

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE MATEMÁTICA, ASTRONOMÍA Y FÍSICA

SERIE “A”

TRABAJOS DE FÍSICA

Nº 11/10

**Determinación experimental del tiempo de evolución
de procesos de cambios conformacionales en hemoglobina
humana mediante técnicas de resonancia magnética nuclear**

Carla Cecilia Fraenza - Esteban Anoardo



Editores: Miguel A. Chesta–Ricardo C. Zamar

CIUDAD UNIVERSITARIA – 5000 CÓRDOBA

REPÚBLICA ARGENTINA

DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DEL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE PROCESOS DE CAMBIOS CONFORMACIONALES EN HEMOGLOBINA HUMANA MEDIANTE TÉCNICAS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

EXPERIMENTAL DETERMINATION OF CONFORMATIONAL EVOLUTION TIMES OF HUMAN HEMOGLOBIN USING NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE TECHNIQUES

Carla Cecilia Fraenza, Esteban Anoardo

Laboratorio de Relaxometría y Técnicas Especiales, Grupo de RMN, Facultad de Matemática, Astronomía y Física (FaMAF)-Universidad Nacional de Córdoba
Medina Allende s/n-Ciudad Universitaria-Córdoba-Argentina

Este trabajo se orienta al estudio de procesos de cambios conformacionales de la molécula de Hemoglobina A humana al ser extraída de su ambiente natural (eritrocitos). Para ello, se realizaron mediciones del tiempo de relajación espín-red de protones y de campo local en el sistema rotante en función del tiempo. Se identificaron dos escalas de tiempos de evolución características, que en este trabajo se atribuyen a la dimerización del tetrámero de Hemoglobina debido al proceso de desoxigenación espontánea, y como consecuencia de ésta, una posterior gelificación débil.

Palabras Claves: Hemoglobina, cambios conformacionales, Resonancia Magnética Nuclear.

This paper deals with conformational-change processes of the human Hemoglobin A after extraction from its natural environment (erythrocytes). The time dependence of the proton spin-lattice relaxation time and the local field in the rotating frame were measured. Two different characteristic time scales were identified, here attributed to a dimer-dissociation of the Hemoglobin tetramer as a consequence of the spontaneous deoxygenation process, followed by a rear weak jellification.

Key words: Hemoglobin, conformational changes, Nuclear Magnetic Resonance.

I. 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.

La *Hemoglobina* (Hb) es una proteína de la sangre cuya función es la de almacenar y transportar por la sangre oxígeno molecular (O_2). Presenta dos estructuras estables y distintas: *oxihemoglobina* (HbO_2) y *desoxihemoglobina*, es decir, la Hb que está unida al oxígeno y la que lo ha liberado, respectivamente. Se ha demostrado que la oxi y desoxihemoglobina difieren claramente en su estructura terciaria y cuaternaria, no así en su estructura secundaria, tal que la estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina se denomina forma *T* (tensa) y la estructura de la oxihemoglobina, forma *R* (relajada) [1-6].

A pesar de que el proceso de transformación de las estructuras $T \rightarrow R$ ha sido explicado a través de la sucesiva ruptura de enlaces salinos [1-6], también ha sido planteado como un proceso que involucra la *dimerización de la Hb* [5,7,8]. Lo mismo se ha esbozado para la transformación $T \leftarrow R$. 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 [9], otros plantean todo lo contrario [10].

Muchas han sido las técnicas empleadas durante años para el estudio de sistemas biológicos. Dentro de estas técnicas, la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [11,12] demostró ser una herramienta poderosa, permitiendo estudiar este tipo de sistemas desde el punto de vista molecular.

En este trabajo se indaga sobre la dinámica molecular del sistema, y posibles cambios de orden en el mismo durante el proceso de

desoxigenación utilizando la técnica de RMN. Para ello, se realizaron mediciones del tiempo de relajación espín-red de protones y de campo local en el sistema rotante en función del tiempo. Los estudios se concentraron principalmente en Hb A humana como sistema de referencia y para la puesta a punto de los experimentos.

II. SISTEMA PROTÉICO DE ESTUDIO

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. Como ya se mencionó, su función es la de almacenar y transportar por la sangre oxígeno molecular (O_2) capturado en los pulmones hacia los tejidos, para que puedan generar la energía necesaria para mantener la vida celular; y dióxido de carbono (CO_2), 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* está 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 (α , β , γ , δ , ζ , ϵ). De acuerdo al estado de desarrollo del organismo, es el tipo de globina que se sintetiza lo que da origen a la existencia de varias Hemoglobinas normales. La Hb normal, del adulto o Hb A está formada por dos cadenas de tipo Alfa α y dos de tipo Beta β ($\alpha_2\beta_2$).

Por otro lado, la *parte no proteica* está formada por el *grupo hemo* o *hem* y son cuatro, cada uno de ellos unidos a una globina. Este grupo 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.

III. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

A. Preparación de la muestra

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 es la siguiente [13]:

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.

8. Finalmente la muestra es descongelada y centrifugada 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, tapando su extremo superior.

Luego del paso número nueve la muestra de hemoglobina queda lista para ser utilizada en el experimento.

B. Medición de T_1

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 el campo externo B_0 . En este trabajo se empleó la secuencia de recuperación de inversión (RI), la cual se basa en la aplicación de un pulso inicial de π (180°) seguido por uno de $\pi/2$ [14].

Cuando la muestra evoluciona, es posible estudiar T_1 en función del tiempo, y obtener información de cambios de la eficiencia en los mecanismos de relajación espín-red ocasionados por dicha evolución. En algunos casos (como el presente), puede ocurrir que los tiempos característicos de evolución de la muestra demanden de una medición de T_1 rápida [15]. En

la secuencia RI, siendo τ el tiempo entre los dos pulsos, éste puede ser seleccionado de manera que la señal luego del segundo pulso se anule (que en adelante llamaremos τ_{xcero}). En dicho caso, T_1 puede ser determinado por un único punto, correspondiente a la separación de pulsos para la cual la magnetización se anula [16]:

$$\tau_{xcero} = T_1 \ln(2) \quad (1)$$

C. 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 [17,18]. Entendemos por *campo local residual* al valor correspondiente del campo en la posición de un espín nuclear dado, debido a las contribuciones no promediadas (por la dinámica molecular) de todos los demás espines de la muestra.

Ésta técnica consiste básicamente en observar la evolución de la magnetización en el sistema rotante 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 $M(B_{lock})$ y con un modelo apropiado [13,14], se puede estimar la componente longitudinal de los campos locales de la muestra. Se pueden distinguir dos casos, los cuales se describen a continuación.

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 . 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. 1-a,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. 1-c). Si la amplitud de B_1 es reducida y su fase cambiada en 90° (pulso de lock), el campo B_1 rotará y permanecerá a lo largo de la magnetización en el sistema rotante (Fig. 1-d).

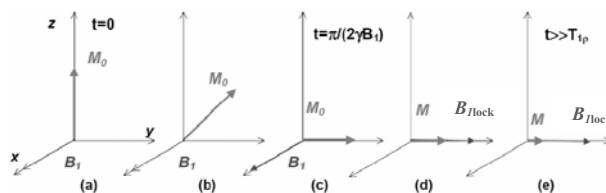


Figura 1. Comportamiento de la magnetización en el sistema rotante durante un experimento de *spin lock*. Este es el caso en que el campo de RF se aplica en resonancia, y los campos locales son despreciables frente a la intensidad de B_1 .

Bajo la condición de resonancia, la magnetización en el sistema rotante sólo experimenta al campo B_{lock} . Por lo tanto, el campo B_{lock} 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_{lock} . Luego, relaja a un valor de equilibrio con una constante T_{1p} (tiempo de relajación espín-red en el sistema rotante) (Fig. 1-e). La medición se realiza cuando se corta el pulso de *lock* y se monitorea la señal (FID) resultante como se muestra en la figura 2. 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_{lock} a un tiempo fijo de *lock* τ_{lock} .

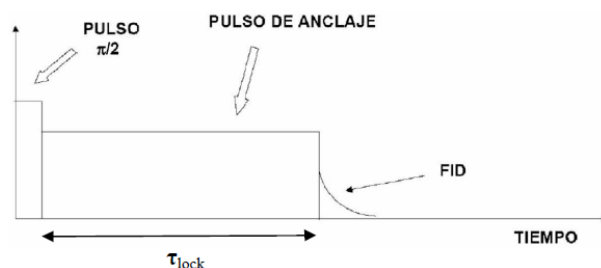


Figura 2. Secuencia de pulsos para un experimento de *spin lock*.

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. 1-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). Por lo tanto, luego de un tiempo T_{2p}^{ef} (tiempo de relajación asociado a la pérdida de coherencia de los espines precesando en torno a \mathbf{B}_{ef}) tendremos una magnetización paralela a \mathbf{B}_{ef} y ésta relajará con una constante de tiempo T_{1p}^{ef} (tiempo de relajación asociado a la componente de la magnetización paralela a la dirección impuesta por \mathbf{B}_{ef}). Notar que a medida que \mathbf{B}_{lock} 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.

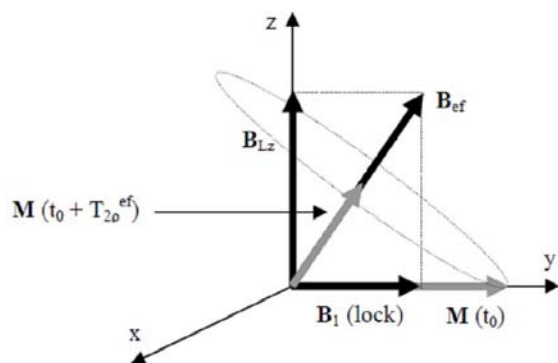


Figura 3. Comportamiento de la magnetización durante la aplicación del pulso de lock en resonancia, y cuando los campos locales son del mismo orden de magnitud que \mathbf{B}_{lock} . El tiempo t_0 corresponde al momento en que se apaga el pulso resonante de $\pi/2$ y se enciende el campo de lock.

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 [17,18].

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 [17,18]:

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

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, τ_{lock} es la duración del pulso de lock, T_D es el tiempo de relajación dipolar (asociado a la relajación espín-red de los campos locales) 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 (2). El valor de B_{Lz} así 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.

Medición de campos locales en soluciones acuosas de Hemoglobina

En una solución acuosa de Hb podemos encontrar, al menos, tres poblaciones de protones (1H) que contribuyen de forma significativa a la relajación: los 1H de la estructura macromolecular (M), los de las moléculas de agua ligada a la proteína, H_2O^B , y los de las moléculas de agua libre, H_2O^F [19,20,21]. Los tiempos de relajación de los 1H en la estructura de las proteínas son del orden de los microsegundos, mucho menores que en los demás estados (B y F), y del orden de 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 1H del H_2O^B y el H_2O^F [19,22].

En condiciones de pH, concentración, y temperatura fisiológicas, se establece un intercambio rápido de moléculas de H_2O entre los estados B y F, tal que el tiempo medio de residencia τ_B de una molécula de agua en el estado ligado es mucho más grande que el tiempo de correlación rotacional de la macromolécula y mucho más chico que los tiempos de relajación [19-22].

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 1H en H_2O^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 [17,18], lleva a la necesidad de tener que modificar la secuencia de lock descrita para medir campos locales de forma tal que nos permita analizar la dispersión de la señal oculta que se mencionó anteriormente.

Las tres poblaciones de protones relajan con diferentes tiempos, es decir, que en la solución de

Hb cada grupo de protones posee un T_1 diferente (T_{1M} , T_{1B} y T_{1F}). En general, el más largo corresponde al agua libre [23]. En consecuencia, diferentes componentes de la señal relajan con diferentes tiempos característicos, generando un decaimiento de la magnetización de carácter multiexponencial. Este proceso permite recurrir a técnicas de “supresión de agua”, en las cuales es posible atenuar considerablemente la componente de la señal asociada a los protones de agua libre [24]. En su forma más simple, dicha supresión puede lograrse mediante un pulso inicial de 180° , con el cual se invierte la magnetización con todas sus componentes. Una vez que la componente asociada al agua libre pasa por cero, las demás (más “rápidas”) ya se encuentran a lo largo del eje positivo de cuantización. Si en dicho momento se aplica la secuencia de anclaje, la misma sólo afectará a las componentes rápidas de la magnetización (Fig. 4).

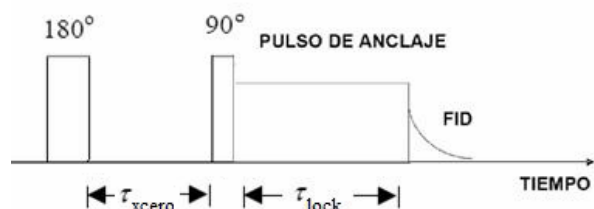


Figura 4. Secuencia de pulsos para un experimento de *spin lock* con supresión de la señal de protones de moléculas de agua libre.

En otras palabras, con este pulso adicional de 180° se combina la secuencia RI con la de anclaje. Luego, según la ecuación (1), ajustando $\tau_{xcero} = T_{1F} \ln(2)$, se logra aplicar el pulso de 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. El uso de supresión de agua en combinación con la técnica de anclaje, en el contexto propuesto, es un aporte original de este trabajo.

IV. TRABAJO EXPERIMENTAL: DISCUSIÓN Y RESULTADOS

A. Mediciones de T_{1F} en función del tiempo en Hb A

Para poder determinar la validez de una curva de la intensidad de la señal en función de la

frecuencia asociada al pulso de lock obtenida aplicando la secuencia de spin-lock con supresión de señal de protones de agua libre, se realizó un estudio de T_{1F} en función del tiempo. Esto surgió como consecuencia de las variaciones temporales que se habían observado en T_{1F} en muestras anteriores de Hb A.

Se dispuso de una muestra de sangre de donante masculino sano, de la cual se preparó la muestra de Hb A (Hb A¹) de la forma explicitada en la sección III.A. Fue congelada en freezer para hemólisis durante 21 hs y a una temperatura de -20°C . Se hizo un duplicado de la muestra (Hb A¹) a modo de corroboración.

Los valores de T_{1F} se determinaron para los diferentes tiempos aplicando la secuencia RI, y luego, usando la ecuación (1). El τ_{xcero} se determinó por medio de buscar el tiempo de separación entre los pulsos de 180° (de duración de $5,6 \mu\text{s}$) y 90° (de duración de $2,8 \mu\text{s}$) que anula la señal a tiempos largos (la que corresponde solo a la señal de protones de agua libre). Se estableció dicho valor a partir de los $3,5 \text{ ms}$, luego de una promediación de 40 mediciones separadas temporalmente en 3 s . Se trabajó a $T = (36,7 \pm 0,3)^\circ\text{C}$ (temperatura fisiológica). El equipo de campo fijo utilizado en estos experimentos fue un Bruker Minispec mq-20 (20MHz). Los resultados se muestran en el gráfico 1. El tiempo $t = 0 \text{ min}$ es el momento en el que se hizo la primera medición de T_{1F} . En este caso correspondió a aproximadamente una hora después de descongelar la muestra. Se asignaron los errores de 10 min a los valores de t y entre 4 ms y 6 ms a los valores de T_{1F} , lo que se usó en todas las curvas T_{1F} vs. t de éste trabajo, en las cuales el error de los puntos experimentales es representado por el tamaño de los mismos.

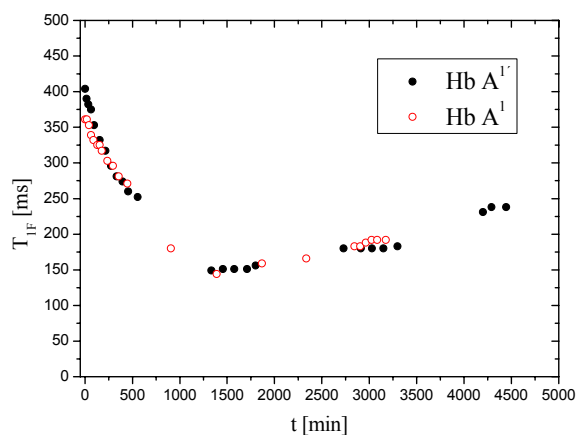


Gráfico 1. Evolución temporal de T_{1F} para una muestra de HbA (Hb A¹) y su duplicado (Hb A¹) a $T=36,7^\circ\text{C}$.

Como se observa en el gráfico 1, el valor inicial de T_{IF} , 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_{IF} , mas bajo es el valor inicial de T_{IF} . Esto se observa en el hecho de que aún para el mismo donante el valor inicial de T_{IF} varía de 361 ms a 404 ms entre $Hb A^1$ y $Hb A^{1'}$.

En la primera parte de la curva, el valor de T_{IF} disminuye con el tiempo hasta alcanzar un mínimo. El tiempo para el cual se alcanza el mínimo de T_{IF} fue en promedio de (1300 ± 100) min, lo cual corresponde a aproximadamente 22 hs y el valor de T_{IF} para este tiempo fue de (147 ± 4) ms. Esto da una disminución aproximadamente de un 60% en T_{IF} respecto a su valor inicial. Por otro lado, en la segunda parte de la curva el valor de T_{IF} aumenta con el tiempo hasta el tiempo promedio de (3700 ± 100) min (62 hs) en el cual tiende a estabilizarse en un valor de (215 ± 8) ms, diferente del valor inicial.

Considerando al intercambio entre moléculas de agua libres y ligadas a la proteína como el principal mecanismo de relajación [23], la evolución temporal en T_{IF} sugiere que la tasa de este intercambio evoluciona en el tiempo, 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 misma. 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.

Por otra parte, agregando el hecho de que se observó un notable aumento de viscosidad, con la formación de un tipo de “gel” a partir del mínimo de la curva, y una evolución del color en las dos muestras de HbA, habiendo partido de color rojo carmín a $t = 0$ min y transformándose a bordó oscuro, luego de pasar el mínimo de la curva T_{IF} vs. t , hace probable, que el posible cambio de estructura de la proteína esté directamente asociado a cambios en la oxigenación de la Hb [1-6].

Para estudiar los factores externos que influyen en la evolución temporal de T_{IF} se repitió el experimento 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} . En todas las mediciones de T_{IF} en función del tiempo en estas muestras, se utilizaron los mismos parámetros experimentales que en el caso de HbA^1 y $HbA^{1'}$, excepto la temperatura que será especificada en cada caso.

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 Hb A, $Hb A^2$ y $Hb A^{2'}$, de la forma explicitada en la sección III.A, pero variando la manera de practicar la hemólisis por congelación. La $Hb A^2$ fue congelada por exposición a aire líquido a $T = -200^\circ C$ durante 3 minutos y la $Hb A^{2'}$ fue congelada en el freezer a $T = -20^\circ C$ durante 50 hs. Los resultados se muestran en el gráfico 2, en el cual, a modo de comparación, se superponen las curvas obtenidas para $Hb A^1$ y $Hb A^{1'}$.

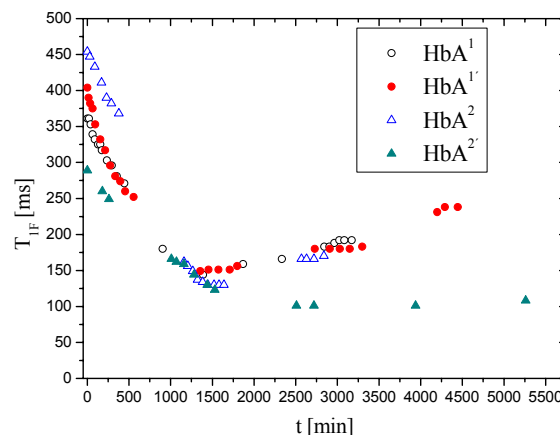


Gráfico 2. Evolución temporal de T_{IF} para Hb A del mismo donante: $Hb A^2$ y $Hb A^{2'}$ a $T = 36,7^\circ C$. Se muestran además las curvas de $Hb A^1$ y $Hb A^{1'}$ a modo de comparación.

Se observa la misma tendencia para las muestras $Hb A^1$, $Hb A^{1'}$ y $Hb A^2$. Existe dispersión en los valores iniciales y mínimos de T_{IF} , 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_{IF} no depende significativamente del método de congelación para hemólisis, es decir, congelar en freezer a $T = -20^\circ C$ durante 21 hs o solo unos minutos de exposición al aire líquido a $T = -200^\circ C$.

Por otro lado, la curva de la muestra Hb A² aún no muestra la segunda parte de la curva (después del mínimo), para el rango temporal considerado. Ello indica que el proceso de evolución de T_{IF} 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°C. Así, los valores de T_{IF} que se obtengan luego de la descongelación son dependientes del tiempo de congelación. Esto se evidenció en HbA², 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_{IF} 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.

Estudio de la influencia de agitaciones, refrigeración y congelación en T_{IF} vs t

Se preparó la muestra de Hb A, Hb A³ de la forma explicitada en la sección III.A, la cual fue congelada para hemólisis en el freezer a T = -20°C durante 4 hs. Los valores de T_{IF} determinados para los diferentes tiempos usando la ecuación (1), se realizaron a T = (38,0±0,3) °C.

Durante la evolución de T_{IF}, la muestra fue expuesta dos veces a leves agitaciones manuales durante 1 min, tal que el primer agitación fue a t = 135min y el segundo a t = 980 min, siendo estos tiempos contados a partir de la primera medición de T_{IF}. Posteriormente, a t = 1180 min la muestra fue congelada a T = -20°C durante 19 hs, luego de lo cual se continuó midiendo T_{IF}. Los resultados se muestran en el gráfico 3, en el cual se puede observar que aún no se ha alcanzado un valor mínimo de T_{IF} en el rango temporal considerado.

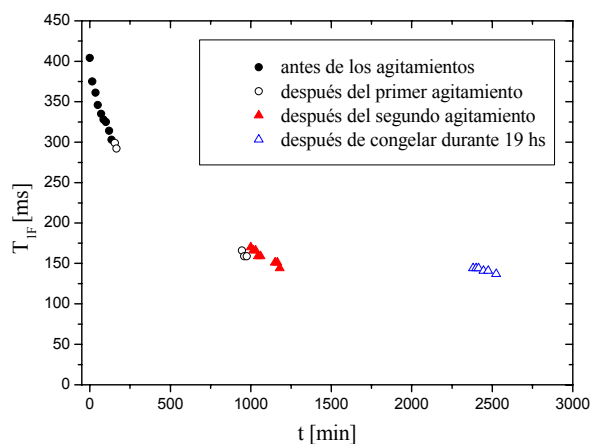


Gráfico 3. Evolución temporal de T_{IF} para Hb A³ a T =38°C, expuesta a dos agitaciones y a congelación.

Para estudiar un poco mejor la influencia de los agitaciones, se preparó una nueva muestra de Hb A, Hb A⁴, en la cual la hemólisis por congelación se hizo en freezer a T = -20°C durante aproximadamente 21 hs. Las mediciones de T_{IF} en función del tiempo se hicieron a 36,7°C hasta pasar levemente al mínimo de la curva T_{IF} vs t, lo que correspondió aproximadamente a los 1500 min (25 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 4, 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 agitación, T_{IF} toma valores que tenía para tiempos antes del agitación. Notar que luego de la refrigeración T_{IF} conserva el mismo valor que tenía antes de la refrigeración.

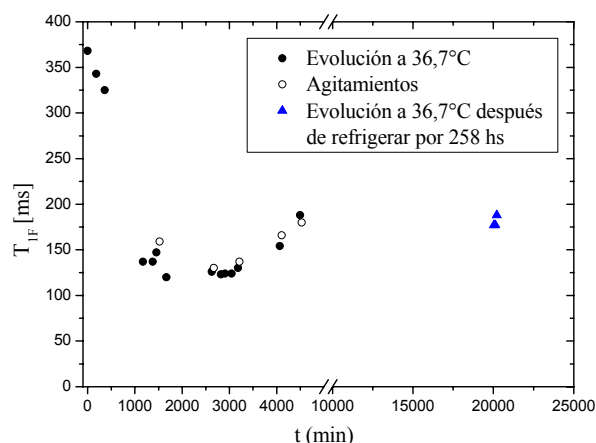


Gráfico 4. Evolución temporal de T_{IF} para HbA⁴ a T =36,7°C, expuesta a cinco agitaciones y a posterior refrigeración.

De los gráficos 3 y 4 se puede apreciar que la evolución temporal de T_{IF} no es inhibida por los agitaciones de la muestra, sino que es retrasada, alcanzando el mínimo a los (2800±100) min (47 hs) en promedio (gráfico 4). 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 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 A⁵, en la cual la hemólisis por congelación se hizo en freezer a T = -20°C durante 19 hs. Las mediciones de T_{IF} en función del tiempo se hicieron a 38°C.

Luego de la primera medición de T_{1F} , 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_{1F} vs. t , aproximadamente cada 50 hs, tal que entre cada medición se mantenía la muestra refrigerada en la heladera. En el gráfico 5 se muestran los resultados obtenidos, en el cual nuevamente no se observa el valor mínimo de T_{1F} , a pesar de que el rango temporal es muy amplio. Luego, de los gráficos 3 al 5 se puede apreciar que

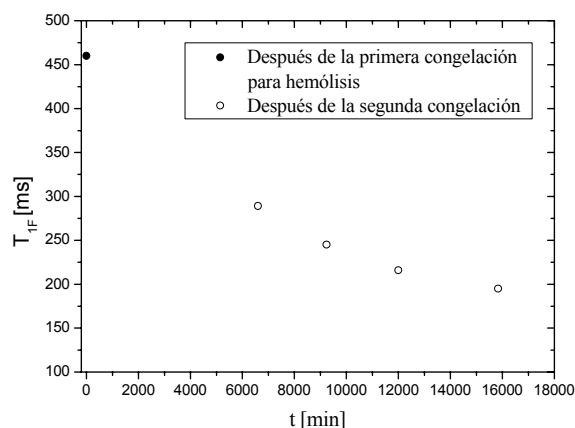


Gráfico 5. Evolución temporal de T_{1F} para HbA^5 a $T = 38^{\circ}\text{C}$, expuesta a una congelación y varias refrigeraciones.

el refrigerar y/o congelar la muestra durante la evolución de T_{1F} , retrasan el proceso. Esto se evidencia en el gráfico 5, en el cual aún a los 16000 minutos (aproximadamente 267 hs) no se ha alcanzado el mínimo, y en los gráficos 3 y 4, el valor de T_{1F} 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_{1F} , pero no la inhiben.

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_{1F} vs. t .

Estudio de la influencia de una centrifugación a 50.000 rpm al inicio de la curva T_{1F} 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: HbA^6 y HbA^7 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_{1F} en las dos muestras.

Los resultados se muestran en el gráfico 6, donde $t = 0$ min corresponde a 3 hs y 5 hs después de descongelar las muestras HbA^6 y HbA^7 respectivamente. 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 $t = 0$ min hasta el mínimo de la curva.

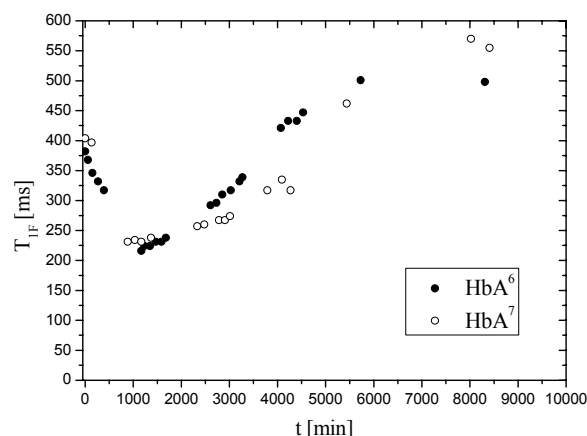


Gráfico 6. Evolución temporal de T_{1F} para HbA^6 y HbA^7 a $T = 36,7^{\circ}\text{C}$, expuesta a una centrifugación inicial de 50.000 rpm.

Del gráfico 6 se observa que la curva de evolución de T_{1F} tiene las mismas características generales de las curvas obtenidas sin la centrifugación inicial, mostradas en el gráfico 1. La diferencia principal que muestra el gráfico 6 es que los últimos valores medidos de T_{1F} 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.

B. Mediciones de T_{1M} en función del tiempo en Hb A

Para ver si se observa un comportamiento similar al de T_{1F} en el tiempo de relajación de los protones propios de la Hb (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 HbA⁸. La manera de prepararla fue diferente a la convencional, pues los lavados de los glóbulos rojos se hicieron con PBS preparado con D₂O (agua compuesta por 99.9% de D₂O suministrada por Nucleoeléctrica Argentina S.A. Central Nuclear Embalse, Div. Química y Procesos), habiendo sido con H₂O en todos los casos anteriores. Esta modificación tenía como objetivo eliminar en el mayor grado posible las moléculas de agua en la solución de Hb A pero con la consecuente formación de DOH por intercambios de protones de los grupos amida de la proteína con deuterios del D₂O. Este intercambio es inherente a la dinámica del equilibrio químico en una proteína que está disuelta en agua. 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_{IM} a T=36,7°C. Para ello, fue necesario establecer tres valores para τ_{xcero} al aplicar la secuencia 90°-τ_{xcero}-180°, pues se observó que en la señal 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 τ_{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 (1) con los tres valores de τ_{xcero} se determinaron tres valores de tiempos de relajación para cada tiempo medido: T_{IM(0,012)}, T_{IM(0,5)} y T_{IM(3,5)}. Los resultados se muestran en los gráficos 7, 8 y 9. Se observa que T_{IM} sigue un comportamiento que intenta reproducir el obtenido para T_{IF}, por lo menos en

los gráficos 7 y 8, pero con una variación temporal respecto a su valor inicial mucho menor (no supera el 30%). Además, se puede apreciar un mínimo para un tiempo en promedio de (2500 ± 100) min (~ 42 hs), que corresponde a 1200 min (20 hs) después del tiempo promedio del mínimo para T_{IF}.

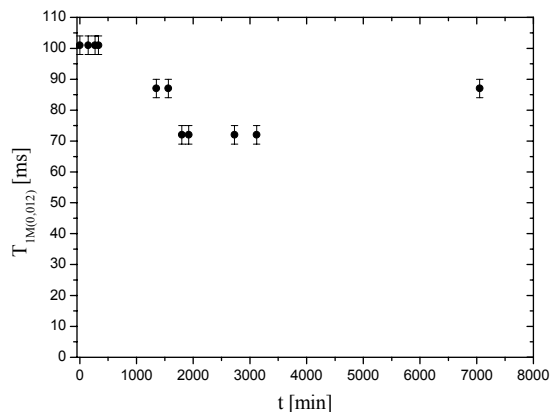


Gráfico 7. Evolución temporal de T_{IM(0,012)} para HbA⁸ a T =36,7°C.

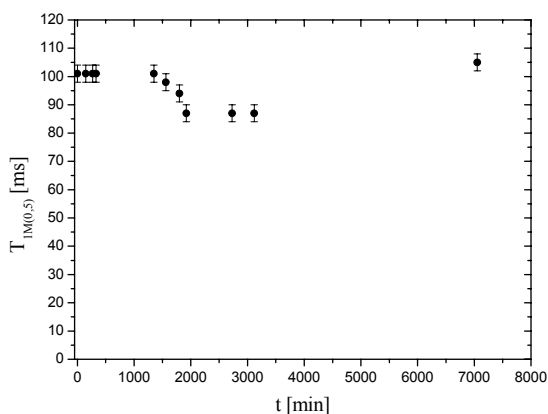


Gráfico 8. Evolución temporal de T_{IM(0,5)} para HbA⁸ a T =36,7°C.

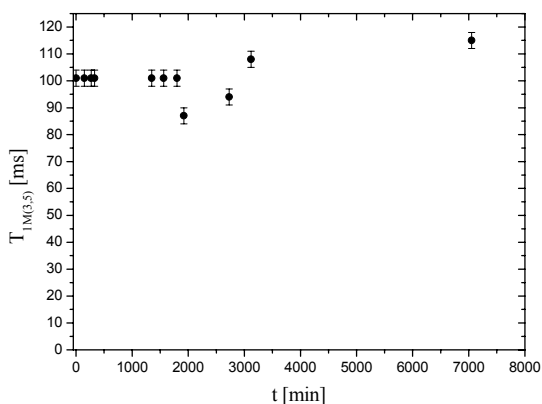


Gráfico 9. Evolución temporal de T_{IM(3,5)} para HbA⁸ a T =36,7°C.

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.

C. Discusión del posible proceso que ocasiona la evolución temporal de T_{1F}

Como se mencionó previamente, la evolución temporal de T_{1F} es acompañada de 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 [1], 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 [25].

Por otro lado, 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”. Así mismo, este proceso de “gelificación” o de agregación de moléculas de Hb es lo suficientemente débil como para ser revertido, como puede apreciarse de los resultados para Hb A centrifugada a 50000 rpm analizados en la sección IV.A que muestran que con una centrifugada intensa, esta “gelificación” se destruye parcialmente.

Por último, los resultados de las mediciones de T_{1M} en función del tiempo en una solución deuterada de Hb A, una vez más, nos dan la idea de algún tipo de cambio de estructura de la proteína, con la consecuente modificación del área de exposición de la misma al “bulk” o volumen.

Así, considerando estos tres resultados experimentales, sumado a resultados obtenidos por otros autores [1-9], 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 [1-9], 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 ± 100) min (22 hs), permitiendo explicar 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 ± 100) min (62 hs).

D. Mediciones de campo local en Hb A considerando la evolución temporal de T_{1F}

Se consideró la muestra Hb A¹ y se le aplicó la secuencia de spin-lock en resonancia con supresión de la señal de protones de agua libre donde $\tau_{lock} = 5$ ms. El τ_{xcero} se determinó por medio de buscar el tiempo de separación entre los pulsos de 180° y 90° que anula la señal a tiempos largos (cola de la señal), que corresponde solo a la señal de protones en agua libre, lo cual se estableció a partir de los 3,5 ms. 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_{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_{1F} 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_{lock} 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_{1F} según los resultados obtenidos en la sección IV.A. 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_{1F} para Hb A. Ellos fueron

a $t = 0$ min ($T_{1F} = 404$ ms), $t = 555$ min ($T_{1F} = 252$ ms), $t = 1335$ min ($T_{1F} = 149$ ms) que correspondió al mínimo de la curva T_{1F} vs. t y $t = 4445$ min ($T_{1F} = 238$ ms). Los resultados se muestran en los gráficos 10, 11, 12 y 13. Además, el gráfico 10 muestra la correspondiente curva de ajuste, para la cual se usó la ecuación (2).

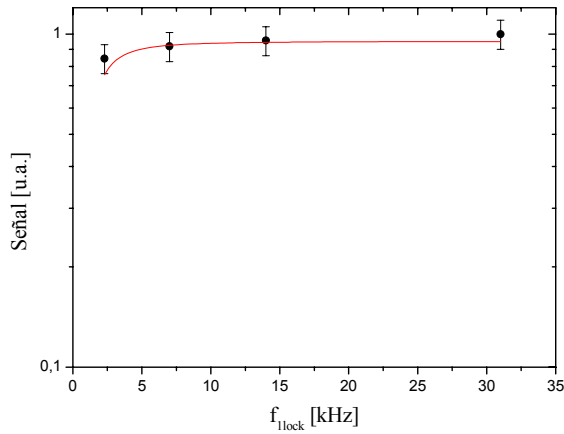


Gráfico 10. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para $\text{HbA}^{1'}$ en resonancia, a $T=36,7^{\circ}\text{C}$ y $T_{1F}=404$ ms ($t=0$ min). El ajuste arrojó el valor de campo local $B_{Lz} = (1,2 \pm 0,2)$ kHz.

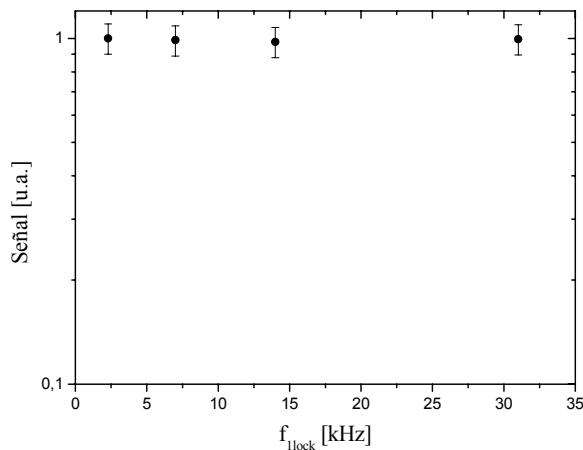


Gráfico 11. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para $\text{HbA}^{1'}$ en resonancia, a $T=36,7^{\circ}\text{C}$ y $T_{1F}=252$ ms ($t=555$ min).

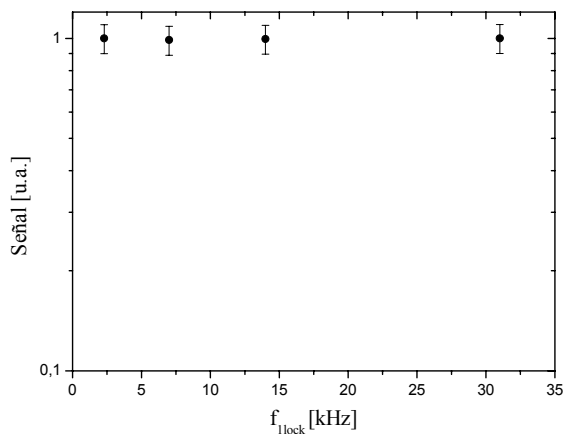


Gráfico 12. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para $\text{HbA}^{1'}$ en resonancia, a $T=36,7^{\circ}\text{C}$ y $T_{1F}=149$ ms ($t=1335$ min).

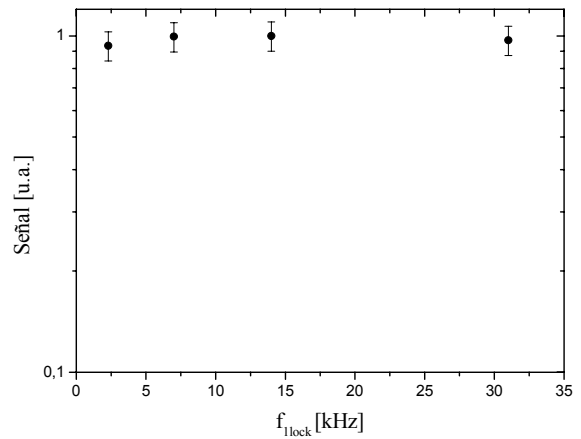


Gráfico 13. Intensidad de la señal, con supresión de la señal de protones de agua libre, en función de la frecuencia del pulso de lock, para $\text{HbA}^{1'}$ en resonancia, a $T=36,7^{\circ}\text{C}$ y $T_{1F}=238$ ms ($t=4445$ min).

Para la medición a $t = 0$ min (gráfico 10) se procedió a calcular el valor de campo local, el cual se estimó de antemano que no era 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 (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 $T_D = (100 \pm 50)$ ms, el mínimo valor del rango de este parámetro para el cual B_{Lz} era el más apropiado a la curva medida. Los restantes parámetros se fijaron en $\tau_{\text{lock}} = 5$ ms, $M_0=1$, y $T_b = 100$ ms. Del ajuste se obtuvo $B_{Lz} = (1,2 \pm 0,2)$ kHz.

Por otro lado, se observa 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 11), $t = 1335$ min (gráfico 12) y $t = 4445$ min (gráfico 13). Por esta razón no se hicieron ajustes en estos casos, pudiendo concluir directamente que el campo local es muy débil para estos tiempos. Así mismo, en el gráfico 13 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.

Así, los resultados muestran que el valor del campo local partiendo de un valor no nulo, se anula en el camino al mínimo de la curva T_{1F} vs. t , intentando recuperarse a un valor distinto de cero para tiempos bastante mayores al del mínimo (4445 min).

Finalmente, podemos concluir que 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 $T_{IF}(t)$ es sensible a un cambio de estructura en la proteína. A su vez, dicha evolución modifica el valor de campo local inicial, a tal punto que llega a ser muy bajo (indistinguible) luego de un cierto tiempo. Ambos resultados parecen ser consistentes con la interpretación de que la proteína se fragmenta, descompactándose en una estructura que ocupa mayor volumen en el espacio y mayor superficie expuesta al agua libre. De este modo, algunas de las interacciones residuales que contribuyen al campo local desaparecen, mientras que otras se promedian debido al aumento de intercambio de protones volumen-superficie. Para esta última observación, es importante reconocer que los campos locales observados están esencialmente relacionados a la población de protones estructurados en la superficie.

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 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.

V. CONCLUSIONES

A través de las mediciones del tiempo de relajación espín-red de protones en función del tiempo realizadas en Hb A, sumado a resultados obtenidos por otros autores [1-9], se asume, 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 tetrámero de Hb.

Los resultados experimentales permitieron indagar sobre la evolución temporal de T_{IF} . 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_{IF} toma su valor mínimo, el cual ocurre en promedio a los (1300 ± 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, exponiendo así la proteína una mayor superficie a las moléculas de agua de la solución.

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_{IF} . Este proceso se completa al momento en que T_{IF} toma un valor de saturación, es decir, en promedio a los (3700 ± 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 que los campos locales se ven alterados 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 [9,10]. 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 [9].

Es importante mencionar que otros autores [19] 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 la interpretación de los resultados. Actualmente se llevan a cabo nuevos experimentos con la finalidad de determinar el grado de influencia de dicho proceso, el cual podría resultar un

mecanismo adicional en la primera parte de la curva de $T_{1F}(t)$, pero difícilmente explicar la segunda parte.

25. N. Brandan, M. V. Aguirre, C. E. Gimenez, Hemoglobina, Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina. UNNE, Argentina (2008).

Referencias

1. L. Stryer, Bioquímica, segunda edición. Editorial Reverté, S.A. (1982).
2. R. E. Benesch, R. Benesch, M. E. Williamson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry, **48**, 2071-2075 (1962).
3. G. Viggiano, C. Ho, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry, **76**, 3673-3677 (1979).
4. M. L. Johnson, B. W. Turner, G. K. Ackers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biophysics, **81**, 1093-1097 (1984).
5. G. Weber, Protein Interactions (Routledge, Chapman & Hall, Inc. 1992).
6. B. R. Gelin, M. Karplus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Chemistry, **74**, 801-805 (1977).
7. R. E. Benesch, R. Benesch, G. Macduff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry, **54**, 535-542 (1965).
8. R. Benesch, R. E. Benesch, I. Tyuma, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry, **56**, 1268-1274 (1966).
9. A. Bellelli, A. Brancaccio, M. Brunori, J. Biol. Chem. **268**, 4742-4744 (1993).
10. A. G. Salvay, J. R. Grigera, M. F. Colombo, Biophysical Journal **84**, 564-570 (2003).
11. C.P. Slichter, Principles of Magnetic Resonance (Springer Verlag, Berlin, 1978).
12. A. Abragam, The Principles of Nuclear Magnetism (Clarendon Press, Oxford, 1961).
13. M. Eisenstadt, Biophys. J. **33**, 469-474 (1981).
14. E. Fukushima y S.B.W. Roeder, Experimental Pulse NMR, A Nuts and Bolts Approach (Addison-Wesley, Massachusetts, 1981).
15. R. Bhattacharyya y A. Kumar, Chem. Phys. Lett. **383**, 99-103 (2004).
16. R.K. Harris, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, A Physicochemical view (Pitman Books Ltd., London, 1983).
17. J. Perlo, E. Anorado, Revista Mexicana de Física, **52** (3), 230-237 (2006).
18. J. Perlo, E. Anorado, J. Magn. Reson. **181**, 262-270 (2006).
19. M. Lores, C. Cabal, Appl. Magn. Reson. **28**, 79-84 (2005).
20. S. Kiihne, R.G. Bryant, Biophys. J. **78**, 2163-2169 (2000).
21. A. Van-Quynh, S. Willson, R.G. Bryant, Biophys. J. **84**, 558-563 (2003).
22. T. R. Linstrom, S. H. Koenig, Journal of Magnetic Resonance, **15**, 344-353 (1974).
23. R. Kimmich, NMR Tomography, Diffusometry, Relaxometry (Springer Verlag, Berlin, 1997).
24. S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger, 150 and More Basic NMR Experiments (Wiley – VCH, Weinheim, 1998).