

## Orientación de partículas intracitoplasmáticas en el hematíe por un campo magnético

J. KOURÍ, W. TORRES, G. STARK Y C. LARIOT

*Dpto. de Estructuras Ultrafinas, C.N.I.C., Habana*

*Recibido en: Dic. 1969*

**ABSTRACT.** The intracytoplasmatic particles seen in red blood cell fracture by the method of freeze-etching have been associated by some authors with hemoglobin molecules. The effect of a magnetic field over these particles was studied and differences in orientation and distribution were found. When the magnetic field acts parallelly to the surface of the specimen, rodlike bundles were seen; but when it acted perpendicularly to the specimen surface, clustres of particles were seen. In this last case each particle showed an internal structure of 33 Å diameter subunits. It is concluded that the observed particles are hemoglobin molecules; the presence of 33 Å diameter subunits and their re-grouping are discussed.

**RESUMEN.** Se hizo un estudio del efecto de un campo magnético sobre las partículas observadas en las fracturas de los glóbulos rojos estudiados por el método de freeze-etching. Se observaron cambios evidentes de distribución y ordenamiento entre los glóbulos rojos sobre los cuales no actuó el campo y aquellos bajo su efecto. Cuando las líneas de fuerza del campo magnético entran perpendicularmente a la superficie de la muestra se observan haces paralelos de filamentos, mientras que cuando actúan perpendicularmente, se observan acúmulos de partículas, las cuales están constituidas por subunidades de 33 Å. Se concluye que las partículas observadas en la fractura de los glóbulos rojos son moléculas de hemoglobina, se discute la presencia de subunidades de 33 Å y su reagrupación en partículas mayores.

### INTRODUCCION

Las partículas intracitoplasmáticas observadas en réplicas de las superficies de fractura de los glóbulos rojos han llamado la atención en los últimos años. Haggis (1961) haciendo un estudio en hematíes humanos las describe y plantea la posibilidad de que éstas sean moléculas de hemoglobina empaquetada sin descartar que puedan ser artefactos.

En estudios posteriores sobre hematíes humanos y de ratón algunos autores (Weinstein y Bullivant, 1967 y Weinstein y Williams, 1967) observan las mismas estructuras y describen una disposición regular en el hematíe de carnero (Weinstein y Merk, 1967) hecho que está en contra de que estas partículas sean artefactos.

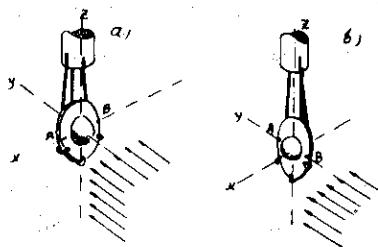
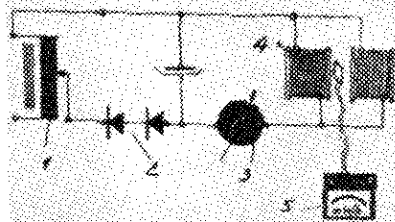
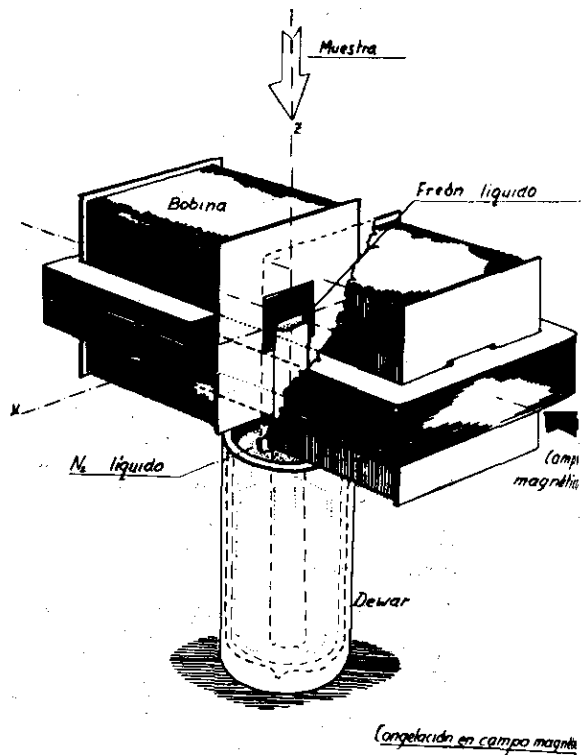
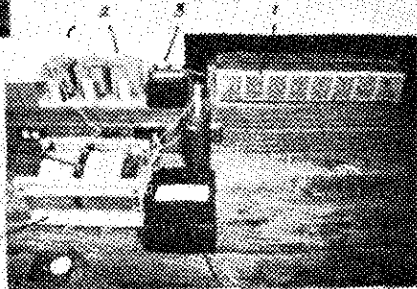
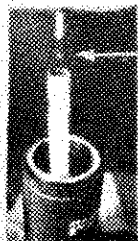


Fig. 1. Magneto empleado en la experiencia. 1. Transformador variable. 2. Rectificador (selenio). 3. Amperímetro. 4. Bobina del magneto. 5. Medidor de flujo. b) Esquema del magneto empleado (los números corresponden a lo descrito anteriormente). c) Dewar; se observa la modificación introducida en el liquificador (se aumentó 87 mm). En la porción superior una placa de cobre (flecha) en su soporte sobre la cual se colocó la muestra.

Fig. 2. *Porción superior*: Esquema de la forma en que se colocó el Dewar para congelar bajo el efecto del campo, cuya dirección sigue el eje  $Y$  del esquema. La muestra se introdujo siguiendo el eje  $Z$ . *Porción inferior*: Posición de la muestra en relación con la dirección de las líneas de fuerza del campo magnético. a) Líneas de fuerza incidiendo perpendicularmente a la superficie de la gota de sangre. b) Líneas de fuerza incidiendo paralelamente a la superficie de la gota de sangre.

Sin embargo no se han realizado intentos para orientar estas partículas en el campo magnético, lo que favorecería a la primera posibilidad.

Este trabajo tiene como objetivo demostrar los cambios que sufren dichas partículas cuando son sometidas a un campo magnético.

### MATERIAL Y METODO

Sangre venosa humana con heparina fue preparada para el método de freeze-etching siguiendo los criterios planteados por nosotros en trabajo anterior (*Kouri y Torres, 1970*) aunque en este caso la sangre fue calentada en baño de maría a 40°C previa a la congelación. La congelación de la muestra y la obtención de la réplica se hicieron siguiendo las técnicas descritas por Moor H. (1963, 1965). Un grupo de muestras fueron congeladas sin haberlas pasado por el campo magnético, tomándose éstas como patrón. El resto fueron pasadas por un campo magnético diseñado y construido en nuestro departamento; presentando las siguientes características:

Material utilizado: Núcleo de hierro de transformador.

Dimensiones: 310 × 210 × 50mm

Entre hierro: 50 × 50 × 15mm.

Vueltas de la bobina: 2 × 10000 (paralelas); 0.8 mm.Cu

Alimentación: 0-240 v.c.d.

Rectificador de Selenio: 2-5 amp.

Filtro: 150 Mf.

Medición del flujo se realizó con un Medidor de flujo magnético con bobina de 60 vueltas; 1 cm<sup>2</sup>; con 2-3 Ohm.

Flujo máximo aproximado: 8000 líneas por cm<sup>2</sup>.

Las muestras se introdujeron en el campo magnético en 2 posiciones:

- a) La superficie de la gota paralela a las líneas de fuerza (Fig. 2a) y
- b) La superficie de la gota perpendicular a las líneas de fuerza (Fig. 2b).

La muestra fue sometida al campo de 7000-8000 Gauss en intervalos cortos (10 veces, cada uno de 3 seg.). La congelación se realizó dentro del campo para lo que se aumentó la altura del liquificador (Freón 12 container) a 87 mm.

Se marcaron las plaquitas portadoras de las muestras que fueron sometidas al campo paralelo a la superficie de la gota con el objeto de orientarnos en las réplicas de la dirección en que actuó el campo, tomando como punto de referencia

la posición de la plaquita en la mesa porta-especimen del equipo Balzers BA-510M con respecto a la cuchilla. En las réplicas se buscaron las marcas de la cuchilla. Durante el período que se pasó la muestra en el campo se mantuvo una temperatura de 30-35°C en esa región.

Las réplicas fueron purificadas en mezcla sulfocrómica, montadas sobre rejillas de 200 mesh sin membrana soporte y observadas en el Microscopio Electrónico Hitachi tipo HUII-A.

Se realizó un conteo de las partículas en las fotos obtenidas, tomándose en cada una tres zonas en forma irrestrictamente aleatoria.

Se controlaron las condiciones ambientales como se refleja en la Tabla I.

TABLA I

1. Temperatura del baño . . . .	40°C
2. Temperatura en el campo	30-35°C
3. Temperatura del cuarto . . .	15-20°C
4. Humedad relativa . . . . .	56-60%

## RESULTADOS

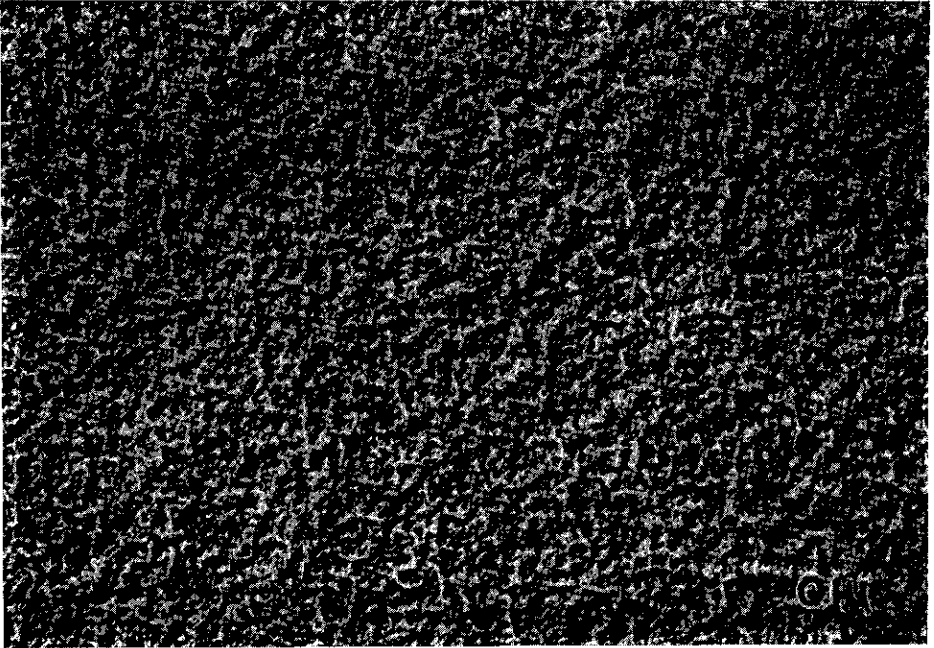
### *Glóbulos rojos sin campo*

Las partículas intracitoplasmáticas se encontraron en forma aislada o en cordones empaquetados, dispuestos irregularmente (Figs. 3 y 4). Comparativamente se encontró menor cantidad de estas estructuras que en los casos que se describirá posteriormente. Hubo gran variación en su conteo cuando se comparó el número de partículas de una célula a otra. El tamaño de éstas se mantuvo dentro del rango que varió entre 70-130Å, siendo difícil distinguir estructura interna. Entre ellas se observó un material granular fino, no preciso.

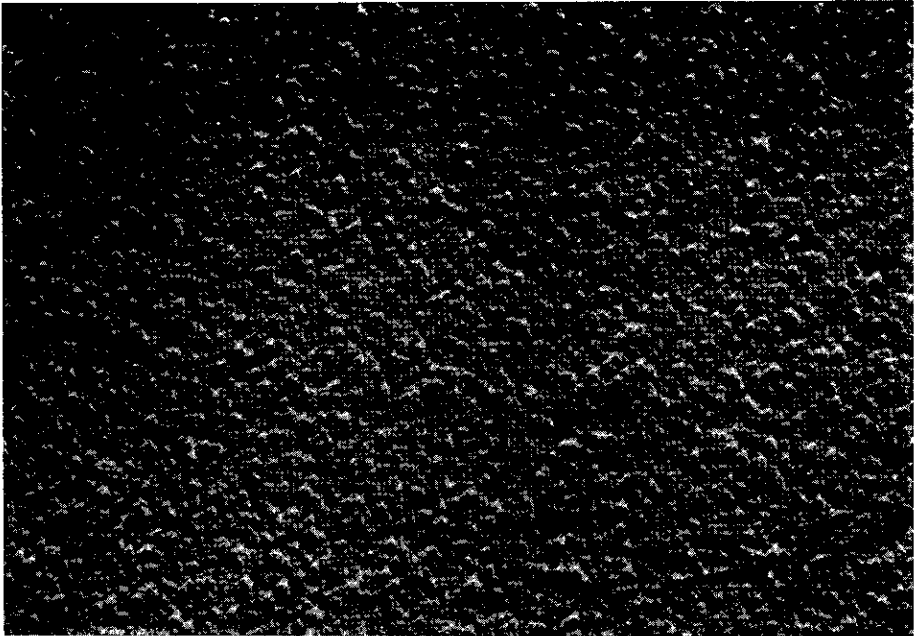
La membrana celular se observó también cargada de partículas tanto por su cara externa como por la interna.

FIG. 3. Estructura interna de un hematíe no sometido a la acción del campo. Se observan cordones dispuestos irregularmente. 100 000 X

FIG. 4. Estructura interna de un hematíe que no ha sido sometido a la acción del campo. Se observan partículas aisladas de 70-130 Å de diámetro y a veces acúmulos de éstas asociadas en forma de cordones dispuestos irregularmente. 150 000 X



3



4

*Glóbulo rojo con campo paralelo a la superficie*

Se observaron escasas partículas aisladas, la mayoría se encontraban formando hileras (Fig. 5) y cordones (Fig. 6) en ambos casos siguiendo la dirección del campo. Se encontraron también algunos hematíes dentro de los cuales la dirección de estos cordones era variable.

Entre los cordones se observó un fondo sin estructura definida.

El número de partículas fue mayor que en la sangre sin campo, aunque menor que el de los glóbulos rojos con campo perpendicular.

Las dimensiones variaron encontrándose dos tipos de partículas unas mayores de 70-130Å (más abundantes) sin estructura interna definida que constituían los cordones, otros menores de 30-50Å, a veces aislados y en ocasiones constituyendo cordones. No hubo evidencia de cambios en las partículas que se encontraron sobre la membrana plasmática del eritrocito.

*Glóbulo rojo con campo perpendicular*

Las partículas en su mayoría se observaron constituyendo acúmulos dejando áreas entre ellos constituídas por un material granuloso fino (Fig. 7). Se encontraron partículas formando cordones perpendiculares a la línea de fuerza del campo. Las partículas son redondeadas u ovals midiendo de 110-180Å y presentaron una estructura interna constituída a su vez por partículas más pequeñas en número variable, cuyo diámetro promedio fue de 33Å (Fig. 9). Se encontraron algunas muestras donde el número de partículas mayores fue menor (Fig. 8) hasta llegando a desaparecer totalmente conteniendo los hematíes solamente partículas pequeñas poco agrupadas (Fig. 10).

No se observaron cambios en las partículas que se encuentran sobre la membrana celular.

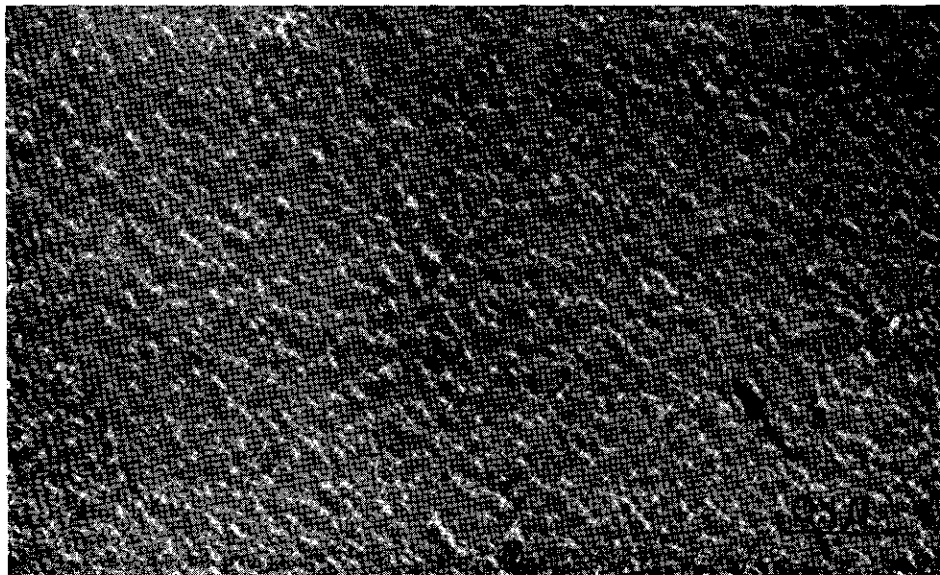
## DISCUSION

Son evidentes las diferencias morfológicas observadas en los tres tipos de preparaciones. Se conoce bien la estructura de la molécula de hemoglobina (*Perutz y cols.*,

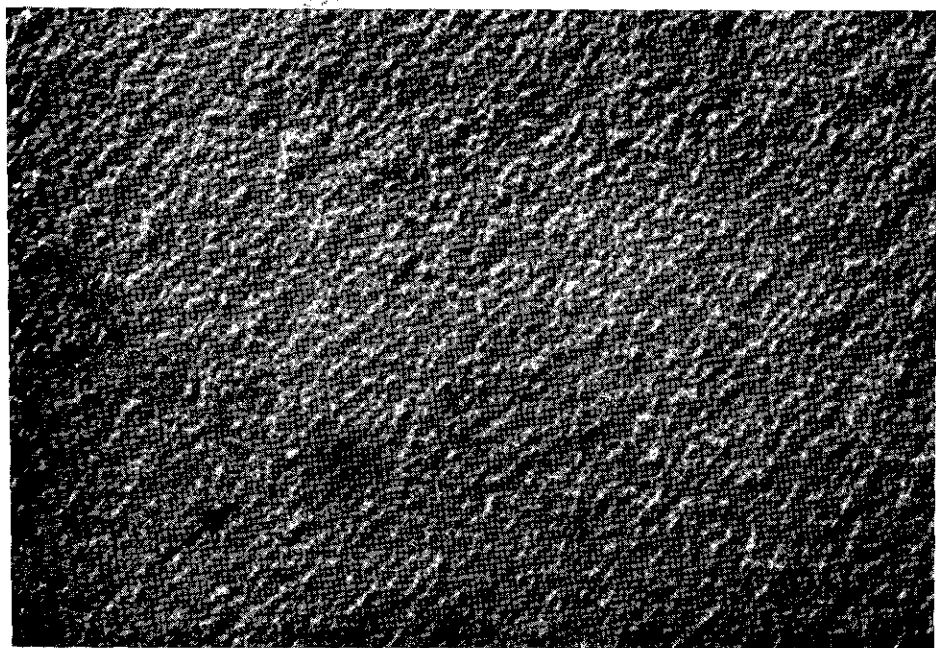
---

FIG. 5. Se observan partículas de 70-130 Å de diámetro, las cuales raras veces se encuentran aisladas; por lo general se encuentran en hileras que siguen la dirección del campo (flecha). 150 000 X

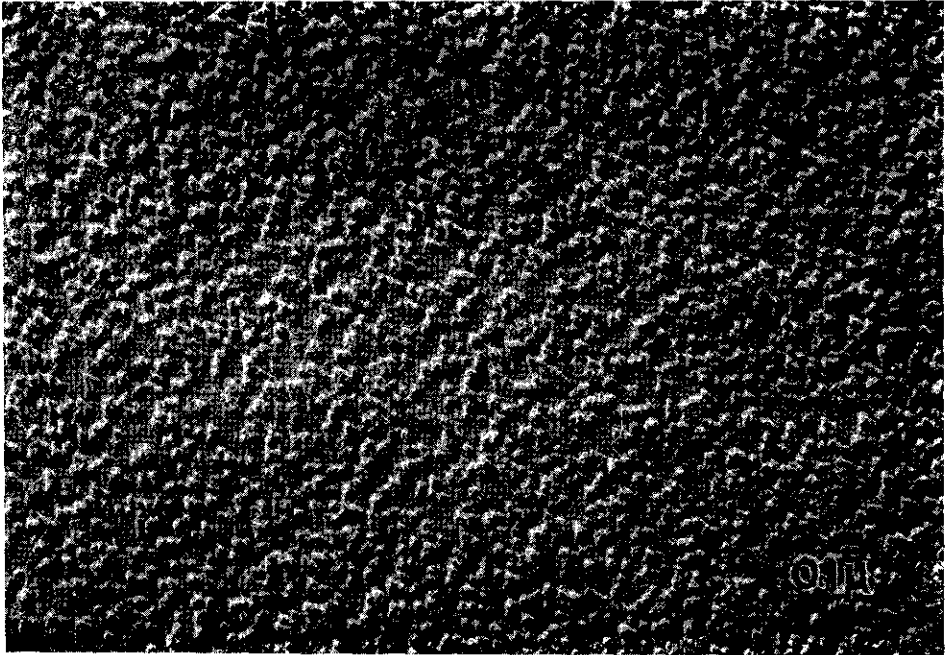
FIG. 6. Se observan cordones cortos formados por partículas que siguen la dirección del campo (flecha). El campo ha incidido paralelamente a la superficie del glóbulo rojo. 150 000 X



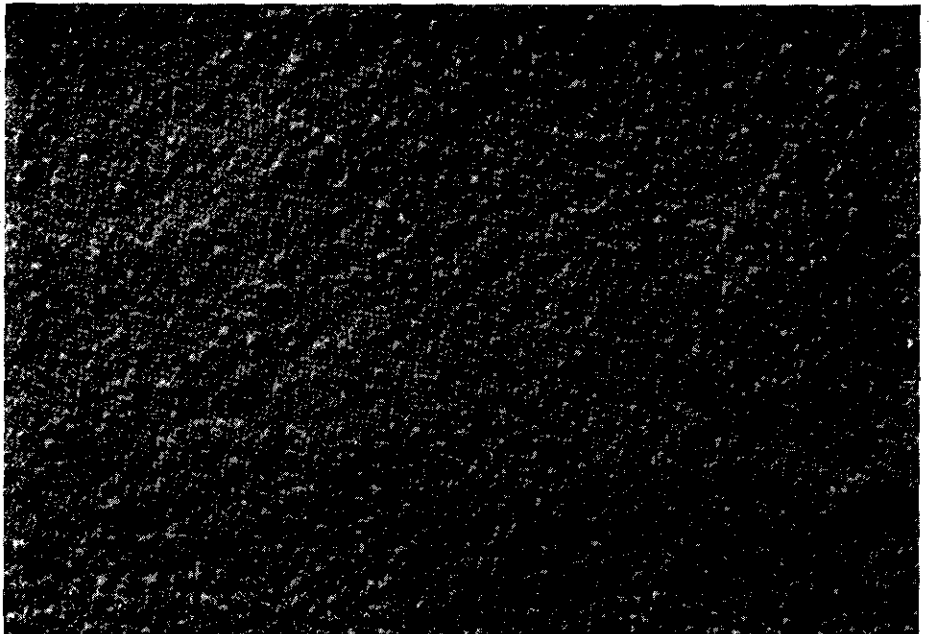
5



6



7



1960) y su comportamiento en un campo magnético. Del análisis de nuestros resultados se puede llegar a la conclusión de que ha habido un ordenamiento en forma de cordones que sigue las líneas de fuerza del campo. Este ordenamiento depende del punto de referencia de observación. Mientras en el caso del campo paralelo a la superficie se observan los cordones longitudinales (Figs. 5 y 6) por estar tomada la réplica en ese sentido, en el caso donde actuó el campo perpendicular a la superficie lo que observamos son cordones "cortados" transversalmente (Figs. 7 y 8) por haberse realizado la réplica en ángulo de  $90^\circ$  con respecto a la dirección del campo. Esta última experiencia nos indica que en ocasiones la orientación de estas partículas se realiza por haces de cordones lo que se refleja en las agrupaciones de las mismas en acúmulos. El hecho de que en el campo paralelo generalmente se observen cordones en grupos muy reducidos (de uno a tres) depende de que durante la fractura hay un grupo de ellos que quedan fuera del plano de fractura expuesto. También es evidente que la orientación de ciertas de estas partículas es paralela al campo que se empleó, cuestión que concuerda con el carácter paramagnético de las moléculas de hemoglobina reducida por la presencia de electrones impareados en los niveles *d* de orbitales en el ión ferroso.

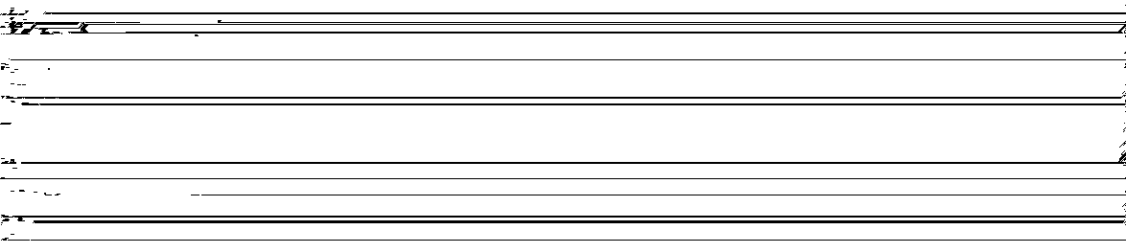
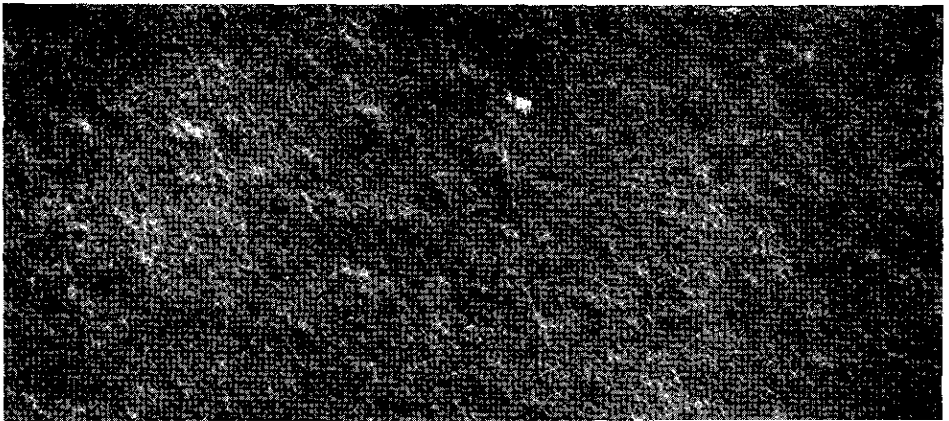
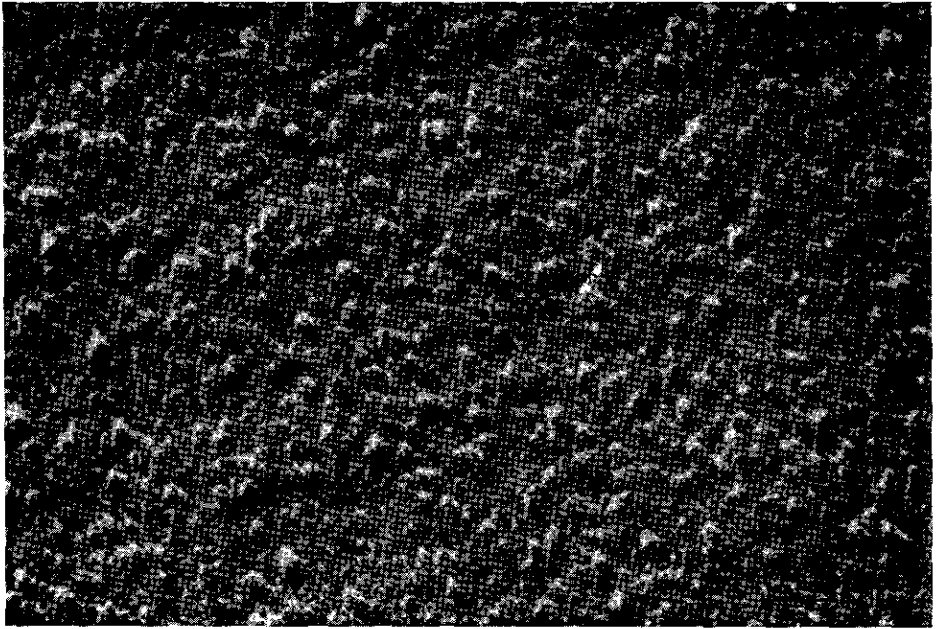
Además de la orientación que sufren las moléculas por el campo, también parece haber un efecto del mismo sobre la estructura de la molécula. Estudios por difracción de rayos X muestran que las dimensiones de la molécula de hemoglobina son de  $64 \times 55 \times 50 \text{ \AA}$  (Perutz y cols., 1960). Con el método de réplica se encuentra un aumento variable de las dimensiones, siendo en moléculas aisladas de  $112.7 + 15 \times 120.9 + 20 \times 56.5 + 6.6$  (Chatterjee y cols., 1961) y dentro del hematíes las partículas reportadas fueron de 100-170  $\text{\AA}$  (Weinstein y Bullivant, 1967 y Weinstein y Merk, 1967).

Las cifras encontradas por nosotros caen dentro del rango de las planteadas por otros autores en estudio con el método de réplica. Sin embargo, en aquellos glóbulos rojos sometidos a la acción del campo magnético se observó que las partículas presentaron diámetros variables y eran más numerosas (más evidente por la acción del campo perpendicular) (Figs. 7, 8, 9 y 10). Estos dos hechos nos hace pensar que ha habido una alteración de la estructura molecular de la hemoglobina.

---

FIG. 7. Estructura interna de un hematíe de la muestra sobre la cual el campo actuó perpendicularmente a su superficie. Se observan partículas que miden 110-180  $\text{\AA}$  formando acúmulos separados por un material granuloso fino. Estas partículas a su vez están constituidas por otros menores (5 a 8) cuyo diámetro es de 30-50  $\text{\AA}$ . 135 000 X

FIG. 8. Estructura interna de un hematíe de una muestra tratada como ha sido descrito en la figura anterior. En este caso también se observan partículas mayores de 110-120  $\text{\AA}$  de diámetro y menores de 30  $\text{\AA}$  de diámetro; sin embargo los acúmulos de las partículas mayores son menos evidentes que en la figura anterior. 135 000 X



La diferencia en número de las partículas de diámetro entre 30-50 Å observadas dependiendo de la posición de la muestra con respecto al campo (más abundante bajo el efecto del campo perpendicular), puede corresponder también a diferencia de los planes de fracturas, como se ha analizado anteriormente.

Por su tamaño puede corresponder a las sub-unidades de la molécula de hemoglobina; sin embargo, llama la atención que sean más que cuatro las partículas pequeñas que forman parte de las mayores. Esto puede hacernos pensar que nuestras imágenes no sean moléculas de Hb con sus cuatro subunidades. La reproducibilidad de los resultados con el mismo tipo de experiencia (campo perpendicular) favorece a que no constituya artefacto de preparación. Estudios posteriores nos ayudarán a dilucidar este problema.

Se puede concluir que hubo evidencias diferenciales en el ordenamiento de las partículas intracitoplasmáticas dependiente de la dirección del campo. Hecho que constituye una prueba bastante concluyente que son moléculas de hemoglobina. Quedando por determinar en estudios posteriores la presencia de las pequeñas partículas (30-50 Å) reagrupadas en mayor o menor grado observadas bajo el efecto del campo perpendicular. Aquellas partículas asociadas a la membrana plasmática, no sufrieron cambios evidentes bajo la acción del campo lo que va en favor de que tengan una naturaleza diferente a la hemoglobina.

## RECONOCIMIENTO

Estamos agradecidos al Dr. Rafael Oliver por su cooperación en el estudio estadístico realizado, así como a los Sres. Jorge Agüero, Alfredo Alfonso y Antonio Pazos por su trabajo técnico y a la Sra. Olga Marcos por la confección de este manuscrito.

## REFERENCIAS

- CHATERJEE S. N., SADHUNKHAND P. Y CHATERJEE J. B. Electron microscope studies on the haemoglobin molecule. *J. Biophys and Biochem. Cytol.*, 10, 113, 1961.
- HAGGIS G. H. Electron microscope replicas from the surface of a fracture through frozen cells. *J. Biophys. and Biochem. Cytol.*, 9, 841, 1961.
- KOURÍ J. Y TORRES W. Aplicación del método de freeze-etching al estudio de la sangre. *Revista Cenic, Ciencias Biológicas*, 2, 59, 1970.

---

FIG. 9. Gran magnificación de la foto anterior, donde se pueden distinguir las partículas pequeñas descritas arriba. 270 000 X

FIG. 10. Fractura de un hematíe de una muestra tratada como ha sido descrito para las figuras 7 y 8. En este caso todo el citoplasma está ocupado por partículas menores. 150 000 X

- MOOR H. Freeze-etching; a specimen preparation technique for electron microscopical investigations of living cells and tissues. Balzer's Report No. 2, 1965.
- MOOR H. y MÜHLENTHALER K. Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.*, 17, 609, 1963.
- PERUTZ M. F., ROSSMAN M. G., CULLIS A. F., MUIRHEAD H., WILL G. y WORTH A.C.T. Structure of hemoglobin. A three-dimensional fourier syntheses at 5.5 Å resolution, obtained by X-Ray analysis. *Nature*, 185, 416, 1960.
- WEINSTEIN R. S. y BULLIVANT S. The application of freeze-cleaving technics to studies on red blood cell fine structure. *Blood*, 29, 780, 1967.
- WEINSTEIN R. S. y WILLIAMS R. A. Freeze-cleaving of red cell membranes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 30, 785, 1967.
- WEINSTEIN R. S. y MERK F. Periodicity in the cytoplasm of freeze-cleaved sheep erythrocytes. *Proceeding of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 125, 38, 1967.