

Evaluación de la interacción hemoglobina-membrana durante la polimerización de la hemoglobina S

José E. Falcón-Dieguez,* Pablo Rodi,** Manuel A. Lores-Guevara,*
Ana María Gennaro**

RESUMEN

En la anemia drepanocítica ha sido previamente documentada una anormal interacción hemoglobina-membrana. Sin embargo, no se conoce cómo se modifica ésta durante el proceso de polimerización de la hemoglobina S. En este trabajo empleamos un modelo de eritrocitos reconstituidos a partir de membranas fantasmas cuyas proteínas del citoesqueleto se marcaron con el marcador de espín 4-maleimido Tempo y posteriormente se resellaron con hemoglobina S o hemoglobina A. Estudiamos la variación temporal del parámetro espectral W/S, indicativo del estado conformacional de las proteínas del citoesqueleto, principalmente de la espectrina, a fin de detectar los eventuales efectos debidos al proceso de polimerización por desoxigenación espontánea. Las diferencias observadas en los comportamientos de la variación temporal de W/S en eritrocitos reconstituidos con ambas hemoglobinas fueron consideradas como evidencia experimental de un incremento de la interacción hemoglobina S-membrana como resultado del proceso de polimerización de la hemoglobina S bajo condiciones de desoxigenación espontánea.

Palabras clave: Hemoglobina-membrana, polimerización hemoglobina S, eritrocitos reconstituidos, 4-maleimido Tempo.

ABSTRACT

An enhanced hemoglobin-membrane association has been previously documented in the sickle cell disease. However, it is not known how this interaction is modified during the hemoglobin S polymerization process. In this work, we use a model of reconstituted erythrocytes from ghost membranes whose cytoskeleton proteins were labelled with the 4-maleimido Tempo spin label, and that were subsequently resealed with haemoglobin S or A. We studied the time dependence of the spectral W/S parameter, indicative of the conformational state of cytoskeleton proteins (mainly spectrin), with the aim of detecting the eventual effects due to hemoglobin S polymerization. The differences observed in the temporal behavior of W/S in erythrocytes reconstituted with both hemoglobins were considered as experimental evidence of an increment in hemoglobin S-membrane interaction, as a result of the hemoglobin S polymerization process under spontaneous deoxygenation.

Key words: Hemoglobin-membrane, hemoglobin S, polymerization, reconstituted erythrocytes, 4-maleimido Tempo.

INTRODUCCIÓN

La polimerización de la hemoglobina S (HbS) constituye el proceso molecular base de la anemia drepanocítica (AD).^{1,2} Su desarrollo ha sido ampliamente estudiado en el Centro de Biofísica Médica utilizando la resonancia magnética.³⁻⁷ Sin embargo, las principales manifestaciones fisiopatológicas de la enfermedad tienen su origen en la forma y propiedades físicas del eritrocito, directamente relacionadas éstas con la membrana celular. Por lo tanto, la interacción hemoglobina (Hb)-membrana y su posible modificación como resultado del proceso de polimerización de la HbS debe ser un factor determinante en la fisiopatología de la AD.

* Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente.

** INTEC (CONICET-UNL), Guemes 3450, 3000 Santa Fe, Argentina, y Departamento de Física, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Ciudad Universitaria, 3000 Santa Fe, Argentina.

Correspondencia:

Lic. José Ernesto Falcón Dieguez.
Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente, Patricio Lumumba s/n, 90500, Santiago de Cuba, Cuba.
Fax: (53) (22) 632545.
E-mail: falcon@cbm.uo.edu.cu

Recibido: 12-05-2008

Aceptado: 13-04-2009

Numerosos reportes han documentado que existe una interacción anormal HbS-membrana. La HbS interactúa mucho más fuertemente con la membrana que la hemoglobina A (HbA), presente en eritrocitos normales. Se ha reportado que este anormal enlace trae como consecuencia una disminución de la interacción entre las proteínas componentes de la membrana y un efecto significativo sobre el proceso de polimerización de la HbS.⁸⁻¹³

Fung y cols,¹² empleando la técnica de marcadores de espín de resonancia paramagnética electrónica (RPE), compararon las interacciones de las moléculas de HbS y HbA con la membrana eritrocitaria, determinando que las moléculas de HbS mostraban una mayor asociación a la membrana. Sin embargo, hasta la actualidad no se ha evaluado cómo se modifica esta interacción durante el proceso de polimerización.

Se ha establecido que la polimerización debida a la desoxigenación espontánea de eritrocitos *in vitro* ocurre en un plazo aproximado de 300 min.^{3,14} En este trabajo proponemos evaluar cómo se modifica la interacción Hb-membrana durante la polimerización de la HbS bajo condiciones de desoxigenación espontánea, empleando la técnica de marcadores de espín. Para esto se empleó un modelo consistente en eritrocitos reconstituidos a partir de membranas fantasmas cuyas proteínas del citoesqueleto se marcaron con el marcador de espín 4-maleimido Tempo. Estas membranas fantasmas se mantuvieron abiertas durante el proceso de marcación y posteriormente se resellaron en soluciones concentradas de HbA ó HbS, a fin de conseguir eritrocitos reconstituidos con sus membranas marcadas. En ambos sistemas se estudió la variación temporal del parámetro espectral W/S, indicativo del estado conformacional de las proteínas del citoesqueleto, principalmente de la espectrina, a fin de detectar los eventuales efectos debidos al proceso de polimerización de la HbS por desoxigenación espontánea.

MÉTODOS

Obtención de muestras

Las muestras de sangre provenientes de donantes voluntarios sanos y pacientes homocigotos de AD, se extrajeron por punción venosa con jeringas heparinizadas.

Preparación de membranas fantasmas abiertas de eritrocitos normales

Los fantasmas (membranas de eritrocitos libres de Hb) abiertos se prepararon a partir de eritrocitos de

pacientes sanos según el método de Steck y Kant.¹⁵ Los eritrocitos fueron concentrados por centrifugación (1,500 g, 5 min), descartando el plasma. El paquete celular se lavó 3 veces con amortiguador fosfato salino (PBS) (150 mM NaCl, 5 mM fosfato de sodio, pH = 8). Las células fueron entonces hemolizadas por incubación de un volumen de eritrocitos empaquetados en 10 volúmenes de amortiguador fosfato hipotónico 5 mM, pH = 8 (5P8), por 5 min. Las membranas fantasmas abiertas se empaquetaron y separaron por centrifugación a 22,000 g, 10 min, a 4 °C. Luego se lavaron 4 veces con 5P8 a 4 °C para completa separación de la Hb. En estas condiciones de trabajo las membranas se mantienen abiertas.¹⁵

Incorporación del marcador de espín a las membranas

Las membranas fantasmas abiertas de 4 mg/mL en concentración de proteínas (dato según método de preparación)¹² fueron marcadas con el marcador de espín 4-maleimido-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil (4-maleimido Tempo, ó 4MT). Se empleó una relación de marcaje de 50 μ g de marcador por mg de proteína. El marcador almacenado en etanol se evaporó con un flujo gentil de nitrógeno (N₂) previo a la introducción de las membranas fantasmas. Después de una hora de incubación en la oscuridad a 4 °C con ciclos de agitación suave cada 15 minutos, las membranas marcadas se lavaron 4 veces con amortiguador 5P8 para remover el marcador de espín no enlazado. Previamente se determinó el número de lavados necesarios para garantizar la total remoción del marcador libre a través de la toma de espectros de RPE de los sobrenadantes de cada lavado. Las membranas se almacenaron toda la noche en amortiguador 5P8 (con 3 g/L de albúmina sérica bovina (BSA)) y a 4 °C hasta su reconstitución al día siguiente.

Preparación de soluciones de hemoglobina

La preparación de soluciones de hemoglobina se realizó según el procedimiento de Clark y Shohet¹⁶ con pequeñas modificaciones. Eritrocitos lavados con PBS (pH = 7.4), tanto de dadores normales (HbA) como de pacientes de anemia drepanocítica (HbS) fueron hemolizados en 10 volúmenes de amortiguador diluido (2.5 mM fosfato de sodio, pH = 7.4). La hemoglobina se separó de la fracción de membrana por dos centrifugaciones a 22,000 g, 10 min, 4 °C, posteriormente, las soluciones diluidas de hemoglobina se concentraron hasta aproximadamente 20 g/dL con

filtros de centrifugación de 30,000 (NMWL Amicon® Ultra).

Preparación de eritrocitos reconstituidos a partir de las membranas marcadas

Para la reconstitución de los eritrocitos se siguió el método descrito por Clark y Shohet.¹⁶ En breve, se añadieron tres volúmenes de solución de Hb concentrada (HbA ó HbS) a un volumen de membranas fantasmas abiertas marcadas, se dejó equilibrar 5 min y se añadió ATP (80 mM), y CaCl₂ para una concentración final de 1 mM. La solución se mezcló y se añadió suficiente KCl para restaurar la molaridad a 150 mM. Se incubó a 37 °C por una hora con agitación suave periódica para promover el resellado de las membranas. El exceso de hemoglobina no atrapada y otros elementos añadidos se eliminó realizando varias resuspensiones y lavados en PBS con 2 g/L de glucosa y 3 g/L de BSA, a pH = 7.4. Finalmente, en los paquetes de eritrocitos reconstituidos obtenidos se observó a simple vista dos gradientes de concentración, los que se separaron cuidadosamente en dos fracciones, una densa y otra ligera.

A fin de tener un sistema blanco para monitorear la variación temporal de W/S en ausencia de la interacción Hb-membrana, se resellaron en las mismas condiciones membranas fantasmas en una solución con los mismos componentes que la anterior, pero sin Hb.

Experimentos de RPE

Los experimentos se realizaron a la frecuencia de 9.7 GHz (banda X) en un espectrómetro Bruker ER 200. Las muestras fueron colocadas en capilares de paredes finas sellados en ambos extremos. La temperatura se reguló con un sistema de flujo de nitrógeno Bruker VT1000 manteniéndose a 36 ± 1 °C.

Se trabajó con una modulación de 100 KHz de frecuencia. La amplitud de modulación se reguló según las necesidades del experimento. La potencia de microondas fue de 2 mW. Se obtuvieron espectros a tiempos preestablecidos, manteniendo en todo momento las muestras a temperatura constante.

El grupo maleimido del marcador 4 MT establece un enlace covalente con el azufre del aminoácido cisteína en la cadena polipeptídica de las proteínas. Su espectro de EPR en proteínas es compuesto, indicando el enlace del marcador en dos tipos de sitios: uno fuertemente inmovilizado, que da lugar a un espectro de líneas más anchas y separadas, y uno débilmente

inmovilizado, que da lugar a un espectro de líneas más finas. La contribución relativa de ambos tipos de sitio se evalúa a partir del parámetro W/S,¹² calculado como indica la *figura 1* a partir de las líneas de campo bajo del espectro.

El comportamiento del parámetro espectral W/S se evaluó temporalmente en muestras de membranas fantasmas marcadas reselladas sin incorporar le hemoglobina, donde sólo se evalúa el comportamiento del marcador en el tiempo, con ausencia de la interacción de la Hb-membrana, y en muestras de eritrocitos reconstituidos con HbS y HbA, donde se compara el efecto de ambas hemoglobinas.

Observación al microscopio y obtención de imágenes

Las muestras recién obtenidas se observaron al microscopio por el método de la "gota fresca". Se depositaron pequeñas alícuotas de eritrocitos reconstituidos en portaobjetos previamente cubiertos con solución de albúmina, a fin de evitar el "efecto vidrio". Se cubrieron con cubreobjetos y se observaron con aumentos de 400 X y 1000X en un microscopio óptico Axio-lab, (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes fueron capturadas con una cámara de video digital (SSC-DC50A, Sony, Japón)

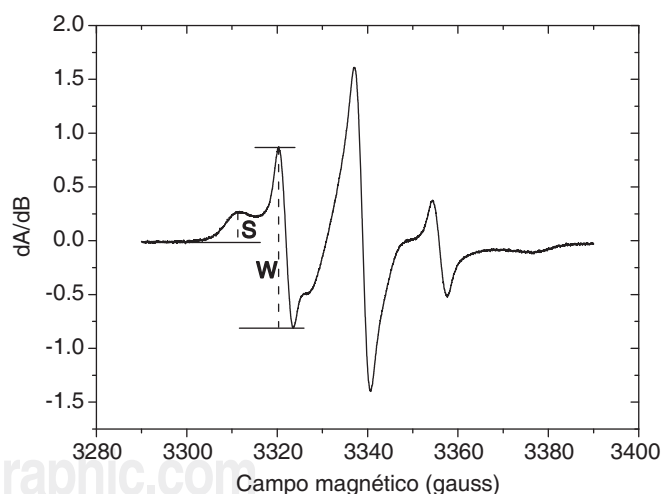


Figura 1. Espectro de EPR típico del marcador de espín 4MT en membranas fantasmas de eritrocitos reselladas, (W- pico del marcador de espín débilmente inmovilizado, y S fuertemente inmovilizado). Espectro a 9.7 GHz (banda X), frecuencia de modulación 100 KHz, amplitud de modulación 1.25 gauss, potencia de microondas 2 mW, temperatura: 36 ± 1 °C.

RESULTADOS

Morfología de los eritrocitos reconstituidos

Los eritrocitos reconstituidos obtenidos presentan un aspecto similar a los eritrocitos normales, como se observa en la *figura 2*.

Espectros de RPE

Los espectros de RPE de eritrocitos reconstituidos marcados con 4MT se observan en la *figura 1*, pudiéndose observar que en la zona de bajos campos se evidencia claramente la presencia de dos componentes espectrales, indicando la coexistencia de dos poblaciones del marcador de espín con movilidades marcadamente diferentes. Los componentes espectrales se cuantifican con W (altura del pico de campo bajo de la componente débilmente inmovilizada) y S (altura pico a pico de la línea de campo bajo de la componente fuertemente inmovilizada).

En la *figura 3* se muestra el comportamiento de W/S en función de la temperatura en eritrocitos reconstituidos con HbA. Se observa un incremento de W/S con la temperatura, indicativo del aumento gradual de la población de marcador con mayor movilidad. En nuestros estudios se trabajó a 36 ± 1 °C y $\text{pH} = 7.4$.

Evolución temporal de W/S: comparación entre eritrocitos reconstituidos con HbA y membranas reselladas sin Hb

La *figura 4* muestra el comportamiento temporal de W/S en membranas fantasmas de eritrocitos reselladas y en eritrocitos reconstituidos con HbA. En el caso de los eritrocitos reconstituidos se cuenta con dos fracciones, una densa y otra ligera.

El tiempo inicial ($t = 0$) corresponde al momento en que las muestras se equilibran a la temperatura de 36 °C, y por lo tanto los valores registrados en la *figura 4* no coinciden con el tiempo transcurrido desde la marcación de la membrana. Esto explica por qué los valores iniciales de las membranas reselladas sin Hb son tan grandes.

El incremento en el tiempo del parámetro W/S que puede observarse en la *figura 4* para todas las muestras hace sospechar un efecto no deseado de liberación del marcador, ya que el espectro de marcador libre se superpone al del marcador débilmente inmovilizado, aumentando el valor aparente del parámetro W. Esto pudo ser comprobado, al final de la corrida

de los experimentos, hemolizando las muestras y determinando la presencia de marcador libre en el amortiguador de lisis, tanto en los eritrocitos reconstituidos como en las membranas fantasmas reselladas sin hemoglobina. Sin embargo, como puede observarse en la *figura 4*, el incremento relativo es más importante en las muestras de membranas sin hemoglobina, lo que sugiere que la interacción Hb-membrana puede dificultar la liberación del marcador.

La cinética de liberación del marcador muestra una tendencia lineal. De la comparación entre eritrocitos reconstituidos densos y ligeros, se puede apreciar que la liberación o incremento de la fracción débilmente inmovilizada del marcador es función de la concentración, (el incremento relativo $(W/S_{\text{final}} - W/S_{\text{inicial}}) / W/S_{\text{inicial}}$ es 0.27 ± 0.001 en los eritrocitos reconstituidos densos y 0.57 ± 0.004 en los ligeros).

Evolución temporal de W/S: comparación entre eritrocitos reconstituidos con HbA y con HbS

En la *figura 5* se compara el comportamiento temporal de eritrocitos reconstituidos con HbA y HbS. Se observa que W/S se incrementa linealmente con pendientes similares para HbA y HbS hasta un tiempo aproximado de 250 min, a partir del cual la pendiente de las muestras con HbS disminuye abruptamente, indicando una reducción importante del proceso de liberación del marcador.

Aceptando la hipótesis de que el incremento lineal de W/S con el tiempo se debe a la liberación gradual del marcador, si restamos a los datos experimentales la recta de ajuste lineal correspondiente obtendremos un conjunto de valores que se mantendrán aproximadamente constantes en torno a cero, siempre que se mantenga constante el ritmo de liberación de marcador. La *figura 6* muestra los resultados obtenidos al realizar esta operación con los datos de eritrocitos reconstituidos con HbA y HbS. Puede observarse que los datos de (W/S-ajuste lineal) correspondientes a eritrocitos reconstituidos con HbA se mantienen próximos a cero para todo tiempo, mientras que los de HbS (a los que se les sustrajo el ajuste lineal de las curvas hasta $t = 250$ min) muestran un cambio a partir de dicho tiempo.

DISCUSIÓN

Hemos estudiado las diferencias en la evolución temporal de sistemas de eritrocitos reconstituidos con HbS y HbA, donde la membrana fue previamente marcada con un marcador de espín que se une cova-

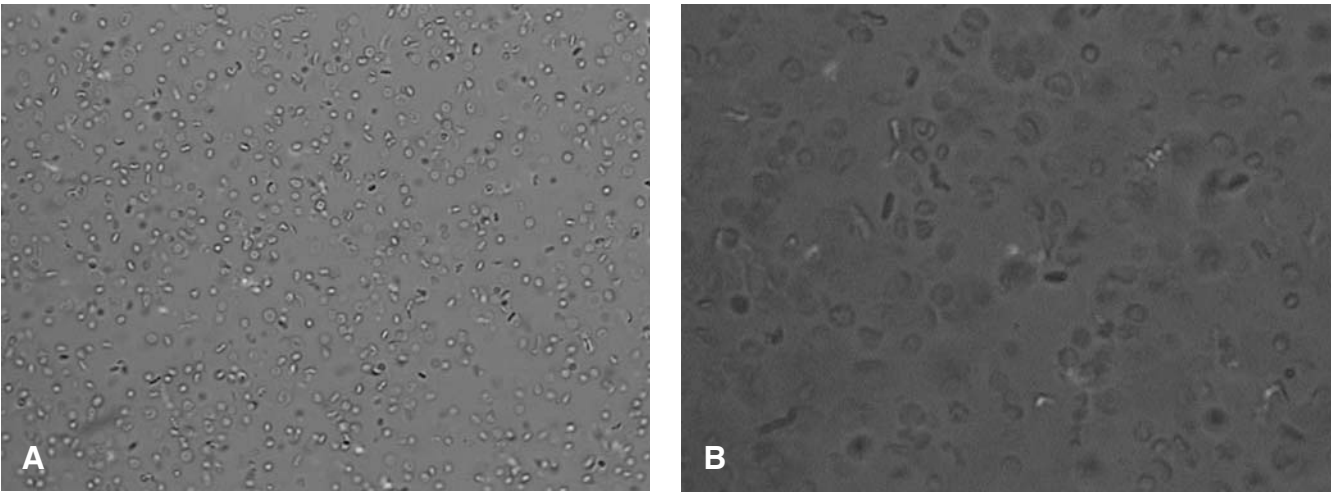


Figura 2. Muestras de eritrocitos reconstituidos recién preparadas, observadas al microscopio por el método de la "gota fresca". A. Microscopio óptico Axiolab, (Carl Zeiss, Alemania) aumento de 400 X; B. 1000 X. Cámara de video digital (SSC-DC50A, Sony, Japón).

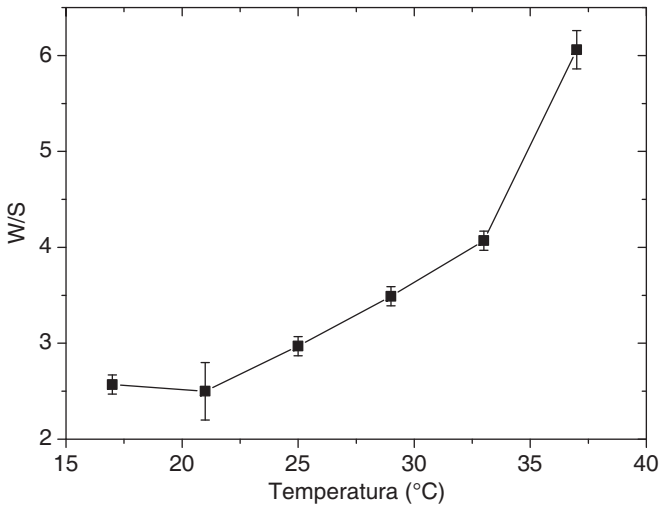


Figura 3. Relación W/S en eritrocitos reconstituidos con HbA en función de la temperatura (pH 7.4). La temperatura se varió en orden descendente, con un periodo de medición de aproximadamente 10 min.

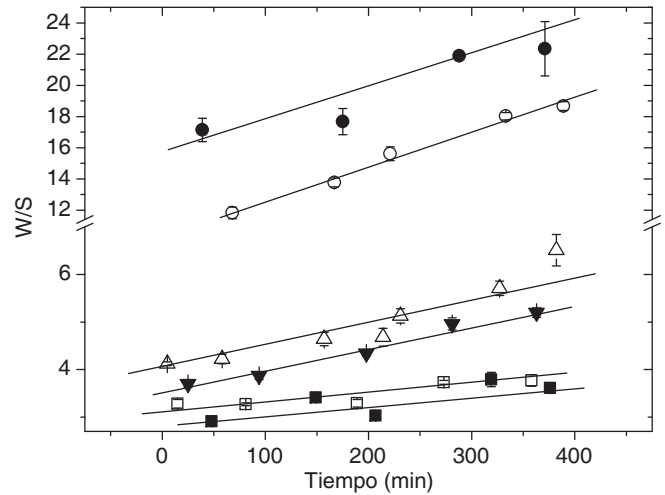


Figura 4. Comportamiento temporal de W/S de membranas fantasma reconstituidas con y sin HbA. Valores de réplica de membranas reconstituidas sin HbA (●, ○), de membranas reconstituidas con HbA de fracción densa (□, ■) y ligera (△, ▽). Espectros a 9.7 GHz (banda X), amplitud de modulación 4 gauss, potencia de microondas 2 mW, temperatura: 36 ± 1 °C. Las líneas corresponden a ajustes lineales.

lentamente a las proteínas. Nuestro objetivo fue detectar cambios en la membrana vinculados a la polimerización intracelular espontánea de la HbS.

Se seleccionó el sistema de eritrocitos reconstituidos a partir de membranas fantasma en amortiguador de fosfato a 5 mM, pH = 7.4 debido a que las mismas constituyen un sistema de membranas abiertas bien caracterizado.¹⁵ Esto permite el acceso del mar-

cador a la superficie interna, necesario para establecer las uniones con las proteínas del citoesqueleto. Por otro lado, el resellado de las mismas con soluciones de Hb da lugar a células que se asemejan estrechamente al eritrocito intacto.

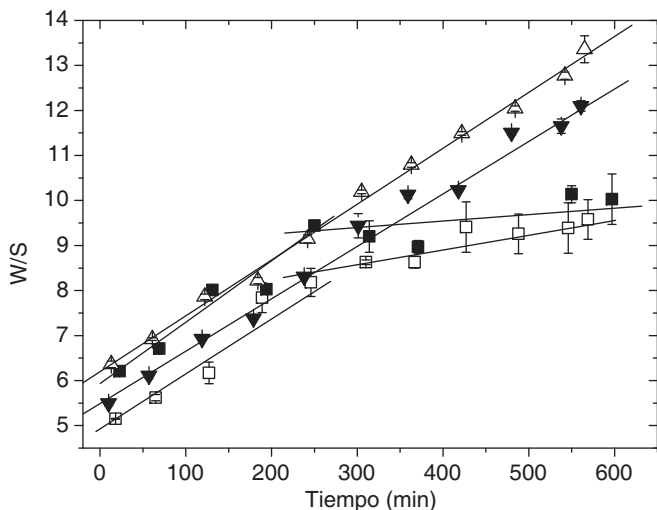


Figura 5. Comportamiento temporal de los W/S de eritrocitos reconstituidos con HbA y HbS. Valores de réplica de membranas reconstituidas con HbA fracción densa (▼) y ligera (△), membranas reconstituidas con HbS fracción densa (□) y ligera (■). Espectros a 9.7 GHz (banda X), Modulación 100 KHz, potencia de microondas 2 mw, amplitud de modulación 4 gauss, potencia de microondas 2 mW, temperatura: 36 ± 1 °C.

Los espectros de RPE de eritrocitos reconstituidos marcados con 4MT son similares a los de membranas fantasmas de eritrocitos reportados en la literatura.^{17,18} La relación W/S es altamente sensible a las condiciones experimentales, a cambios conformacionales que ocurran en las proteínas del citoesqueleto de las membranas, así como a la asociación de hemoglobinas a las proteínas de membrana.^{12,18}

En nuestro trabajo observamos que los valores de W/S en eritrocitos reconstituidos presentan una variación importante cuando se trabaja con muestras diferentes, no así cuando se trabaja con réplicas de una misma muestra. Esta relación es también muy sensible a varios parámetros experimentales, tales como el pH y temperatura.¹⁹

Se marcaron membranas abiertas y posteriormente se resellaron de tres maneras: con solución salina, con HbA y con HbS. Encontramos una evolución temporal de los espectros que mostramos que es atribuible a la liberación gradual de marcador. La cinética de liberación del marcador muestra una tendencia lineal, lo que coincide con reportes previos de que la interacción Hb-membrana es dependiente de la concentración de Hb,^{8,12} provocando así un mayor impedimento a la liberación del marcador. El ritmo de esa variación temporal difiere para membranas reselladas

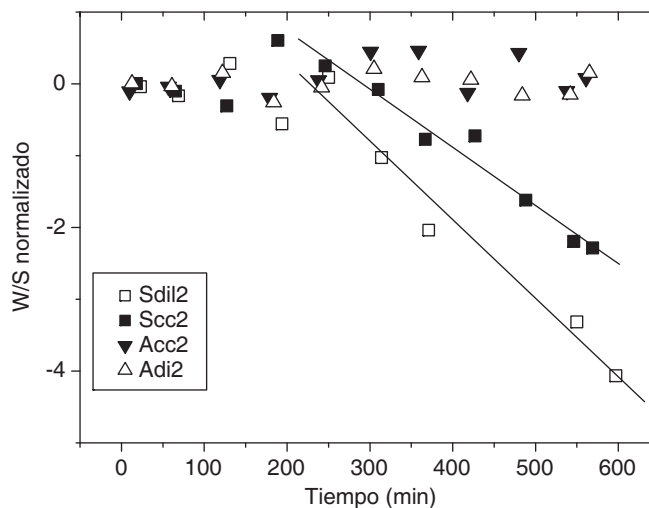


Figura 6. Comportamiento temporal de los W/S normalizados de eritrocitos reconstituidos con HbA y HbS. A los valores se le sustrajo el ajuste lineal de las curvas hasta el tiempo de 250 min y se normalizaron los valores obtenidos. Valores de réplica de membranas reconstituidas con HbA fracción densa (▼) y ligera (△), membranas reconstituidas con HbS fracción densa (□) y ligera (■). Espectros a 9.7 GHz (banda X), Modulación 100 KHz, potencia de microondas 2 mw, amplitud de modulación 4 gauss, potencia de microondas 2 mW, temperatura: 36 ± 1 °C.

sin Hb, con HbA y con HbS. En particular, para el caso de la HbS, se observa un cambio importante a un tiempo del orden de los 250 min, coincidente con el del comienzo del proceso de polimerización por desoxigenación espontánea.

El tiempo en el que se produce el cambio en la liberación del marcador coincide con los valores reportados de tiempo de demora (t_d) del proceso de polimerización de la HbS bajo condiciones de desoxigenación espontánea estudiado por técnicas de relajación protónica.^{3,5,14} En trabajos previos hemos reportado estudios del proceso de polimerización con el empleo de la relajación magnética protónica, tanto en soluciones de HbS como en paquetes de eritrocitos de pacientes de AD, usando condiciones de desoxigenación espontánea. En estos estudios se ha obtenido un comportamiento temporal de los tiempos de relación espín-retículo (T1) y espín-espín (T2) con características sigmoidales;^{3,5-7,14,20} este comportamiento sigmoidal ha sido relacionado con las tres etapas del proceso de polimerización de la HbS. Una primera etapa corresponde con la nucleación, donde las agregaciones moleculares entre monómeros de moléculas de HbS son mayoritariamente reversibles, la segunda con el desa-

rollo irreversible de la polimerización, y la tercera con la alineación y crecimiento de los polímeros (formación de microdominios estructurales inhomogéneos). Los valores de t_d (tiempo en el cual se desencadena el desarrollo irreversible de la polimerización) reportados en estos estudios a partir de T1 y T2, son de 355 ± 82 y 325 ± 68 min, respectivamente.¹⁴

Otros trabajos informan la presencia de un proceso de desoxigenación espontánea en muestras de HbS y HbA, sin que éstas sean sometidas a ningún proceso de desoxigenación forzada. Se muestra que se alcanza un 10% de desoxigenación en tiempos alrededor de los 250 min, tiempo similar a los reportados para el inicio irreversible de la polimerización.^{21,22}

El incremento de la asociación de la HbS con la membrana eritrocítica ha sido previamente documentado por un número de investigadores.⁸⁻¹³ Fung y col.,¹² usando la técnica de marcadores de espín en membranas fantasmas, mostraron que la unión de moléculas de HbS a la membrana a pH fisiológico está incrementada cuando se compara con la Hb normal. Eisinger y col.,²³ usando medidas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) sobre eritrocitos SS oxigenados intactos, mostraron que la concentración de HbS próxima a la membrana (h_b) es significativamente mayor que la concentración de Hb en el citoplasma (h_c), y que la relación entre estas dos concentraciones (h_b/h_c) aumenta con la concentración de Hb celular.

Consideramos que los cambios obtenidos en nuestro trabajo, en la evolución temporal de los espectros de membranas reselladas con HbS, se deben a un fortalecimiento de la interacción Hb-membrana con el proceso de polimerización, lo que pudiera constituir un vínculo directo entre las anomalías presentes en las membranas de los eritrocitos falciformes y la polimerización de la HbS.

En el transcurso de los eritrocitos en el sistema circulatorio ocurren ciclos repetitivos de polimerización-despolimerización debido al ciclo de oxigenación-desoxigenación; por lo tanto, según nuestros resultados ocurrirían también ciclos de incremento de asociación Hb-membrana, los que deben tener un efecto deletéreo sobre la organización y funcionamiento de la membrana celular. Efectos que pueden ser irreversibles si se tiene presente la formación de los eritrocitos irreversiblemente falciformes (EIF). Células que no recuperan su forma normal después de la oxigenación, son pobremente deformables, deshidratadas, de tiempo de vida media corto, asociadas a hemólisis y episodios de crisis vasooclusivas.²⁴ Algunos pacientes con AD tienen de 5-40% de los eritro-

citocitos en su sistema circulatorio como EIF. También se conoce que todos los eritrocitos de pacientes con AD se convierten en EIF cuando son sometidos a varios ciclos de oxigenación-desoxigenación. De esa manera, la polimerización es reversible, pero la falciformación de las células es irreversible. Por lo expuesto, creemos que el incremento de la interacción Hb-membrana durante el proceso de polimerización de la HbS debe tener un papel fundamental en las anomalías que se presentan en la membrana, causante de las principales manifestaciones patológicas de la AD. Nuevos estudios del papel de la polimerización en la interacción Hb-membrana, y su trascendencia en las anomalías de la membrana son necesarios.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el Programa de Cooperación Binacional SECyT (Argentina)-CITMA (Cuba), la Universidad de Oriente (Santiago de Cuba, Cuba), la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) y el CONICET (Argentina). AMG es investigadora y PMR es becario de CONICET. Agradecemos al Bioquímico A. Sartore por su gentileza en la obtención de las muestras de sangre de pacientes homocigotas de Anemia Drepanocítica.

REFERENCIAS

1. Eaton WA, Hofrichter J. Sick cell hemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem.* 1990; 40: 63-279.
2. Li X, Briehl RW, Bookchin RM, Josephs R, Wei B, Manning JM, et al. Sick cell hemoglobin polymer stability probed by triple and quadruple mutant hybrids. *J Biol Chem.* 2002; 277: 13479-87.
3. Lores M, Cabal C. Proton magnetic relaxation process during the polymerization of hemoglobin S. *Appl Magn Reson.* 2005; 28: 79-84.
4. Lores M, Cabal C, Gennaro AM. EPR study of the hemoglobin rotation correlation time and microviscosity during the polymerization of hemoglobin S. *Appl Magn Reson.* 2006; 30: 121-8.
5. Fernández A, Cabal C, Losada J, Álvarez E, Soler C, Otero J. *In vivo* action of vanillin on delay time determined by magnetic relaxation. *Hemoglobin.* 2005; 29: 181-7.
6. Cabrales Y, Lores M, Machado Y. Deuterium magnetic relaxation process during the polymerization of hemoglobin S. *Appl Magn Reson.* 2008; 33: 207-12.
7. Falcón JE, Del Toro G, Alonso Y. Evaluación de la actividad antipolimerizante de 4 aldehídos aromáticos en hemoglobina S usando relajación magnética protónica. *Bioquímica.* 2006; 31: 132-9.
8. Shaklai N, Sharma VS, Ranney HM. Interaction of sickle cell hemoglobin with erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 198; 78: 65-8.
9. Platt OS, Falcione JF. Membrane protein interactions in sickle red blood cells: evidence of abnormal protein 3 function. *Blood.* 1995; 86: 1992-8.

10. Liu SC, Yi SJ, Mehta JR, Nichols PE, Ballas SK, Yacono PW, et al. Red cell membrane remodelling in sickle cell anemia. Sequestration of membrane lipids and proteins in Heinz bodies. *J Clin Invest.* 1996; 97: 29-36.
11. Aprelev A, Rotter MA, Etzion Z, Bookchin RM, Briehl RW, Ferrone FA. The effects of erythrocyte membranes on the nucleation of sickle hemoglobin. *Biophys J.* 2005; 88: 2815-22.
12. Fung LW, Litvin SD, Reid TM. Spin-label detection of sickle hemoglobin-membrane interaction at physiological pH. *Biochemistry.* 1983; 22: 864-9.
13. Chen Q, Balazs TC, Nagel RL, Hirsch RE. Human and mouse hemoglobin association with the transgenic mouse erythrocyte membrane. *FEBS Lett.* 2006; 580: 4485-90.
14. Lores MA. Estudio de los procesos de interacción magnética y la movilidad molecular durante la polimerización de la HbS con métodos de resonancia magnética. Tesis Doctoral. Universidad de Oriente. *Santiago de Cuba.* 2006.
15. Steck TL, Kant JA. Preparation of impermeable ghost and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.* 1974; 31: 172-80.
16. Clark MR, Shohet SB. Hybrid erythrocytes for membrane studies in sickle cell disease. *Blood.* 1976; 47: 121-31.
17. Fung LW. Spin-label studies of the lipid and protein components of erythrocyte membranes. A comparison of electron paramagnetic resonance and saturation transfer electron paramagnetic resonance methods. *Biophys J.* 1981; 33: 253-62.
18. Fung LW. Spin-label detection of hemoglobin-membrane interaction at physiological pH. *Biochemistry.* 1981; 20: 7162-6.
19. Fung LW, Ostrowski MS. Spin label electron paramagnetic resonance (EPR) studies of Huntington disease erythrocyte membranes. *Am J Hum Genet.* 1982; 34: 469-80.
20. Cabrales Y. Relajación en muestras de solución de hemoglobina y glóbulos rojos. *Rev Cubana Quím.* 2006; 18: 305-6.
21. Noguchi CT, Torchia DA, Schechter AN. Determination of deoxyhemoglobin S polymer in sickle erythrocytes upon deoxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980; 77: 5487-91.
22. Lores M, Cabal C, Rangel O. Evidencias experimentales de la desoxigenación espontánea de la hemoglobina S, obtenidas empleando resonancia paramagnética electrónica. *Rev Cubana Quím.* 2006; 18: 3-7.
23. Eisinger J, Flores J, Bookchin RM. The cytosol-membrane interface of normal and sickle erythrocytes: effect of hemoglobin deoxygenation and sickling. *J Biol Chem.* 1984; 259: 7169-77.
24. Goodman SR. The irreversibly sickled cell: a perspective. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2004; 50: 53-8.