

Efectos de la hidroxiurea sobre la densidad de los eritrocitos de los pacientes drepanocíticos, empleando la relajación magnética protónica

A. A. Fernández^{a†} y F. Hernández-Moncada.^b

^a Dpto. de Biofísica. Centro de Biofísica Médica. Universidad de Oriente; adolfo@cbm.uo.edu.cu

^b Dpto. de Aseguramiento de la Calidad. Banco de Sangre Provincial, Santiago de Cuba.

† Autor para la correspondencia

Recibido el 15/7/2008. Aprobado en versión final el 29/10/09.

Sumario. La polimerización intraeritrocitaria puede afectar la integridad de los eritrocitos, y causar la deshidratación e incremento de la densidad de estas células. La distribución de los eritrocitos es posible usarla para caracterizar el estado clínico del paciente: basal, en crisis y bajo tratamiento. Nuestro objetivo fue evaluar por RMN-¹H, el tiempo de demora de la polimerización de la Hb S (td), en eritrocitos y sus perfiles de pacientes no tratados y bajo tratamiento con hidroxiurea. Los perfiles de eritrocitos se separaron en gradientes de Percoll-PBS, y por RMN-¹H se midieron el tiempo de relajación espín-espín (T2) a 36 °C, y se determinó el tiempo de demora de la polimerización de la Hb S (td). El desarrollo de la polimerización de la Hb S y deshidratación celular causan el decrecimiento de los valores de T2 en el tiempo. Estos efectos se atenúan por la acción de la hidroxiurea. Un análisis más detallado de este estudio será posible en próximos trabajos.

Abstract. Intracellular polymerization of sickle haemoglobin can affect the integrity of the erythrocytes, and to provoke the dehydration and increase the cellular density. The distribution of the erythrocytes is possible to use on the characterization of the clinical state of the patients: in conditions steady, in crisis and under treatment. We evaluate by NMR-¹H, the Hb S polymerization decay time (td), in densest erythrocytes and its profiles. These cells corresponding to patients who don't receive treatment (group 1) and treated with hydroxyurea (group 2). The profiles of the erythrocytes obtained on Percoll-PBS gradients were isolated, and by NMR-¹H the spin-spin relaxation times (T2) were measured at 36 °C, under conditions of Hb S spontaneous deoxygenating. Moreover, the Hb S polymerization decay time (td), was determined. The evolution of the cellular dehydration and Hb S polymerization provoke the decreasing of the values of T2 on the time. These effects are attenuated for the hydroxyurea. An analysis more detailed will be possible in next works.

Palabras clave. 71.15.Mb Density functional theory, 76.60.2k Nuclear magnetic resonance and relaxation.

1 Introducción

La Anemia Drepanocítica (AD) o sickleemia, se caracteriza por una alteración estructural de la hemoglobina Hb S¹. Este tipo de hemoglobina anormal en la forma tensa (desoxigenada) polimeriza dentro del glóbulo, y junto a

la deshidratación de los mismos debido a afectaciones en la membrana celular, cambia la densidad del eritrocito. Esta magnitud depende en gran medida de la concentración de Hb dentro del eritrocito² y de la polimerización. Es conocido que en la AD, la distribución por densidad de los eritrocitos es posible emplearla para caracterizar el

estado clínico de los pacientes, en condiciones basal, en crisis y bajo tratamiento. Por otra parte, se ha descubierto que las moléculas de Hb S no copolimerizan con hemoglobinas normales como la fetal (Hb F). Esto se debe a la desestabilización en los contactos intermoleculares de la doble hélice del polímero de Hb S³. Un medicamento que induce la producción de Hb F, y disminuye la deshidratación del eritrocito es la hidroxiurea (HU) mejorando el estado de salud del paciente drepanocítico⁴. Debido a que la polimerización de la Hb S, es el evento fisiopatológico primario de la enfermedad, el estudio de la cinética de este proceso refleja los cambios en el estado del paciente. Hasta la actualidad no se han combinado estos dos aspectos para ser empleados en el diagnóstico del estado del paciente drepanocítico. Partiendo de estos dos criterios, el objetivo de este trabajo es evaluar por RMN-¹H, empleando la variación temporal del tiempo de relajación espín-espín (T2), el tiempo de demora de la polimerización de la Hb S, en soluciones de Hemoglobina S de eritrocitos densos de pacientes con AD en estado basal, no tratados y tratados con HU.

Se ha demostrado que el mecanismo de relajación protónica predominante en la solución de Hemoglobina es el dipolo-dipolo, por lo que en el tiempo de relajación T2 depende inversamente del tiempo de correlación, y en especial del tiempo de correlación rotacional, por lo que en aquellas soluciones de Hb S en que las condiciones fisiológicas o experimentales se favorece la polimerización, aumenta el tiempo de correlación rotacional y disminuyen los valores de T2, constituyendo este fenómeno el criterio de determinación del tiempo de demora en la cinética de la polimerización de la Hb S. La variación del T2 se divide en tres etapas características de la cinética de polimerización: La primera etapa (I) o de inicio donde la Hb se encuentra en estado de solución, la segunda de polimerización (II) y la tercera de terminación de la polimerización (III). Por lo que es de esperar que en soluciones de Hb S provenientes de células de densidad normal (menos densas), la etapa de polimerización se alargue y en consecuencia aumente el tiempo de demora.

2 Materiales y métodos

Preparación de las muestras. Se colectaron muestras de 10 mL de sangre total heparinizada de un donante sano (D) procedente del Banco de Sangre Provincial de Santiago de Cuba; y de 3 a 4 mL de 6 pacientes drepanocíticos adultos voluntarios en estado basal provenientes del Hospital Clínico Quirúrgico "Juan Bruno Zayas" de Santiago de Cuba. Estos pacientes se dividen en dos grupos (YP, YM y MC, no tratados con HU) y (MB, DD y DG, tratados con HU). Se aislaron los eritrocitos y se lavaron con buffer fosfato salino tres veces⁵ (1258 x g, durante 10 minutos, a temperatura ambiente) en la centrífuga de mesa de cabezal oscilante (Tehtnica železniki, Checoslovaquia).

A partir de 1,1295 g/mL de la solución isotónica de Percoll (SIP), se preformaron los gradientes de densidad discontinuos de Percoll-PBS de 1.0614, 1.0841, 1.0954 y 1.1066 g/mL, como se describe previamente.⁶

Tabla I
Perfiles de eritrocitos separados en gradientes de densidad

M	DB	(DB a DN)	DN	DI	DA
D	0	0	X	0	0
YP	-	X	0	X	0
YM	0	-	0	X	-
MC	X	0	-	-	0
MB	X	X	0	0	0
DD	-	X	0	0	0
DG	0	X	0	0	0

M: Muestra. Los símbolos - y 0, representan el perfil no medible (< 300 µL), y la ausencia del perfil en el sistema de gradientes, respectivamente.

Tabla II
Frecuencias de los perfiles y sus porcentajes de recuperación.

Muestras	Perfiles	Frec. Perfil	Frec. Perfil medible	% rec
Donante sano (control)	DN	1	1	100
	Total	1	1	100
Pacientes no tratados	DB	2	1	50
	(DB a DN)	2	1	50
	DN	1	-	-
	DI	3	2	67
	DA	1	-	-
	Total	9	4	44
Pacientes tratados	DB	1	-	-
	(DB a DN)	3	3	100
	DN	-	-	-
	Total	4	3	75

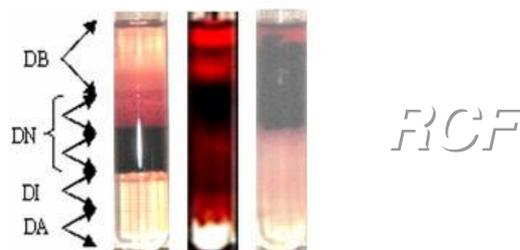


Figura 1. Gradientes de densidad en Percoll-PBS, de un donante sano (D), y de dos pacientes drepanocíticos: YP sin tratamiento y MB tratado con HU. Los gradientes se definen DB (<1.080 g/mL), densidad normal, DN (1.080 a 1.090 g/mL), densidad intermedia, DI (1.090 a 1.114 g/mL), y densidad alta, o hiperdensa, DA (> 1.114 g/mL). En el control se observa un sólo perfil (DN); mientras en el paciente YP se localiza un número mayor de perfiles, el cual supera la cantidad de observada en el paciente MB. En éste hay una tendencia hacia la disminución de la cifra de perfiles, por causa de la acción de la HU.

Los gradientes obtenidos se definen como sigue: den-

sidad baja, DB (<1.080 g/mL), densidad normal, DN (1.080 a 1.090 g/mL), densidad intermedia, DI (1.090 a 1.114 g/mL), y densidad alta, o hiperdensa, DA (> 1.114 g/mL).

Las subpoblaciones de eritrocitos se separaron de acuerdo a sus valores de densidad, en estas fracciones, mediante centrifugación isopónica (404 x g, durante 5 minutos, a temperatura ambiente). Las capas de eritrocitos, se extrajeron de las fracciones, se lavaron cinco veces con PBS, con un valor de hematocrito igual o mayor que 0.96.

Método de relajación magnética protónica. A las muestras de eritrocitos colectadas extraídas de los gradientes en volúmenes superiores a 300 µL se depositaron en ampulas de RMN. Las capas que tuvieron un volumen inferior, se desecharon, tomando en cuenta que este es el volumen óptimo de estudio, en este equipo, teniendo presente la relación señal ruido y la homogeneidad de los campos magnéticos a los cuales están sometidas las muestras. La medición del tiempo de relajación espín-espín (T₂), se realizó a la frecuencia de resonancia de 4 MHz, mediante la serie de pulsos 90°-τ-180°, con un error sistemático inferior a 5 %, en el Relaxómetro Universal Giromag® 01. Las mediciones se ejecutaron durante 13 horas en condiciones de desoxigenación espontánea de la Hb S a 36 °C.

3 Resultados y discusión

Teniendo presente la distribución de los eritrocitos en los diversos perfiles se observan diferencias en cuanto a la cantidad de perfiles del control y de pacientes, como se muestra en la Tabla I.

En el control **D**, los eritrocitos se agrupan en un sólo perfil (DN); sin embargo, en los pacientes no tratados (**YP**, **YM** y **MC**) estas células se distribuyen en un número mayor de perfiles, los cuales se extienden en un rango desde DB hasta DA; mientras en los pacientes tratados (**MB**, **DD** y **DG**) la extensión es desde DB hasta (DB a DN).

La Tabla II, muestra la frecuencia de los perfiles, y el porcentaje de recuperación de los mismos (% rec). Este porcentaje consiste en la cantidad de perfiles medibles (pm) respecto al total de los perfiles (tp), y se expresa % rec = (pm/tp) x 100.

El porcentaje de recuperación de los perfiles es mayor en pacientes tratados que en los no tratados, debido a la acción de la HU que atenúa la deshidratación, y reagrupa los eritrocitos hacia las zonas correspondientes a los perfiles de bajas densidades.

Por otra parte, en los pacientes tratados, predomina el perfil (DB a DN) porque la médula ósea produce reticulocitos en sustitución de los eritrocitos afectados por la polimerización, y estas células tienen bajas densidades.

En los gradientes de los pacientes no tratados, el perfil más frecuente es DI. La distribución de los eritrocitos es más amplia hacia los perfiles de mayores valores de den-

sidad, por el aumento de los niveles de deshidratación.

Esta diferencia se representa con un ejemplo, en la figura 1. Los eritrocitos del paciente **YP** se distribuyen en tres perfiles DB, (DB a DN) y DI; sin embargo, en el caso del paciente **MB**, la distribución es en un sólo perfil (DB a DN).

El tratamiento con HU disminuye el número de capas densas e inhibe la deshidratación celular, debido al incremento de la producción de Hb F.

La figura 2, representa la dependencia de T₂ con el tiempo. Esta dependencia es lineal porque la Hb A no polimeriza, ni se evidencian cambios físicos ni químicos que provoquen variaciones significativas en los valores de T₂ respecto al tiempo. La ecuación que caracteriza esta dependencia es:

$$T_2 = T_{2\text{inic}} + B * t \quad (1)$$

donde, T₂_{inic} es el valor inicial de T₂, B es la pendiente (de valor negativo) de la recta, y t es el tiempo que transcurre desde el momento en que se obtiene la muestra biológica y comienza el experimento. El valor de la pendiente de la recta es muy pequeño, B = (-0.008 ± 0.002) ms/min. Esta ligera disminución se debe a la transformación del estado de la hemoglobina, de oxihemoglobina (diamagnética) a desoxihemoglobina (paramagnética)⁷, lo cual produce la disminución de T₂.

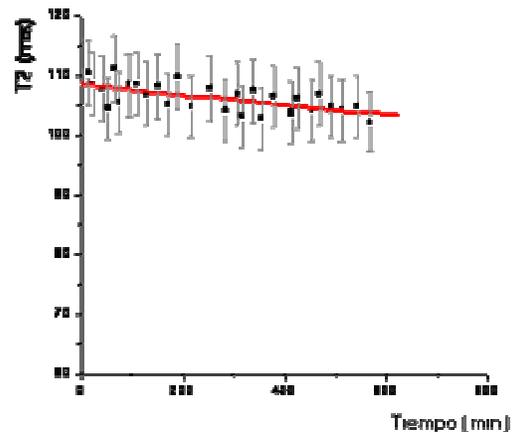


Figura 2. Característica lineal de T₂ respecto al tiempo, en solución de hemoglobina de eritrocitos totales de un donante sano (**D**) (control). Ecuación: T₂ = T₂_{inic} + B * t. Parámetros: N = 28; T₂_{inic} = (108.5 ± 0.6) ms; B = (-0.008 ± 0.002) ms/min; r = - 0.63. La disminución ligera de la pendiente B, refleja el cambio de estado de la hemoglobina de oxihemoglobina (diamagnética) a desoxihemoglobina (paramagnética), provocando bajas disminuciones de T₂.

Los resultados presentados sobre la cinética de polimerización de la Hb S, involucran tres procesos moleculares relacionados con la desoxigenación espontánea de este tipo de hemoglobina: los cambios en el magnetismo de la Hb⁸, la polimerización de la Hb S, y la aparición de micro dominios estructurales como resultado de la organización y alineamiento de los polímeros⁹. La transformación de oxihemoglobina (diamagnética) a desoxihe-

moglobina (paramagnética) también ocurre para la Hb S, y produce la disminución de T2. Esta magnitud disminuye con el aumento de la densidad celular (Tabla III). El cambio de estado hemoglobínico no hace variar la característica sigmoideal de T2, en muestras de glóbulos que contienen Hb S, como muestran las figuras 3 y 4. La curva sigmoideal que caracteriza el proceso de polimerización de la Hb S tiene por ecuación:

$$T2 = \frac{T2_{\text{inic}} - T2_{\text{fin}}}{1 + \exp\left(\frac{t - t_0}{dt}\right)} + T2_{\text{fin}} \quad (2)$$

donde, $T2_{\text{inic}}$ es el valor de T2 en la etapa de inicio, en la que predomina la Hb S en forma soluble, y no hay variación significativa de T2 en el tiempo (Etapa I). La Etapa II- caracteriza el equilibrio existente entre las moléculas de Hb S en solución y las que se encuentran formando el polímero. En este caso la disminución es casi lineal. El parámetro $T2_{\text{fin}}$, es el valor de T2 al final de la polimerización, donde T2 no varía en el tiempo. Esta es la Etapa III. Se designa por t_0 el punto de inflexión que se encuentra en el centro de la etapa de crecimiento del polímero; dt representa el intervalo de tiempo en el que ocurre el proceso de crecimiento del polímero y t es el tiempo que transcurre desde el momento en que se obtiene la muestra biológica y comienza el experimento (figura 3).

A medida que la polimerización avanza, la deshidratación celular aumenta, y se incrementa el tiempo de correlación que trae como consecuencia la disminución de los valores de T2.

Los paquetes de eritrocitos totales contienen subpoblaciones de eritrocitos de diferentes densidades, por lo que los valores de T2 de las subpoblaciones de los perfiles dependen de los valores de densidad y volúmenes de dichas subpoblaciones, aumentando o disminuyendo T2. Este caso se representa por ejemplo, en el paciente MC (Tabla III).

El paquete eritrocitario del paciente DG está conformado por la mezcla de dos subpoblaciones de densidades DB y DN; sin embargo, el valor de $T2_{\text{inic}}$ del paquete es superior al $T2_{\text{inic}}$ correspondiente al perfil (DB a DN) porque en el paquete predomina la subpoblación de perfil DB.

Esta diferencia puede ser consecuencia de la desigualdad en el valor del hematocrito, existiendo una dependencia inversamente proporcional entre $T2_{\text{inic}}$ y el hematocrito. A valores mayores de hematocrito, mayor el nivel de compactación entre los eritrocitos y menor movilidad molecular. En eritrocitos totales y en el perfil (DB a DN) en pacientes tratados los valores medios son 96 ms y 94 ms, y en los pacientes no tratados son 59 ms y 58 ms; respectivamente. De manera que los valores medios de $T2_{\text{inic}}$ en los pacientes tratados son significativamente superiores a los valores medios de $T2_{\text{inic}}$ correspondientes a los pacientes no tratados, a un nivel de 0.05. En pacientes tratados el valor de $T2_{\text{inic}}$ se aproxima al valor del control, 108 ms. El incremento de $T2_{\text{inic}}$ en

los pacientes tratados se debe a la acción de la HU, la cual atenúa la deshidratación celular. Similarmente ocurre en los perfiles. El tiempo de demora de la polimerización de la Hb S (t_d), se determinó trazando una línea recta desde la intercepción de las rectas de las etapas I y II en las curvas cinética de polimerización. Los valores de t_d en las muestras de eritrocitos totales y sus perfiles medibles (Tabla IV), de pacientes no tratados no superan los valores pertenecientes a los pacientes tratados.

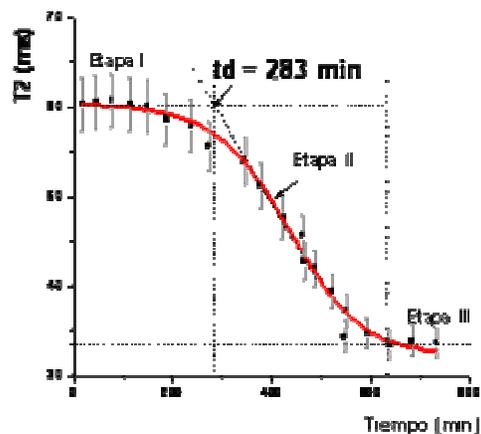


Figura 3. Curva cinética de polimerización de la HbS en eritrocitos totales del paciente YP no tratado con HU. Donde: $r^2 = 0.99$; $t_0 = (435 \pm 8)$ min; $dt = (74 \pm 8)$ min; $T2_{\text{inic}} = (60 \pm 1)$ ms y $T2_{\text{fin}} = (32 \pm 1)$ ms. Los valores reflejan la presencia de subpoblaciones de altas densidades en el paquete eritrocitario, que causan disminución de T2, por el alto nivel de deshidratación celular.

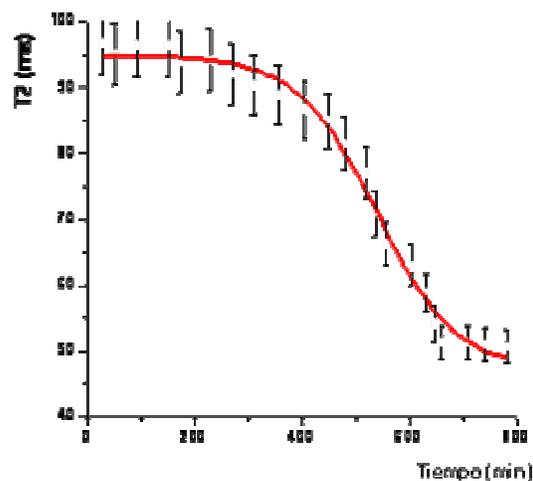


Figura 4. Curva cinética de polimerización de la HbS en eritrocitos totales del paciente MB tratado con HU. Donde: $r^2 = 0.99$; $t_0 = (539 \pm 6)$ min; $dt = (60 \pm 5)$ min; $T2_{\text{inic}} = (95 \pm 1)$ ms y $T2_{\text{fin}} = (47 \pm 2)$ ms. Los valores revelan la presencia de subpoblaciones de bajas densidades en el paquete eritrocitario, que originan disminución de T2, por el bajo nivel de deshidratación celular, causado por la acción de la HU.

Tabla III			
Valores de T2_{inic} de eritrocitos totales y sus perfiles medibles, en el control y pacientes no tratados y tratados.			
(T2_{inic} ± E) ms			
Control (D)			
ET	(108 ± 1)		
DN	(108 ± 1)		
Pacientes no tratados			
	YP	YM	MC
ET	(60 ± 1)	(63 ± 1)	(54.2 ± 0.4)
DB	-	0	(78.4 ± 0.6)
(DB a DN)	(58.2 ± 0.5)	-	0
DI	(55.8 ± 0.4)	(55.9 ± 0.4)	-
Pacientes tratados			
	MB	DD	DG
ET	(95 ± 1)	(98.1 ± 0.3)	(96 ± 1)
DB	0	-	-
(DB a DN)	(94.9 ± 0.5)	(93.3 ± 0.5)	(93 ± 1)

M: muestra. ET: Eritrocitos totales. Los símbolos - y 0, representan el perfil no medible (< 300 µL), y la ausencia del perfil en el sistema de gradientes, respectivamente.

Tabla IV			
Valores de td de eritrocitos totales y sus perfiles medibles, en pacientes no tratados y tratados			
(td ± E) min			
ET	DB	(DB a DN)	DI
Pacientes no tratados			
302 ± 14	(353 ± 17)	(273 ± 13)	(260 ± 12)
Pacientes tratados			
403 ± 20	0	(402 ± 19)	0

En eritrocitos totales y en el perfil (DB a DN) en pacientes tratados los valores medios son 403 ms y 402 ms, y en los pacientes no tratados son 302 ms y 273 ms; respectivamente. Los valores medios de td en los pacientes tratados son significativamente superiores a los valores medios de td que pertenecen a los pacientes no tratados, a un nivel de 0.05. En los pacientes tratados, el td aumenta porque la hidroxiurea atenúa la polimerización intracelular de la Hb S.

4 Conclusiones

El tratamiento con hidroxiurea a pacientes drepanocíticos, causa disminución de la cantidad de fracciones densas conservándose mejor los eritrocitos. La deshidratación se inhibe por la HU, y los tiempos de relajación espín-espín, aumentan en pacientes tratados. Con la continuación de esta línea de investigación, será posible un análisis más detallado sobre la evaluación de T2_{inic} y de td, en subpoblaciones de eritrocitos con la finalidad de conocer cuáles perfiles aportan los mejores datos de interés para la caracterización del estado clínico de los pacientes, en condiciones basal, en crisis y bajo tratamiento.

Agradecimientos

Los autores agradecemos al Servicio de Hematología Espacial del Hospital Clínico Quirúrgico "Juan Bruno Zayas", por haber facilitado la adquisición de las muestras de eritrocitos de pacientes drepanocíticos.

Referencias

1. Suárez J, Cruz C, Colina AJR. Laboratorio Clínico. En: Carballo TIT, Colina AJR. Estudio de las anemias. ed. Ciencias Médicas. 2004, pp. 217-263.
2. Lew VL, Bookchin RM. Ion transport pathology in the mechanism of Sick cell dehydration. *Physiol Rev* 85:179-200 (2005).
3. Colombo B, Guernichoff E, Martínez G. Genética y Clínica de las hemoglobinas humanas. ed. Pueblo y Educación, Ciudad de La Habana. 1993, pp. 149.
4. Feliu A, Eandi S, Sciuccati G, Bonduel M. Efecto de la hidroxiurea en hemoglobina S. *CASUÍSTICA MEDICINA (Buenos Aires)* 63 (2): 140-142 (2003).
5. Fernández A., Falcón J.. Evaluación por RMN de la influencia del pH en el tiempo de demora (td) de polimerización de la hemoglobina S. *Rev Cub Quim.* XV, (3): 52-55 (2003).
6. Clark MR, Morrison CE, Shohet SB: Monovalent cation transport in irreversibly sickled cells. *J Clin Invest* 62:329 (1978).
7. Meyer M. E., Yu O., Eclancher B., Grucker D., "NMR Relaxations Rates and Blood Oxygenation level" *Magnet. Reson. Med.* 34: 234-241. (1995).
8. Meyer M. E., Yu O., Eclancher B., Grucker D., "NMR Relaxations Rates and Blood Oxygenation level" *Magnet. Reson. Med.* 34: 234-241. (1995).
9. Roufberg, A., Ferrone, F., A., "A Model for the Sick Cell Hemoglobin Fiber Using Both Mutation Sites", *Protein Sci* 19: 1031-1034 (2000).