.
7. SOTO del REY, R. Curso de Física. (Hidromecánica). Universidad de Oriente.
8. KOENIG, S. H. "Classes of Hydration sites at Protein-Water Interfaces: the Source of Contrast in Magnetic Resonance Imagine". *Biophys. J.* Vol. 69, pp 593-603; 1995.
9. FERNÁNDEZ, A. A.; M. Lores; E. Pérez. "Influencia del método de obtención de la solución de hemoglobina S en el tiempo de demora medido por resonancia magnética". *Revista Cubana de Química*. Vol. 14, pp 59-63; 2002.
10. PERLO, J.; E. ANOARDO. "Estudio de campos locales residuales mediante relaxometría magnética nuclear en el sistema rotante". *Revista Mexicana de Física*. Vol. 52; pp 230-237; 2006.
11. ÁLVAREZ, E., H. PARKES; J. BELL. Evaluación de métodos de preprocesamiento de muestras para el estudio de sangre total por espectroscopia de resonancia magnética. *Revista Cubana de Química*. Vol. XVI. No. 2, 2004.
12. CABRALES, Lores M.; A. FERNÁNDEZ; CABAL PÉREZ, C. E. Relajación en muestras de solución de hemoglobina y glóbulos rojos revista cubana de química. Vol. XVIII. No. 1, 2006, pp. 304-306 (Latindex).
13. FERNÁNDEZ, A.; FALCÓN, J. E.; RABELL G, SIMÓN T.; RODRÍGUEZ, I. "Evaluación de la influencia de la concentración de hb s seguido por resonancia magnética". *Revista Cubana de Química*. Vol. XVIII. No. 3, págs. 22-24, 2006.
14. ÁLVAREZ, E. "Estudio comparado de dos métodos de desproteínización para la evaluación de sangre total y plasma mediante espectroscopia de resonancia magnética". *Bioquímica*. No. 123. Vol. 31. abril, mayo, junio, 2006, pp 59-68.
15. *FísicaNet - Física. La Densidad*, disponible en http://www.fisicanet.com.ar/fisica/estatica_fluidos/cap05_densidad.php;internet; descargado el 23 de septiembredel 2011.
16. *Hematocrito*, disponible en <http://www.es.wikipedia.org/wiki/Hematocrito>. html; Internet; descargado el 23 de septiembre del 2011.
17. Determinación del Hematocrito, disponible en http://www.hettichlab.com/appc/content_manager/page.php?ID...doc .Internet; descargado el 23 de septiembre del 2011.
18. FERNÁNDEZ A. A.; F. HERNÁNDEZ-MONCADA. "Efectos de la hidroxiiurea sobre la densidad de los eritrocitos de los pacientes drepanocíticos, empleando la relajación magnética protónica". *Revista Cubana de Física* 26 (2A): 156-160, 2009.