

Microviscosidad interna medida por resonancia paramagnética electrónica en glóbulos rojos de baja concentración de hemoglobina

A. M. GENNARO *⁽¹⁾ y A. LUQUITA⁽²⁾

⁽¹⁾ INTEC (CONICET) Y FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL, GÜEMES 3450, 3000 SANTA FE., ARGENTINA; ⁽²⁾ CÁTEDRA DE FÍSICA BIOLÓGICA, FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO, SANTA FE 3100, 2000 ROSARIO, ARGENTINA.

e-mail: agennaro@intec.unl.edu.ar

Resumen

La microviscosidad interna de glóbulos rojos con bajas concentraciones de hemoglobina (Hb) fue medida por resonancia paramagnética electrónica (RPE) usando el marcador de spin maleimido-tempo. Las poblaciones eritrocitarias con concentración de Hb disminuida fueron obtenidas con un método *in vitro* que conserva la forma y volumen celular normales. Se prepararon también soluciones de Hb de distintas concentraciones y se les midió la microviscosidad por RPE. Se encontró que la dependencia de la microviscosidad de eritrocitos y de soluciones de Hb con la concentración puede ser descripta por la misma ecuación exponencial. Esto significa que el citoplasma de los glóbulos rojos se comporta como una solución de Hb de concentración equivalente, y sus valores de microviscosidad no están afectados por la presencia de la membrana celular. La comparación de microviscosidad de soluciones de Hb con los datos de viscosidad macroscópica de otros autores permite concluir que las mediciones de microviscosidad dan información sobre la viscosidad intrínseca de la molécula en solución, pero no son sensibles a las interacciones intermoleculares.

Abstract

Internal microviscosity of erythrocytes with subnormal hemoglobin (Hb) concentrations was measured by electron paramagnetic resonance (EPR) using the spin label maleimido-tempo. Erythrocyte populations with low Hb concentrations were obtained by an *in vitro* procedure in which normal cell shape and volume are kept constant. Hb solutions with variable concentrations were prepared and their microviscosity was also measured by EPR. We found that the microviscosity dependence on concentration can be described by the same exponential equation, both for erythrocyte cytoplasm and for Hb solutions. This means that erythrocyte cytoplasm behaves like an Hb solution of equivalent concentration, and microviscosity values are not affected by the cell membrane. The comparison of microviscosity values of Hb solutions with macroscopic viscosity data from other authors allows us to conclude that microviscosity measurements give information about the intrinsic viscosity of the solute molecule, but they are not sensitive to intermolecular interactions.

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

Introducción

La viscosidad interna es un dato valioso en la determinación de las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos o eritrocitos. Depende de la concentración de hemoglobina (Hb), proteína globular que es la única macromolécula en solución en el citoplasma^{1,2}. La única forma de medir directamente esta viscosidad es por métodos espectroscópicos³⁻⁸, a través de la determinación del tiempo de correlación de moléculas marcadas capaces de atravesar la membrana celular. En estos casos se habla de "microviscosidad"⁹, ya que se mide la viscosidad del entorno inmediato de la molécula marcada.

Interesa establecer la dependencia precisa de la microviscosidad interna de los eritrocitos con la concentración de Hb en el citoplasma, denominada en bioquímica "concentración de Hb corpuscular media" (CHbCM). Algunos autores han encontrado evidencias de la influencia de la membrana celular en la microviscosidad interna de eritrocitos^{3,6}, mientras que otros concluyen que la microviscosidad interna está determinada únicamente por la CHbCM⁵. Sin embargo, en los estudios realizados hasta el presente, las variaciones de la CHbCM han sido obtenidas modificando el contenido celular de agua, mediante la variación de la osmolaridad del medio de suspensión^{3-5,8}. En este proceso el eritrocito se dilata (en medios hiposmóticos) o se encoge (en medios hiperosmóticos), variando simultáneamente el volumen celular, la concentración de los demás componentes citoplasmáticos y eventualmente las interacciones molécula-solvente. El objetivo de este trabajo es determinar la dependencia de la microviscosidad interna de los eritrocitos con la CHbCM manteniendo su forma y volumen constantes, lo que se logra a través de la lisis controlada. Los valores de CHbCM que se obtienen corresponden al rango hipocrómico (concentraciones menores que las normales). La microviscosidad interna fue medida por resonancia paramagnética electrónica (RPE). Para determinar si los resultados obtenidos están influenciados por la presencia de la membrana

celular⁶, se midió además la microviscosidad de soluciones de Hb en función de la concentración.

Experimental

Lisis controlada y gradiente de densidad. Los eritrocitos fueron expuestos a un medio hipotónico que provocó la salida del contenido citoplasmático^{2,10}. Posteriormente se indujo el resellado, en condiciones tales que permitieron reconstituir la forma y volumen normales del eritrocito, como así también la composición normal del citoplasma, pero con la concentración de Hb disminuida. Las poblaciones eritrocitarias fueron separadas en un gradiente de densidad de Dextrán (densidades específicas 1.06, 1.07 y 1.08).

Preparación de soluciones de Hb Se provocó lisis de eritrocitos por sonicación y se centrifugó extensivamente para separar todo resto de membranas^{5,11}. La solución obtenida se diluyó en solución salina tamponada (pH 7.4) a las concentraciones deseadas. La concentración de Hb fue medida por métodos espectrofotométricos y la CHbCM se calculó a partir de las técnicas bioquímicas usuales.

Espectros de RPE Fueron obtenidos a 25 °C y 9.7 Ghz (banda X) con un espectrómetro Bruker ER-200. Se usó como portamuestras una celda plana de cuarzo. Se utilizó el marcador de spin maleimida-tempo, radical nitróxido que atraviesa la membrana eritrocitaria y se une covalentemente al glutatión, tripéptido presente en el citoplasma^{4,7}. Por lo tanto, la molécula paramagnética cuyo espectro de RPE se registra es el compuesto glutatión + maleimida-tempo. La membrana celular es impermeable al producto de la reacción, de modo que los eritrocitos pueden lavarse para eliminar el marcador exterior. Para medir la microviscosidad de soluciones de Hb se les agregó glutatión marcado, en concentraciones menores a 0.5 mM para evitar efectos de ensanchamiento por intercambio¹². La figura 1 muestra un espectro de RPE típico, donde se observa la estructura hiperfina correspondiente al ¹⁴N (I = 1) con líneas finas y equiespaciadas, indicativas de un régimen de baja viscosidad. Esto confirma que el marcador se liga a una especie de alta movilidad (glutatión) y descarta

la posibilidad de que se ligue a la Hb o a proteínas de membrana, que darían un espectro característico de marcador "inmovilizado"¹³.

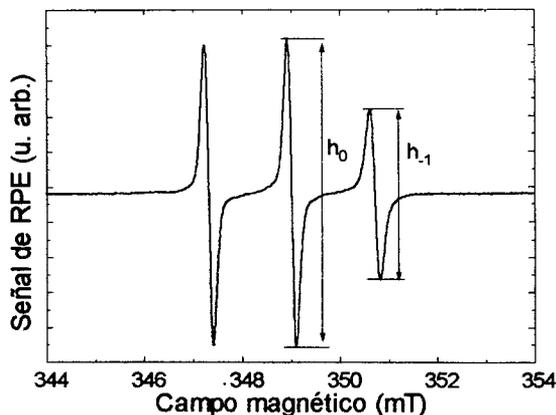


Figura 1. Espectro de RPE de eritrocitos marcados. La molécula paramagnética es glutatión + maleimida-tempo. El tiempo de correlación es en este caso 4×10^{-10} s. Frecuencia de microondas, 9.78 GHz; temperatura, 25 °C.

Determinación de la microviscosidad interna. El tiempo de correlación rotacional τ_c de la molécula marcada fue calculado a través de la

fórmula $\tau_c = 6.5 \cdot 10^{-10} \Delta H \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right)$ aplicable a líneas lorentzianas^{4,14} para las frecuencias de banda X, donde τ_c está en segundos, ΔH (en gauss) es el ancho pico a pico de la línea central del espectro y h_0, h_{-1} son las amplitudes que se muestran en la figura 1. El factor 6.5×10^{-10} está relacionado con la anisotropía de los tensores giromagnético e hiperfino y con la frecuencia de microondas^{15, 16}. La forma de línea experimental es una convolución de lorentziana y gaussiana, por lo que se evaluaron las correcciones desarrolladas por Bales¹⁷. En todos los casos, estas correcciones fueron menores del 10%, por lo que se usaron los valores iniciales de τ_c . A partir de ellos se calculó la microviscosidad usando una curva de calibración. Esta curva se realizó midiendo los espectros de glutatión marcado en soluciones de sacarosa de concentraciones conocidas, cuyas viscosidades (entre 1 y 9 mPa.s) fueron obtenidas de tablas. El gráfico de τ_c en función de la viscosidad dio una línea recta.

Se determinó además la microviscosidad de la solución salina (pH 7) por RPE

agregándole glutatión marcado. Se obtuvo el valor (1.15 ± 0.20) mPa.s

Resultados y discusión

Microviscosidad interna de eritrocitos y microviscosidad de soluciones de Hb La figura 2 muestra los valores experimentales de microviscosidad eritrocitaria en función de la concentración de Hb. También se incluyen en el gráfico los resultados obtenidos para soluciones de Hb. Se observa que los dos grupos de datos se unen en forma continua y tienen una variación lineal en el gráfico semilogarítmico, lo que permite hacer un ajuste con la función exponencial

$$\eta = \alpha \exp(\beta c) \quad (1)$$

donde c es la concentración de Hb en cada caso. La recta en la figura 2 corresponde al mejor ajuste por cuadrados mínimos de los datos experimentales. Los parámetros resultantes son $\alpha = (1.6 \pm 0.2)$ mPa.s, $\beta = (3.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-2}$ dl/g.

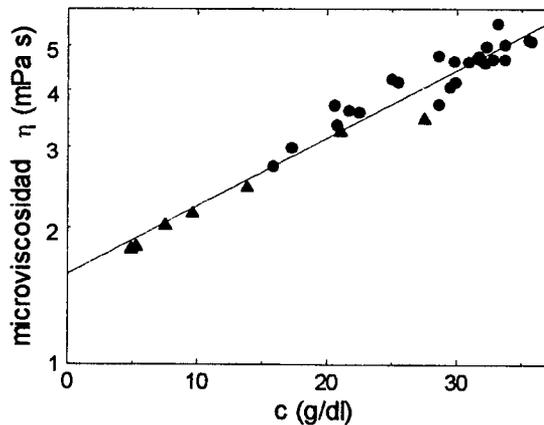


Figura 2. Gráfico conjunto, en escala semilogarítmica, de la microviscosidad de soluciones de Hb (triángulos) y de microviscosidad interna de eritrocitos (círculos) en función de la concentración de Hb.

La continuidad observada entre los valores de microviscosidad de eritrocitos y de soluciones de Hb, obedeciendo a una única función de la concentración de Hb, implica que las interacciones que restringen la rotación del glutatión marcado son las mismas en el interior globular que en una solución de Hb⁵. Por lo tanto, en lo que se refiere a microviscosidad, el citoplasma del eritrocito se comporta como una

solución de Hb de concentración equivalente, por lo que pueden usarse las mismas ecuaciones válidas para una solución de macromoléculas.

En una primera etapa de este trabajo se carecía de mediciones propias de soluciones de Hb, y la comparación con los resultados de Herrmann y Muller⁵ indicaba una microviscosidad relativa η/η_0 de soluciones de Hb menor que la interna de eritrocitos a concentraciones equivalentes. Sin embargo, la comparación de viscosidades relativas obtenidas con diferentes marcadores trae aparejados errores de calibración y de ajuste de curvas. Las mediciones en soluciones de Hb realizadas en nuestro laboratorio, con el mismo marcador y las mismas técnicas que en eritrocitos, permitieron demostrar que no hay diferencias significativas en la microviscosidad absoluta de ambos sistemas (fig. 2). Por lo tanto, la presencia de la membrana celular no afecta los valores de viscosidad citoplasmática, como fue sugerido por otros autores⁶.

Microviscosidad y viscosidad macroscópica de soluciones de Hb La dependencia de la viscosidad macroscópica con la concentración en soluciones de macromoléculas cuasiesféricas puede describirse por la ecuación de Mooney generalizada¹⁸

$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{[\eta]c}{1 - \kappa[\eta]c}\right) \quad (2)$$

donde η_0 es la viscosidad del solvente, $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca de la macromolécula (relacionada con su forma y estado de solvatación), c es la concentración y κ ("crowding factor"¹⁸) está relacionado con las interacciones entre macromoléculas. La viscosidad intrínseca de algunas proteínas en soluciones salinas acuosas fue tabulada por Tanford¹⁹. Para Hb es $[\eta] = 0.036$ dl/g, valor que usado en la fórmula de Mooney junto con $\kappa = 0.014$ reproduce muy bien los resultados experimentales de viscosidad de soluciones de Hb obtenidos por diversos autores con viscosímetros convencionales^{11, 18}.

Comparando ecuaciones 1 y 2 puede considerarse que la variación experimental de microviscosidad obtenida en este trabajo puede

describirse con una fórmula tipo Mooney en la cual valga $\kappa = 0$, $\eta_0 = \alpha = (1.6 \pm 0.2)$ mPa.s y $[\eta] = \beta = (0.034 \pm 0.001)$ dl/g. La viscosidad del solvente η_0 obtenida de esta comparación es algo mayor que el valor medido de la microviscosidad de la solución salina, pero se obtiene un excelente acuerdo con el valor de $[\eta]$ dado por Tanford¹⁹. El resultado $\kappa = 0$ que se infiere de los datos experimentales, puede entenderse considerando las diferencias entre viscosidad macroscópica y microviscosidad. La Hb tiene peso molecular 64000, mientras que la molécula marcada (glutación + maleimida-tempo) tiene un peso molecular aproximado de 560. Por lo tanto la diferencia de tamaños hace que la dinámica de la molécula marcada sea sensible a las propiedades de las macromoléculas aisladas, pero no a las interacciones entre ellas⁵. Así, el tiempo de correlación rotacional de la molécula marcada que se determina a partir del espectro de RPE, está relacionado con la viscosidad de su entorno inmediato, y no con la que se mediría en un viscosímetro. De este modo se explica que con este método se pueda determinar el valor correcto de la viscosidad intrínseca de la Hb, mientras que no se detecta ningún efecto atribuible a interacciones entre moléculas de Hb ($\kappa = 0$).

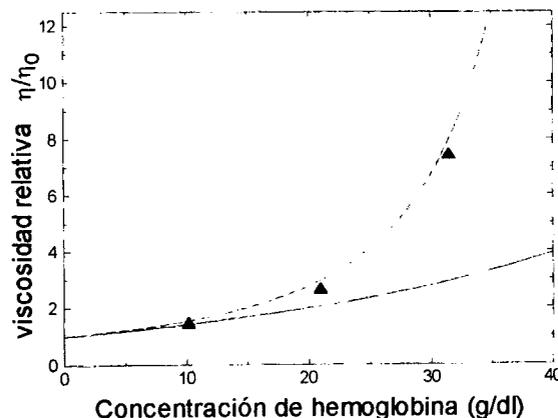


Figura 3. Viscosidades relativas. Triángulos: viscosidad macroscópica de soluciones de Hb (datos de Cokelet y Meiselman¹¹); línea de puntos: valores calculados con la fórmula de Mooney¹⁸ usando $[\eta] = 0.036$ dl/g y $\kappa = 0.014$; línea llena: ajuste de resultados de microviscosidad de este trabajo (eritrocitos y soluciones de Hb).

En la figura 3 se compara la microviscosidad relativa η/η_0 de este trabajo con

los valores de viscosidad macroscópica de soluciones de Hb obtenidos por Cokelet y Meiselman¹¹. Se incluye además la función correspondiente a la fórmula de Mooney¹⁸. Se observa que la viscosidad macroscópica crece mucho más fuertemente con la concentración de Hb que la microviscosidad, debido a la influencia de las interacciones entre moléculas. Sin embargo, ambas viscosidades coinciden a bajas concentraciones, donde las interacciones intermoleculares no son aún importantes.

Conclusiones

En este trabajo se determinó la dependencia con la concentración de Hb de la microviscosidad interna de eritrocitos hipocrómicos de forma y volumen constantes, y se la comparó con la microviscosidad de soluciones de Hb. Las principales conclusiones son: a) la microviscosidad interna de eritrocitos

determinada por RPE es similar a la de soluciones de Hb de concentraciones comparables, sin que se detecten efectos atribuibles a la presencia de la membrana celular; b) la medición de microviscosidad no es sensible a las interacciones entre moléculas de Hb, pero brinda información correcta sobre la viscosidad intrínseca de la molécula en solución.

Se concluye que la RPE puede ser una herramienta valiosa en el estudio de propiedades internas de las células. En particular, la metodología utilizada en este trabajo puede aplicarse a la investigación de anemias hipocrómicas, en las que se conserva la forma eritrocitaria normal.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el CIUR (Universidad Nacional de Rosario) y por CONICET (PID 3761/92) en Santa Fe.

Referencias

1. Mohandas N., Chasis J. A., y Shohet S. *Seminars in Hemat.* 20, 225-242 (1983)
2. Nash G.B. y Meiselman H.J. *Biophys. J.* 43, 63-73 (1983)
3. Morse II P.D., Lusczakoski D.M. y Simpson D.A., *Biochemistry* 18, 5021-5029 (1979)
4. Daveloose D., Fabre G., Berleur F., Testylier G., y Letierrier F., *Biochim. Biophys. Acta* 763, 41-49 (1983)
5. Herrmann A. y Muller P., *Biochim. Biophys. Acta* 885, 80-87 (1986)
6. Morse II P.D. y Warth J. A., *Biochim. Biophys. Acta* 1053, 49-55 (1990)
7. Eriksson L.E. y Beving H. *Archiv. Biochem. Bioph.* 303, 296-301 (1993)
8. Endre Z.H., y Kuchel P.W., *Biophys. Chem.* 24, 337-356 (1986)
9. Tanford C. "The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes", pp. 42-49, Wiley, New York, 2nd. ed. (1980)
10. Schwoch, G., y Passow, H. *Mol. Cell. Biochem.* 2, 197-218 (1973)
11. Cokelet G.R. y Meiselman H.J., *Science (Wash., D.C.)* 162, 275-277. (1968)
12. Morse II P.D., Ruhlig M., Snipes W., y Keith A.D. *Arch. Biochem. Biophys.* 168, 40-56 (1975)
13. Wertz J.E. y Bolton J.R. "Electron Spin Resonance-Elemental Theory and Practical Applications", pp 192-221, Mc. Graw-Hill Inc. (1972)
14. Raison J.K., Lyons J.M., Melhorn R.J., y Keith A. D. J. *Biol. Chem.* 246, 4036-4040 (1971).
15. Kivelson D. J. *Chem. Phys.* 33, 1094-1106 (1960).
16. Griffith O.H., Cornell D.W. y McConnell H.M. *J. Chem. Phys.* 43, 2909-2910 (1965).
17. Bales B.L. en "Biological Magnetic Resonance" (Spin Labeling - Theory and Applications, Berliner L.J. y Reuben J., eds.), Vol. 8, pp. 255-303, Plenum Press, New York. . (1989)
18. Ross P.D. y Minton A.P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 971-976 (1977).
19. Tanford C. "Physical Chemistry of Macromolecules", pp. 390-396, Wiley, New York (1961)