

Aplicaciones Médicas de la Relajación Magnética Nuclear

Dr.C. Manuel Arsenio Lores Guevara

Ediciones UO



Manuel Arsenio Lores Guevara. Nació el 8 de abril de 1969. Se graduó, con honores, como Ingeniero Físico Nuclear en el Instituto Superior de Ciencias y Tecnología Nuclear de Cuba en 1993. En Febrero de 2005 defiende su Doctorado en Ciencias Físicas, siendo su tesis doctoral reconocida entre las 20 mejores tesis de este tipo que se defendieron en Cuba en el 2005. Ha trabajado como Profesor/Investigador en el Centro de Biofísica Médica de la Universidad de Oriente durante 30 años, se dedica al desarrollo de aplicaciones de la Resonancia Magnética. Es Profesor Titular e Investigador Titular; se desempeñó en el Centro de Biofísica Médica como Jefe de la sección de Biofísica Química, Director Científico, Presidente del Consejo Científico y Director General. Ha realizado estancias de investigación en los Laboratorios de Resonancia Paramagnética Electrónica de la Universidad de Concordia en Montreal (Canadá), el Departamento de Biofísica del Instituto de Física de Sao Carlos, Sao Paulo (Brasil) y la Universidad Nacional del Litoral en Argentina. También ha sido Profesor Invitado en el Instituto de Bioingeniería y en el Centro de Resonancia Magnética de Imágenes de la Universidad de New Brunswick en Canadá, así como, en el Hospital Universitario de la Universidad de Ghent y el laboratorio de Resonancia Magnética de la Facultad de Medicina y Farmacia de la Universidad de Mons en Bélgica. Es miembro de las sociedades Cubanas de Física, Hematología y Bioingeniería. Ha recibido premios nacionales de la Comisión Nacional de Grados Científicos de la República de Cuba, el Consejo de Sociedades Científicas de la Salud y la Academia de Ciencias de Cuba. Ha supervisado varias tesis de pregrado, maestría y doctorado y se ha desempeñado como oponente o miembro en los tribunales nacionales de grados científicos en Física, ciencias técnicas, ciencias médicas y ciencias de la salud. Ha sido miembro de los consejos científicos del Centro de Biofísica Médica, el Hospital General “Juan Bruno Zayas Alfonso” y la Universidad de Oriente. Ha participado en más de 40 congresos nacionales e internacionales y tiene publicados 85 artículos científicos (38 de ellos en revistas científicas nacionales e internacionales).

Aplicaciones Médicas de la Relajación Magnética Nuclear

Manuel Arsenio Lores Guevara



Ediciones UO

Edición y corrección: Karen Guadalupe Fernández Muñoz
Composición: Yanet Caridad García Prevel
Diseño de cubierta: Lisandra Couso Martínez
© 978-959-207-731-7, 2023
© Sobre la presente edición: Manuel Arsenio Lores Guevara
Ediciones UO, 2023
ISBN: 978-959-207-731-7
Ediciones UO

Ave. Patricio Lumumba No. 507, e/ Ave. de Las Américas y Calle 1ra, Reparto Jiménez.
Santiago de Cuba, Cuba. CP: 90500
Telf.: +53 22644453

e-mail: jdp.ediciones@uo.edu.cu
edicionesuo@gmail.com

Este texto se publica bajo licencia Creative Commons Atribucion-NoComercial-NoDerivadas (CC-BY-NC-ND 4.0). Se permite la reproducción parcial o total de este libro, su tratamiento informático, su transmisión por cualquier forma o medio (electrónico, mecánico, por fotocopia u otros) siempre que se indique la fuente cuando sea usado en publicaciones o difusión por cualquier medio.

Se prohíbe la reproducción de la cubierta de este libro con fines comerciales sin el consentimiento escrito de los dueños del derecho de autor. Puede ser exhibida por terceros si se declaran los créditos correspondientes.

Índice

Prefacio	8
Prólogo	9
Resonancia Magnética Nuclear	10
Principio general de la Resonancia Magnética Nuclear	11
Un núcleo en presencia de un campo magnético externo y constante (\vec{H}_0)	12
La muestra en presencia de la suma de un campo magnético externo y constante (\vec{H}_0) y un campo magnético externo rotante (\vec{H}_1).	17
La muestra en presencia de la suma de un campo magnético externo y constante (\vec{H}_0), un campo magnético externo rotante (\vec{H}_1) y bajo la influencia de los procesos de relajación magnética nuclear.	20
Relajación Magnética Nuclear	24
Relajación Magnética Nuclear modulada por la rotación	44
Relajación Magnética Nuclear modulada por la rotación en el caso de la asimetría esférica	46
Relajación Magnética Nuclear modulada por la difusión	49
Relajación Magnética Protónica en el agua	52
Relajación Magnética Protónica en disoluciones de proteínas	53
Procedimientos experimentales para determinaciones de Relajación Magnética Nuclear	58
Equipamiento para mediciones de Relajación Magnética Nuclear	59
Procedimientos experimentales para mediciones de Relajación Magnética Nuclear	63
Inhomogeneidades del campo magnético externo constante (\vec{H}_0). Evolución temporal de las distintas fracciones de magnetización	63
Pulsos de radiofrecuencia	64
Método de 90° - τ - 180° para la determinación experimental de T_2	68
Método de Carr y Purcell para la determinación experimental de T_2	72
Método de Carr, Purcell, Meiboom y Gill para la determinación experimental de T_2	74
Método de Carr y Purcell para la determinación experimental del coeficiente de difusión (D)	76
Métodos experimentales para la determinación de T_1	77
Consejos prácticos a tener en cuenta durante el experimento de Relajación Magnética Nuclear	82
Aplicaciones médicas de la Relajación Magnética Protónica en disoluciones acuosas de proteínas, células y tejidos	86
Relajación Magnética Protónica durante la polimerización de la Hemoglobina S	87
Anemia Drepanocítica y polimerización de la Hemoglobina S	87

Relajación Magnética Protónica en disoluciones acuosas de hemoglobina durante la polimerización de la HbS	89
Estudios de Relajación Magnética Protónica en glóbulos rojos de pacientes con <i>AD</i>	96
Evaluación de la viscosidad dinámica absoluta en disoluciones de proteínas empleando Relajación Magnética Protónica	97
Relajación magnética protónica en el estudio del cáncer de mama “In vitro”	104
Referencias bibliográficas	108

Prefacio

La Resonancia Magnética Nuclear fue descrita, por primera vez, por Isidor Rabí en 1938 en un estudio acerca de sales de cloruro de Litio. Este, a su vez, fue influenciado por los experimentos del científico alemán Cornelius Jacobus Gorter quien había trabajado ya en el estudio de la Resonancia Magnética en sales cristalinas. Isidor Rabí recibió en 1944 el Premio Nobel por su descubrimiento. Ocho años después, en 1946, Félix Bloch y Edward Mills Purcell refinan la técnica usada en líquidos y en sólidos, por lo que compartieron el Premio Nobel de Física en 1952.

La nueva técnica experimental se desarrolló en tres líneas fundamentales: la obtención de imágenes, la espectroscopía y la relajación magnética. Las primeras imágenes basadas en Resonancia Magnética fueron obtenidas por Paul C. Lauterbur y Sir Peter Mansfield en 1973 y 1977 respectivamente, por lo cual recibieron el Premio Nobel de Medicina en 2003. Numerosas aplicaciones médicas fueron desarrolladas a partir de ese momento para el diagnóstico de tumores y otras afecciones en diferentes regiones del cuerpo, así como, el estudio de disfunciones cardiovasculares, enfermedades inflamatorias, epilepsia y accidentes vasculares encefálicos. La espectroscopía de Resonancia Magnética es una técnica de diagnóstico poderosa para una variedad de afecciones cerebrales que van desde los tumores y la epilepsia hasta la degeneración relacionada con la edad y los accidentes vasculares encefálicos. Sin embargo, la relajación magnética nuclear no ha tenido, de forma independiente, utilidad médica concreta hasta la actualidad.

Los primeros estudios de relajación magnética nuclear realizados en el Centro de Biofísica Médica de la Universidad de Oriente en Santiago de Cuba permitieron monitorear el proceso molecular que causa la Anemia Drepanocítica y desarrollar métodos para la evaluación del estado clínico y la efectividad de acciones terapéuticas en pacientes con esta enfermedad. Trabajos posteriores posibilitaron utilizar la relajación magnética para evaluar el tiempo de intercambio del agua a través de la membrana del glóbulo rojo en pacientes con Anemia de Hematíes Falciformes. Más recientemente hemos desarrollado un grupo de métodos, basados también en relajación magnética nuclear, para determinar la viscosidad dinámica absoluta del plasma sanguíneo, la solución de hemoglobina intracelular y el suero sanguíneo. Todos estos métodos han demostrado utilidad clínica en enfermedades como la Anemia Drepanocítica y el Mieloma Múltiple y son potencialmente utilizables en enfermedades inflamatorias, proliferativas y otras afecciones de salud. Este libro recoge un análisis pormenorizado de estos métodos y otros desarrollados con igual fin. Incluye también elementos básicos de resonancia magnética nuclear, relajación magnética nuclear y métodos experimentales para determinar los tiempos de relajación magnética nuclear. Pretende resumir el trabajo en este tema realizado en el Centro de Biofísica Médica en sus primeros 30 años y también ser material de consulta para profesionales que trabajen o se interesen en este tema.

Manuel Arsenio Lores Guevara

Prólogo

El Centro de Biofísica Médica ha sido pionero en Cuba en el diseño, construcción y puesta a punto de tecnología de relajación magnética nuclear. De forma paralela ha sido y es líder en nuestro País en el desarrollo de aplicaciones concretas de esta tecnología a la industria, la agricultura y en especial a la medicina. Todo este esfuerzo ha estado respaldado por más de 80 publicaciones científicas, una veintena de premios científicos, la participación con más de 40 trabajos en congresos científicos nacionales e internacionales, la formación posgraduada de una decena de doctores y maestros en ciencias y un impacto notable en la educación de pregrado. Esta línea de trabajo ha sido troncal en el surgimiento, desarrollo y consolidación del Centro de Biofísica Médica.

Este libro se constituye en un resumen adecuado de todo lo realizado en esta línea de trabajo en el campo de la medicina durante los primeros 30 años de la institución. Es un material de consulta útil al abordar estos temas tanto desde el punto de vista teórico como práctico. Incluye conocimientos básicos y aplicados sobre esta temática que no es frecuente encontrar concentrados y sistematizados en idioma español. Será útil en la educación de posgrado y pregrado en diferentes modalidades.

El Ingeniero en Física Nuclear Manuel Arsenio Lores Guevara, autor del texto, ha trabajado en estos temas por 30 años, lo cual incluye su formación posgraduada como Doctor en Ciencias Físicas. Ha publicado más de 80 trabajos científicos, incluyendo 38 artículos en revistas científicas referenciadas y arbitradas y ha merecido varios reconocimientos científicos en el tema a nivel nacional. Se suma a ello, una destacada labor de más de veinte años en la dirección científica y administrativa en el Centro de Biofísica Médica.

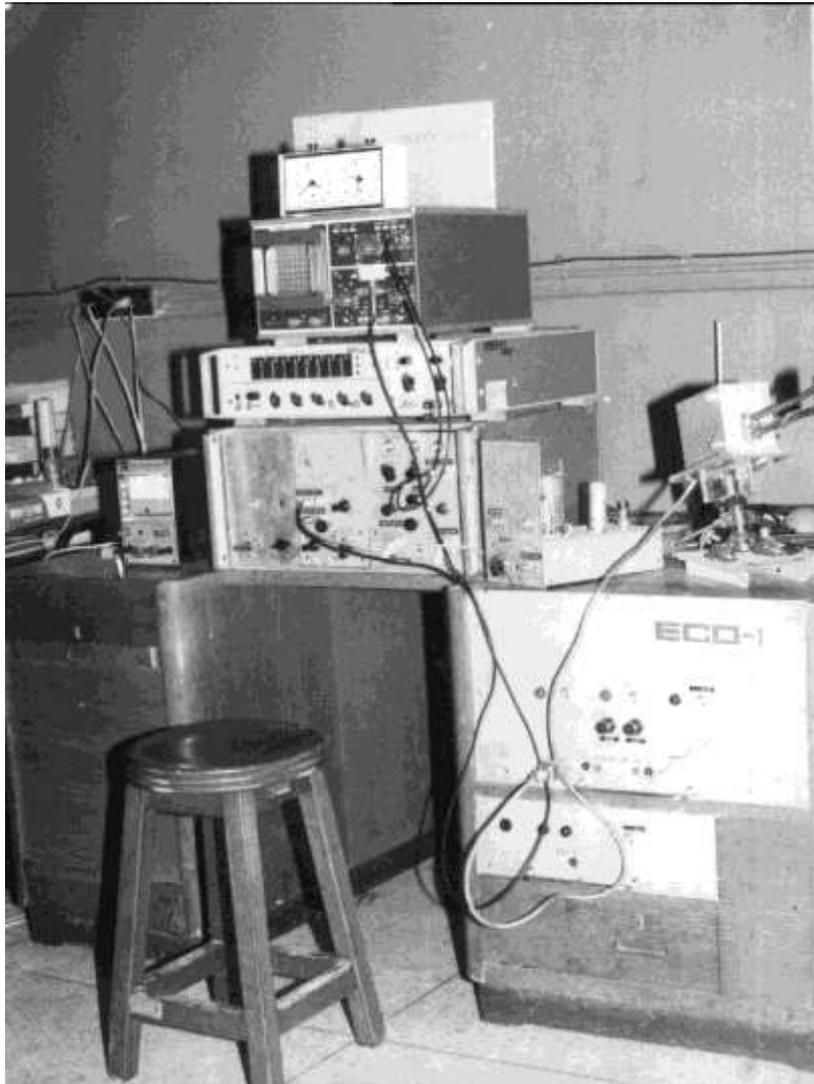
Recomiendo este texto a todo aquel que desee conocer o profundizar en las aplicaciones médicas de la relajación magnética nuclear.

Juan Carlos García Naranjo

Director Científico Centro de Biofísica Médica

Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

Capítulo 1 Resonancia Magnética Nuclear



ECO 1, primer equipo de Relajación Magnética Nuclear ensamblado en Cuba. Departamento de Física. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad de Oriente. Década de los 80, siglo XX.

Principio general de la Resonancia Magnética Nuclear

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es un fenómeno físico que solo ocurre en aquellos núcleos donde el número cuántico de spin (I) es diferente de cero ($I \neq 0$) (Zhi-Pei y Lauterbur, 2000; Abragam, 1961). A este conjunto pertenecen un número limitado de núcleos (ver tabla 1.1); entre ellos: el protón (^1H), deuterio (^2H), sodio 23 (^{23}Na), oxígeno 17 (^{17}O), carbono 13 (^{13}C), helio 3 (^3He), flúor 19 (^{19}F), fósforo 31 (^{31}P) y Xenón 129 (^{129}Xe) (Zhi-Pei y Lauterbur, 2000; Edelman et al, 1996; Evans, 1996; Haacke et al, 1999).

Tabla 1.1. Núcleos de interés para la RMN

Núcleo	Número cuántico de spin (I)	Razón giromagnética (γ) dividida por 2π (MHz/T)
^1H	1/2	42.58
^3He	1/2	32.44
^{13}C	1/2	10.71
^{17}O	5/2	5.77
^{19}F	1/2	40.08
^{23}Na	3/2	11.27
^{31}P	1/2	17.25
^{129}Xe	1/2	11.86

Como resultado del movimiento individual de las partículas que los componen (protones y neutrones), y del movimiento de ellas como sistema de partículas, estos núcleos poseen un movimiento característico, conocido como movimiento de spin (ver figura 1.1), que puede ser cuantificado empleando un vector momento angular de spin (P) como sigue (Zhi-Pei y Lauterbur, 2000; Abragam, 1961):

$$\vec{P} = \frac{h}{2\pi} \vec{I}$$

$$|\vec{P}| = \frac{h}{2\pi} \sqrt{I(I+1)}$$

(1.1)

Donde h es la constante de Planck e $I = I_x i + I_y j + I_z k$ es el operador de spin. Considerando que los núcleos son partículas cargadas, el movimiento de spin genera a su alrededor un campo magnético que puede ser cuantificado por el vector momento magnético (μ) de la siguiente forma (Zhi-Pei y Lauterbur, 2000; Evans, 1996; Solomon, 1955):

$$\vec{\mu} = \gamma \frac{h}{2\pi} \vec{I}$$

$$|\vec{\mu}| = \gamma |\vec{P}|$$

(1.2)

Aquí γ es la razón giromagnética, constante propia de cada núcleo (ver tabla 1.1), precisamente definida como la razón entre μ y P (Solomon, 1955).

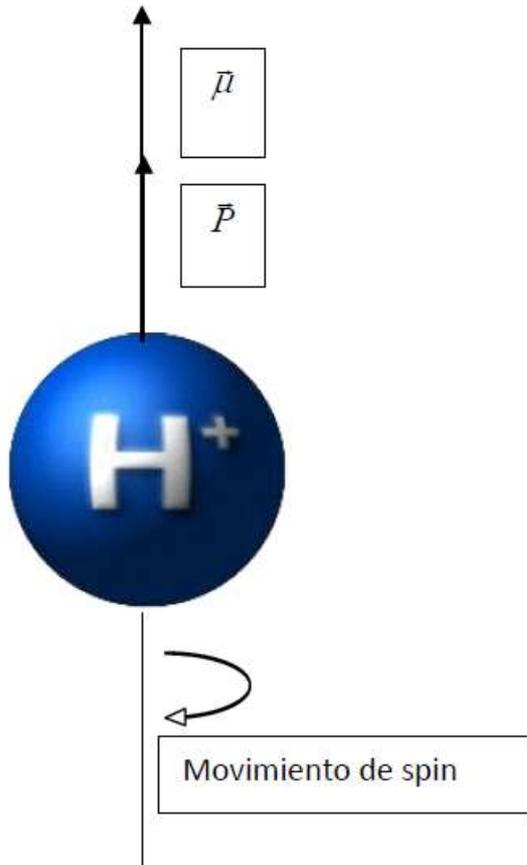


Figura 1.1. Movimiento de spin de los núcleos con $I \neq 0$

Leyenda: El núcleo gira alrededor de un eje imaginario que pasa por su centro. Los vectores P y μ son colineales y $\mu > P$ (se representa el caso en que $\gamma > 0$)

Un núcleo en presencia de un campo magnético externo y constante (H_0)

Cuando introducimos un núcleo con $I \neq 0$, momento angular P y momento magnético μ en un campo magnético H ; μ experimenta un torque ($\mu \times H$) que es igual a la variación temporal del momento angular (dP/dt) de acuerdo a (Abragam, 1961):

$$\begin{aligned}
\frac{d\vec{P}}{dt} &= \vec{\mu} \times \vec{H} \\
\frac{1}{\gamma} \frac{d\vec{\mu}}{dt} &= \vec{\mu} \times \vec{H} \\
\frac{d\vec{\mu}}{dt} &= \gamma \vec{\mu} \times \vec{H}
\end{aligned}
\tag{1.3}$$

Básicamente, según la ecuación 1.3, el efecto de H sobre μ es provocar que su variación temporal sea un vector localizado en un plano perpendicular al plano donde se encuentran μ y H .

Con el objetivo de caracterizar la evolución temporal de μ se requiere cambiar el sistema de referencia (Abragam, 1961). En un sistema de coordenadas (X' , Y' , $Z'=Z$) que rota con velocidad angular ω con respecto al sistema de coordenadas del laboratorio (X , Y , Z) (Abragam, 1961):

$$\left(\frac{d\vec{\mu}}{dt} \right)_{X'Y'Z'} = \gamma \vec{\mu} \times \left(\vec{H} + \frac{\vec{\omega}}{\gamma} \right)
\tag{1.4}$$

Es decir, en el sistema de coordenadas rotativo (X' , Y' , $Z'=Z$) μ recibe un torque proporcionado por un campo magnético efectivo $H_{ef}=H+\omega/\gamma$ que es la suma de H y un campo magnético ficticio $H_f=+(\omega/\gamma)$ (Abragam, 1961). La variación temporal de μ será un vector localizado en un plano perpendicular al plano en el que se encuentran μ y H_{ef} .

Si consideramos $H=H_0$, donde H_0 es un campo magnético externo y constante cuya dirección tomaremos a lo largo del eje Z del sistema de coordenadas del laboratorio: $H_0=H_0k$, entonces $H_{ef}=H_0+\omega/\gamma$ (figura 1.2 A). Si el sistema de coordenadas rotativo (X' , Y' , Z') rota con una velocidad angular $\omega=-\gamma H_0$, entonces $H_{ef}=0$ (figura 1.2 B), $(d\mu/dt)_{X'Y'Z'}=0$ y μ será un vector que estará fijo en dicho sistema de coordenadas (figura 1.2 C). En el sistema de coordenadas del laboratorio, μ precesará (figura 1.2 D) con una velocidad angular cuyo módulo estará dado por:

$$\omega_0 = -\gamma H_0
\tag{1.5}$$

Donde ω_0 es conocida como la frecuencia de Larmor en el campo H_0 ; γ puede ser positiva o negativa, si $\gamma > 0$ la precesión se realiza en el mismo sentido de las manecillas del reloj y si $\gamma < 0$ en sentido contrario (Abragam, 1961).

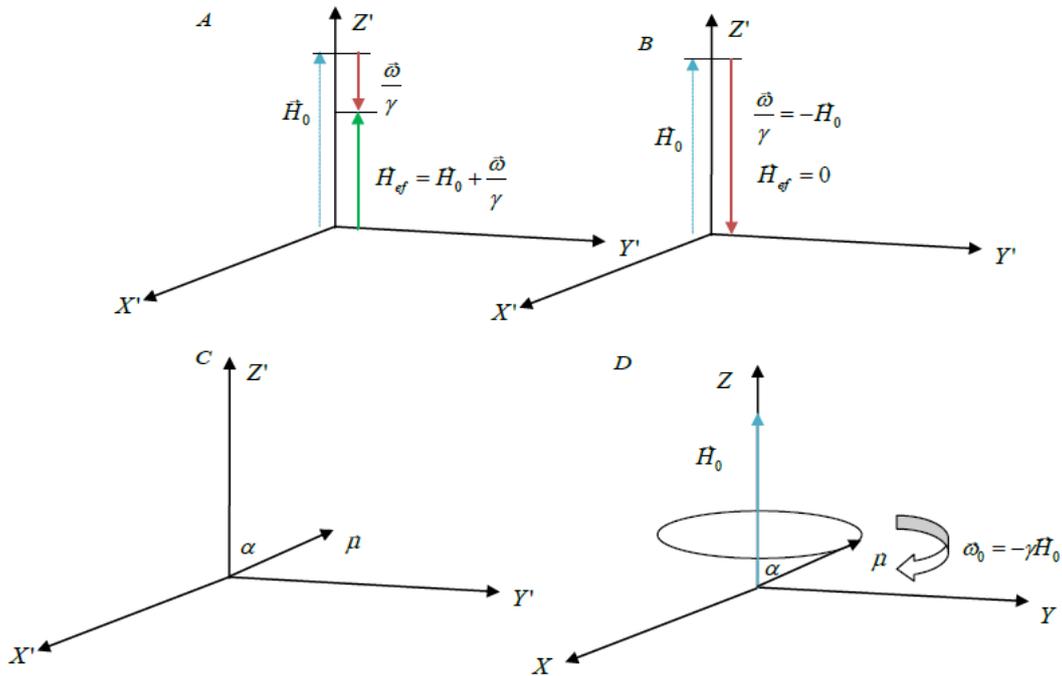


Figura 1.2. Evolución temporal de μ en presencia de $H_0 = H_0 k$

Leyenda: A, campo magnético efectivo ($H_{ef} = H_0 + \omega/\gamma$) en un sistema de coordenadas X', Y', Z' que rota con velocidad angular ω con respecto al sistema de coordenadas del laboratorio X, Y, Z . B, campo magnético efectivo anulado ($H_{ef} = 0$) en un sistema de coordenadas X', Y', Z' que rota con velocidad angular $\omega = -\gamma H_0$ con respecto al sistema de coordenadas del laboratorio X, Y, Z . C, μ se mantiene fijo, formando un ángulo α con Z' , en un sistema de coordenadas X', Y', Z' que rota con velocidad angular $\omega = -\gamma H_0$ con respecto al sistema de coordenadas del laboratorio X, Y, Z . D, en un sistema de coordenadas X, Y, Z fijo en el laboratorio, μ precesará con respecto a H_0 con $\omega_0 = -\gamma H_0$ formando un ángulo α con la dirección de H_0 . En la figura se ha considerado que $\gamma > 0$, por tanto, las rotaciones se realizan en el sentido de las manecillas del reloj

El efecto de H_0 sobre un núcleo caracterizado por los operadores de spin (I), momento angular ($\hbar/2\pi I$) y momento magnético ($\gamma\hbar/2\pi I$) puede ser descrito empleando la función de Hamilton (H^a) (Haacke et al, 1999; Bloumbergen *et al*, 1948):

$$H^a = -\gamma\hbar\vec{I} \cdot \vec{H}_0 = -\gamma\hbar I_z \cdot H_0 \quad (1.6)$$

Donde $\hbar = h/2\pi$. Si tenemos en cuenta que $I_z = m$ puede tomar solo $2I+1$ valores ($+I \geq m \geq -I$); los valores propios de la función de Hamilton, que tienen la forma $m\gamma\hbar H_0$, también estarán cuantizados con el mismo número ($2I+1$). Esto significa que, bajo la acción de H_0 , μ puede orientarse en $2I+1$ direcciones con respecto a este campo, las cuales aparecen representadas en la figura 1.2 por el ángulo α (Abragam, 1961; Solomon, 1955). Es lo mismo decir que el núcleo de momento magnético μ puede existir, en presencia de H_0 , solo en $2I+1$ estados energéticos, con una energía $E_m = -m\gamma\hbar H_0$ en cada

uno de ellos y una separación entre los estados energéticos consecutivos de $\gamma\hbar H_0$. Esto se conoce como desdoblamiento energético de Zeeman (ver figura 1.3 para $I=1/2$).

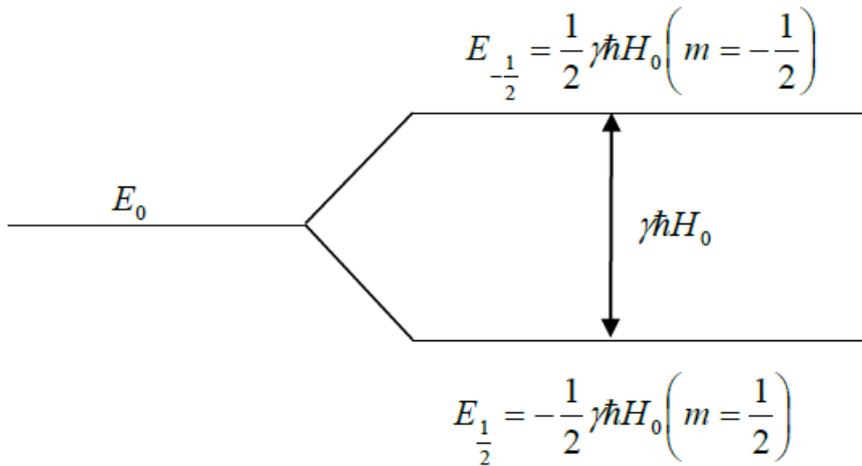


Figura 1.3. Desdoblamiento energético de Zeeman para el caso de $I=1/2$

En una muestra donde tenemos N núcleos con $I \neq 0$, bajo la acción de H_0 , como resultado de la orientación de sus momentos magnéticos con respecto a H_0 en $2I+1$ direcciones, aparecerá una magnetización nuclear macroscópica (M) dada por (Abragam, 1961; Solomon, 1955):

$$\vec{M} = \sum_{i=1}^N \mu_i \quad (1.7)$$

Si se considera que el momento angular resultante (ΣP_i) y M cumplen lo establecido en la ecuación 1.2 y en la primera ecuación del sistema de ecuaciones 1.3 (Solomon, 1955), entonces la evolución temporal de M en el sistema de coordenadas del laboratorio estará dada por:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma(\vec{M} \times H_0) \quad (1.8)$$

De acuerdo a la ecuación 1.8, en presencia de H_0 , la evolución temporal de M en el sistema de coordenadas X, Y, Z sigue el mismo comportamiento descrito previamente para μ en la ecuación 1.3 y la figura 1.2 D. La solución de la ecuación 1.8 estará dada por (Abragam, 1961):

$$\begin{aligned} M_z(t) &= M_z(0) \\ M_+(t) &= M_+(0)e^{i\omega_0 t} \\ M_+ &= M_x + iM_y \end{aligned} \quad (1.9)$$

La ecuación 1.9 significa que bajo el efecto de H_0 se crea una M que tiene una componente constante en el eje Z del sistema de coordenadas del laboratorio y una componente que rota en el plano transversal a este (X, Y) con una frecuencia angular ω_0 . Cuando ha transcurrido suficiente tiempo desde la aplicación de H_0 , y se alcanza el estado de equilibrio termodinámico (figura 1.4B), M puede ser descrita como (Abragam, 1961; Solomon, 1955):

$$\begin{aligned}\bar{M}_0 &= \frac{N\gamma^2\hbar^2 I(I+1)}{3kT} \bar{H}_0 \\ \chi_0 &= \frac{N\gamma^2\hbar^2 I(I+1)}{3kT} \\ \bar{M}_0 &= \chi_0 \bar{H}_0\end{aligned}\quad (1.10)$$

Donde χ_0 es la susceptibilidad magnética de la muestra, k la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta.

Si introducimos el sistema de coordenadas rotativo (X', Y', Z'), de forma similar a lo obtenido para μ en la ecuación 1.4 y la figura 1.2 C, la evolución temporal de M estará dada por:

$$\left(\frac{d\bar{M}}{dt}\right)_{X'Y'Z'} = \gamma\bar{M} \times \left(\bar{H}_0 + \frac{\bar{\omega}}{\gamma}\right)\quad (1.11)$$

En la ecuación 1.11, si $\omega = -\gamma H_0$ entonces M estará fija en $X'Y'Z'$ (figura 1.4A).

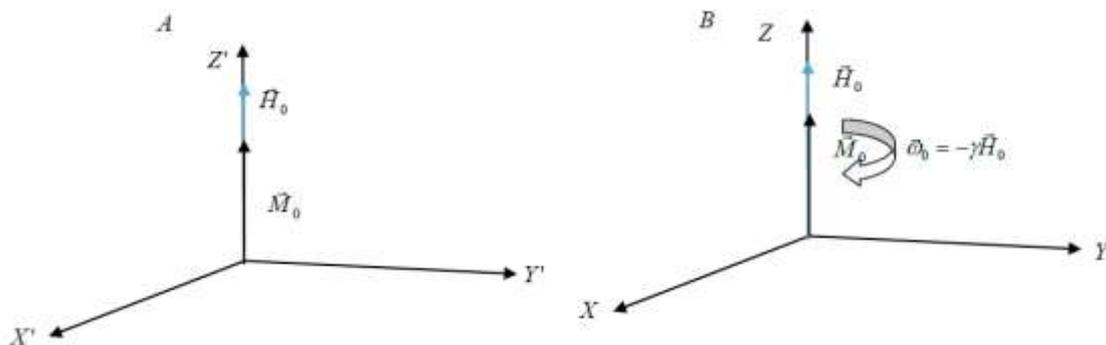


Figura 1.4. Evolución temporal de M en presencia de $H_0 = H_0 k$

Leyenda: A, en un sistema de coordenadas X', Y', Z' que rota con velocidad angular $\omega = -\gamma H_0$ con respecto al sistema de coordenadas de laboratorio X, Y, Z , M_0 se mantiene fija y es colinial con Z' . B, en el sistema de coordenadas X, Y, Z fijo en el laboratorio, M_0 precesará con respecto a H_0 con $\omega_0 = -\gamma H_0$ y es colinial con la dirección de H_0 . En la figura se ha considerado que $\gamma > 0$, por tanto, las rotaciones se realizan en el sentido de las manecillas del reloj

En resumen, el efecto de un campo magnético H_0 sobre una muestra que contiene N núcleos con número cuántico de Spin I distinto de cero será:

-Aplicar a cada μ un torque $\mu \times H_0$ hasta colocarlo en una de las $2I+1$ direcciones posibles con respecto a H_0 .

-Desdoblar el nivel energético base al cual pertenece el núcleo en $2I+1$ subniveles, con una separación entre los subestados energéticos consecutivos de $\gamma\hbar H_0$ y una energía $E_m = -m\gamma\hbar H_0$ ($+I \geq m \geq -I$) en cada uno de ellos. Esto se conoce como desdoblamiento energético de Zeeman.

-Provocar la aparición de una magnetización nuclear macroscópica M que, al cabo de suficiente tiempo, alcanza su estado de equilibrio termodinámico (M_0). Esta magnetización macroscópica se mantiene fija en el sistema de coordenadas rotativo y precesa, en el sistema de coordenadas del laboratorio, alrededor de H_0 con una frecuencia angular $\omega_0 = -\gamma H_0$.

La muestra en presencia de la suma de un campo magnético externo y constante (H_0) y un campo magnético externo rotante (H_1)

Cuando introducimos N núcleos con $I \neq 0$, momento angular P y momento magnético μ en un campo magnético resultante de la suma de $H_0 = -\omega_0/\gamma k$ y un campo magnético H_1 perpendicular a H_0 y rotando a su alrededor con una velocidad angular ω , entonces, en el sistema de coordenadas rotativo, M precesará alrededor de un campo magnético efectivo (H_{ef}) con una frecuencia angular $\omega_{ef} = -\gamma H_{ef}$ (Figura 1.5) tal que (Abragam, 1961):

$$\begin{aligned} \left(\frac{d\vec{M}}{dt} \right)_{X'Y'Z'} &= \gamma \vec{M} \times \vec{H}_{ef} \\ \vec{H}_{ef} &= \left(H_0 + \frac{\omega}{\gamma} \right) \vec{k} + H_1 \vec{i} \\ |\vec{H}_{ef}| &= \sqrt{\left(H_0 + \frac{\omega}{\gamma} \right)^2 + (H_1)^2} \\ |\vec{H}_{ef}| &= -\frac{1}{\gamma} \sqrt{[(\omega_0 - \omega)^2 + (\omega_1)^2]} \end{aligned} \tag{1.12}$$

Aquí H_1 ha sido tomado a lo largo de X' siendo i el vector unidad en este eje y $\omega_1 = -\gamma H_1$. Cuando $\omega = -\gamma H_0$, M precesará alrededor de H_1 con $\omega_1 = -\gamma H_1$. H_{ef} formará con la dirección de H_0 un ángulo (θ), cuyos seno y coseno están descritos por la ecuación 1.13, y provocará que M se mueva desde una posición inicial paralela a H_0 en $t=0$ (considerando que ha pasado el tiempo suficiente para que se establezca el equilibrio termodinámico) hasta una posición en $t=t$ donde forma con H_0 un ángulo (β) cuyos seno y coseno están descritos por la ecuación 1.14 (Abragam, 1961).

$$\begin{aligned} \text{sen}\theta &= \frac{H_1}{\left(H_0 + \frac{\omega}{\gamma}\right)^2 + H_1^2} \\ \cos\theta &= \frac{H_0 + \frac{\omega}{\gamma}}{\left(H_0 + \frac{\omega}{\gamma}\right)^2 + H_1^2} \end{aligned} \quad (1.13)$$

$$\begin{aligned} \cos\beta &= \cos^2\theta + \text{sen}^2\theta \cos(\omega_e t) \\ \text{sen}\beta &= \sqrt{1 - \left[\cos^2\theta + \text{sen}^2\theta \cos(\omega_e t)\right]^2} \end{aligned} \quad (1.14)$$

En el sistema de coordenadas X', Y', Z' la evolución temporal de M estará dada por (Solomon, 1955):

$$\begin{aligned} M_{X'Y'} &= M_0 \text{sen}\beta = M_0 \left[1 - \left[\frac{\delta^2}{1+\delta^2} + \frac{1}{1+\delta^2} \cos(\omega_e t) \right]^2 \right] \\ M_{Z'} &= M_0 \cos\beta = M_0 \left[\frac{\delta^2}{1+\delta^2} + \frac{1}{1+\delta^2} \cos(\omega_e t) \right] \\ \delta &= \frac{H_0 + \frac{\omega}{\gamma}}{H_1} \end{aligned} \quad (1.15)$$

De donde es claro que el efecto de H_{ef} es disminuir la componente de la magnetización en el eje Z' y crear una componente en el plano X'Y', ambas reflejando la rotación alrededor de H_{ef} con $\omega_{ef} = -\gamma H_{ef}$.

De acuerdo a la ecuación 1.15, la aplicación del campo magnético H_1 solo es capaz de provocar una reorientación apreciable de M si su frecuencia de rotación (ω) está en la vecindad de ω_0 y la reorientación es máxima si $\omega = \omega_0$ ($\delta = 0$), es decir, esto es un fenómeno de resonancia (Abragam, 1961).

Cuando $\omega = \omega_0$ ($\delta = 0$), las componentes de la magnetización en X', Y', Z' reflejarán la rotación alrededor de H_1 con $\omega_1 = -\gamma H_1$ según (Abragam, 1961):

$$\begin{aligned} M_{X'Y'} &= M_0 \text{sen}(\omega_1 t) \\ M_{Z'} &= M_0 \cos(\omega_1 t) \end{aligned} \quad (1.16)$$

La ecuación 1.15 fue obtenida bajo el supuesto de que ω , H_0 y δ son constantes, sin embargo, es igualmente válida si estas magnitudes varían adiabáticamente, es decir, lo suficientemente lento tal que $d\delta/dt \ll \gamma H_1$ (Solomon, 1955). Esto puede lograrse, para

un valor constante de H_1 , de dos formas: manteniendo constante H_0 y variando lentamente ω o manteniendo constante ω y variando lentamente H_0 .

En el sistema de coordenadas del laboratorio, a la rotación observada en la ecuación 1.16 se suma la rotación del sistema de coordenadas X', Y', Z' con respecto al X, Y, Z para obtener (Abragam, 1961):

$$\begin{aligned} M_{X'} &= M_0 \operatorname{sen}(\omega_1 t) e^{i\omega_0 t} \\ M_{Z'} &= M_0 \cos(\omega_1 t) \end{aligned} \quad (1.17)$$

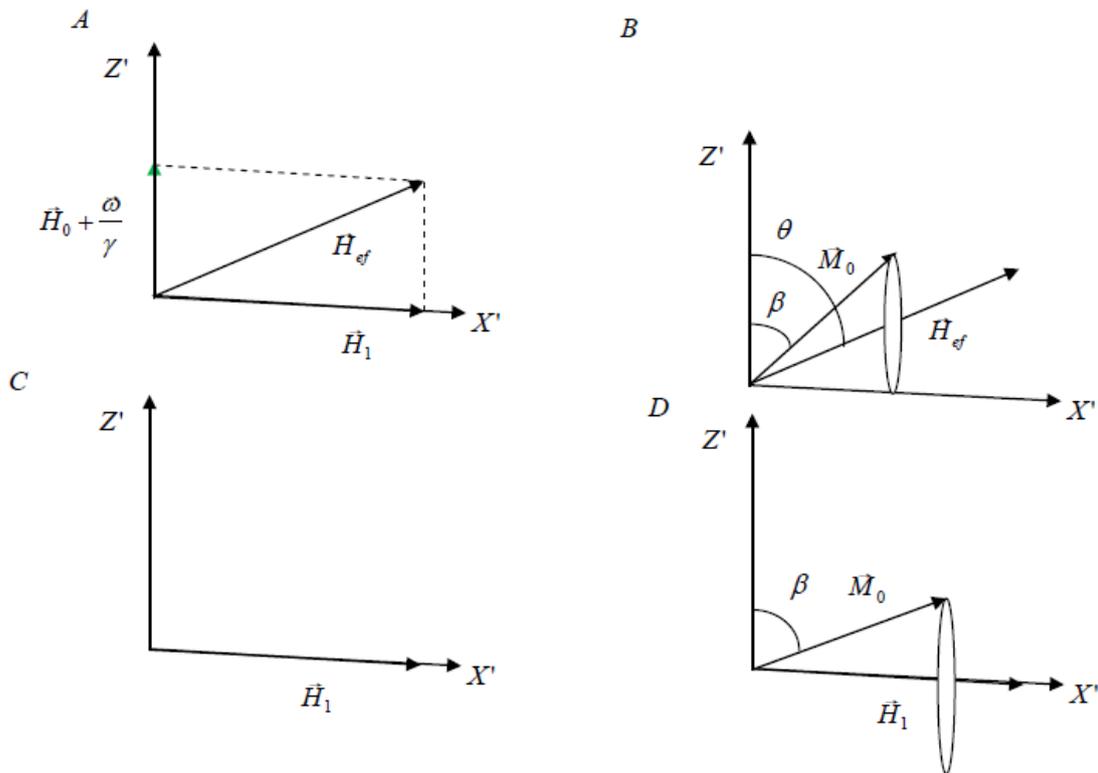


Figura 1.5. Efecto, en el sistema de coordenadas X', Y', Z' , de la aplicación de un campo magnético resultante de la suma de H_0 y H_1 a una muestra que contiene N núcleos con $I \neq 0$, momento angular P y momento magnético μ .
 Leyenda: A, aparecerá un campo H_{ef} resultante de la suma de H_0 , H_1 y un campo magnético ficticio ω/γ . B, M_0 precesará alrededor de H_{ef} con una frecuencia de Larmor $\omega_{ef} = -\gamma H_{ef}$. H_{ef} y M_0 formarán con H_0 los ángulos θ y β respectivamente, cuyos senos y cosenos están descritos por las ecuaciones 1.13 y 1.14. C, cuando $\omega = \omega_0$, $H_{ef} = H_1$. D, cuando $\omega = \omega_0$, M_0 precesará alrededor de H_1 con una frecuencia angular $\omega_1 = -\gamma H_1$. Aquí se ha considerado que, previo a la aplicación de H_1 , ha transcurrido suficiente tiempo para que la magnetización alcance su estado de equilibrio termodinámico ($M = M_0$)

En resumen; la aplicación a la muestra, además de $H_0 = -(\omega_0/\gamma)k$, de un campo magnético H_1 perpendicular a H_0 y rotando a su alrededor con una velocidad angular ω provoca:

-Que M pase de encontrarse en su estado de equilibrio termodinámico (paralela a H_0) a formar un ángulo β con H_0 . Así M pasa de tener solo una componente en la dirección de H_0 a tener, además, una componente en el plano transversal.

-Que, en el sistema X', Y', Z' , M rote con velocidad angular ω_{ef} alrededor de un campo magnético efectivo (H_{ef}) resultante de la suma de H_0, H_1 y un campo ficticio ω/γ .

-Que, en el sistema del laboratorio, M esté afectada por la rotación descrita en el punto anterior y por la rotación del sistema X', Y', Z' con respecto al sistema X, Y, Z con frecuencia ω_0 .

Cuando $\omega=\omega_0$, esto significa que hemos hecho coincidir la frecuencia de rotación de H_1 con la frecuencia de precesión de M_0 alrededor de H_0 en el sistema X, Y, Z . Esto provocará que M_0 rote alrededor de H_1 en X', Y', Z' y que su componente en el plano transversal, tanto en X, Y, Z como en X', Y', Z' , sea máxima (ecuaciones 1.16 y 1.17). Desde el punto de vista mecánico cuántico esta coincidencia ($\omega=\omega_0$) se logra cuando entregamos a la muestra una energía exactamente igual a la diferencia entre los niveles energéticos consecutivos del desdoblamiento de Zeeman ($\gamma h H_0$) y se llama Resonancia Magnética Nuclear.

Sin embargo, si observamos las ecuaciones 1.9, 1.15, 1.16 y 1.17 las componentes longitudinales (M_Z) y transversales (M_{XY}) de M evolucionan temporalmente con un comportamiento oscilatorio que no se corresponde con la recuperación de la primera y la disminución de la segunda observada en la práctica (Abragam, 1961). Para entender esto vamos a incorporar a nuestro análisis los procesos de relajación magnética Nuclear.

La muestra en presencia de la suma de un campo magnético externo y constante (H_0), un campo magnético externo rotante (H_1) y bajo la influencia de los procesos de relajación magnética nuclear

La interacción de los núcleos en estudio con su entorno, en particular las interacciones con los momentos magnéticos que se encuentran a su alrededor, garantiza en primer lugar el establecimiento de la magnetización en su estado de equilibrio termodinámico (ecuación 1.10) con la anulación de las componentes transversales de la ecuación 1.9 (Abragam, 1961). Adicionalmente provoca la recuperación de las componentes longitudinales y la destrucción de las transversales en las ecuaciones 1.15-1.17. En el capítulo 2 analizaremos en profundidad estos procesos, ahora nos limitaremos a llamar relajación transversal a aquellos procesos que provocan la destrucción de las componentes transversales de la magnetización y caracterizaremos su eficiencia utilizando una constante de tiempo llamada tiempo de relajación transversal (T_2). De la misma forma llamaremos relajación longitudinal a los procesos que garantizan la recuperación de la componente longitudinal de la magnetización y caracterizaremos su eficiencia utilizando una constante de tiempo llamada tiempo de relajación longitudinal (T_1) (Solomon, 1955). Considerando estos procesos Félix Bloch modificó las ecuaciones que describen la evolución temporal de la magnetización (1.8, 1.11 y 1.12)

y, en el caso del sistema del laboratorio, propuso el siguiente sistema fenomenológico (Bloch, 1946; Solomon, 1955):

$$\begin{aligned}
 \frac{d\vec{M}}{dt} &= \gamma \vec{M} \times \vec{H} - \frac{(M_x \vec{i} + M_y \vec{j})}{T_2} - \frac{(M_z - M_0)}{T_1} \vec{k} \\
 \frac{dM_x}{dt} &= \gamma (M_y H_z - M_z H_y) - \frac{M_x}{T_2} \\
 \frac{dM_y}{dt} &= \gamma (M_z H_x - M_x H_z) - \frac{M_y}{T_2} \\
 \frac{dM_z}{dt} &= \gamma (M_x H_y - M_y H_x) - \frac{(M_z - M_0)}{T_1}
 \end{aligned}
 \tag{1.18}$$

En la ecuación 1.18 se ha considerado que la relajación transversal puede ser provocada no solo por las interacciones con otros momentos magnéticos nucleares, sino también por las inhomogeneidades de campo y la presencia de elementos paramagnéticos (Solomon, 1955). Por otro lado, se ha considerado el medio isotrópico para justificar la misma constante de tiempo (T_2) en las ecuaciones para las 2 componentes transversales de la magnetización. El campo magnético resultante sobre la muestra puede describirse de la siguiente forma (Solomon, 1955):

$$\begin{aligned}
 H_x &= H_1 \cos \omega t \\
 H_y &= \pm H_1 \text{sen} \omega t \\
 H_z &= H_0 \\
 H_1 &= -\frac{\omega_1}{\gamma}
 \end{aligned}
 \tag{1.19}$$

Donde el signo de H_y depende de si γ es positiva o negativa (Abragam, 1961; Solomon, 1955). Es decir, la suma de un campo magnético constante H_0 y un campo magnético variable H_1 , perpendicular a H_0 , que tiene amplitud $H_1 = \omega_1/\gamma$ y rota alrededor de H_0 con una frecuencia ω . Este campo es usualmente una componente de un campo magnético linealmente polarizado aplicado a lo largo del eje X del sistema X, Y, Z ($H_x = 2H_1 \cos \omega t$) que rota en el mismo sentido de las manecillas del reloj ($+\omega$); la componente que rota en sentido contrario a las manecillas del reloj ($-\omega$) puede ser no considerada (Abragam, 1961).

En el sistema de coordenadas X', Y', Z' la ecuación 1.18 puede escribirse de la siguiente forma (Bloch, 1946):

$$\begin{aligned}
\frac{d\vec{M}}{dt} &= \gamma \vec{M} \times \vec{H}_{\text{ef}} - \frac{(M_x \vec{i} + M_y \vec{j})}{T_2} - \frac{(M_z - M_0) \vec{k}}{T_1} \\
\frac{dM_{x'}}{dt} &= -\frac{M_{x'}}{T_2} + (\omega - \omega_0) M_{y'} \\
\frac{dM_{y'}}{dt} &= -\frac{M_{y'}}{T_2} - (\omega - \omega_0) M_{x'} - \omega_1 M_{z'} \\
\frac{dM_{z'}}{dt} &= \omega_1 M_{y'} - \frac{(M_{z'} - M_0)}{T_1}
\end{aligned}
\tag{1.20}$$

La solución de la ecuación 1.20, para el caso de que los parámetros de la misma se mantengan constantes, es una suma de términos exponenciales decrecientes y un término correspondiente al estado base o steady state (($dM_{x'}/dt=0$, ($dM_{y'}/dt=0$, ($dM_{z'}/dt=0$). Cuando ha transcurrido suficiente tiempo para que los exponenciales decrecientes tiendan a cero, las componentes de la magnetización tienden al término correspondiente al estado base donde (Abragam, 1961):

$$\begin{aligned}
M_{x'} &= \frac{(\omega - \omega_0) \gamma H_1 T_2^2}{1 + [T_2(\omega - \omega_0)]^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} M_0 \\
M_{y'} &= \frac{\gamma H_1 T_2}{1 + [T_2(\omega - \omega_0)]^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} M_0 \\
M_{z'} &= \frac{1 + [T_2(\omega - \omega_0)]^2}{1 + [T_2(\omega - \omega_0)]^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} M_0
\end{aligned}
\tag{1.21}$$

Considerando que la relación entre las componentes de la magnetización en ambos sistemas coordenados está dada por la ecuación 1.22, podemos describir la evolución temporal de las componentes de M en X, Y, Z de acuerdo a la ecuación 1.23 (Abragam, 1961).

$$\begin{aligned}
M_x + iM_y &= (M_{x'} + iM_{y'}) e^{i\omega t} \\
M_x &= M_{x'} \cos \omega t - M_{y'} \sin \omega t \\
M_y &= M_{x'} \sin \omega t + M_{y'} \cos \omega t \\
M_z &= M_{z'}
\end{aligned}
\tag{1.22}$$

$$\begin{aligned}
M_x &= \frac{\gamma H_1 T_2}{1 + [T_2(\omega - \omega_0)]^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} M_0 [(\omega - \omega_0) T_2 \cos \omega t - \sin \omega t] \\
M_y &= \frac{\gamma H_1 T_2}{1 + [T_2(\omega - \omega_0)]^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} M_0 [(\omega - \omega_0) T_2 \sin \omega t + \cos \omega t] \\
M_z &= \frac{1 + [T_2(\omega - \omega_0)]^2}{1 + [T_2(\omega - \omega_0)]^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} M_0
\end{aligned}
\tag{1.23}$$

En resonancia ($\omega = \omega_0$), la ecuación 1.23 puede escribirse:

$$\begin{aligned}
M_x &= -\frac{\gamma H_1 T_2}{1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} M_0 \sin \omega_0 t \\
M_y &= \frac{\gamma H_1 T_2}{1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} M_0 \cos \omega_0 t \\
M_z &= \frac{M_0}{1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2}
\end{aligned}
\tag{1.24}$$

Como es posible observar en las ecuaciones 1.23 y 1.24, las componentes transversales de la magnetización en X, Y, Z son dependientes del tiempo y esta variación es el origen de la señal de RMN cuyos fundamentos veremos en detalle en el capítulo 3. También es evidente, a partir de estas mismas ecuaciones, que la señal de RMN contendrá información sobre los valores de T_1 y T_2 , siendo esta la base de la implementación tecnológica de la Relajación Magnética Nuclear como veremos en el capítulo 3.

Capítulo 2: Relajación Magnética Nuclear



Giromag 02, primer equipo de Relajación Magnética Nuclear construido en Cuba. Grupo de Resonancia Magnética Nuclear. Departamento de Física. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

Relajación Magnética Nuclear

Una vez alterada la diferencia de población entre los subniveles de Zeeman (n), gracias al suministro de una cantidad de energía exactamente igual a la diferencia energética entre los subniveles magnéticos consecutivos, se requiere de procesos en los cuales el sistema de núcleos en estudio (sistema de spines) realice intercambios energéticos con el entorno que tiendan a restaurar la diferencia de población en el estado de equilibrio termodinámico (n_0). Estos procesos pudieran ser (Bloembergen et al, 1948):

-El intercambio con el campo de radiaciones térmicas, sin embargo, en este caso la probabilidad de emisión espontánea (A) es de 10^{-22}s^{-1} y el tiempo de relajación correspondiente a esta interacción sería $\approx 10^{15} \text{s}$.

-Las interacciones eléctricas, sin embargo, para que ellas provoquen la relajación del núcleo en estudio se requiere que este posea un momento cuadrupolar eléctrico (Q) distinto de cero y, también, que exista una variación del gradiente de campo eléctrico en la posición de dicho núcleo. Para los protones $I = 1/2$, $Q = 0$.

-Las interacciones magnéticas entre los momentos magnéticos nucleares y las que tienen lugar entre ellos y momentos magnéticos electrónicos presentes en la muestra.

Como interacción magnética dominante vamos a considerar la interacción Dipolo-Dipolo por su papel preponderante en la relajación spin-retículo dentro de las sustancias diamagnéticas y por ser la total responsable del ensanchamiento de la línea de Resonancia Magnética. Para realizar este análisis teórico nos apoyaremos de forma fundamental en el trabajo seminal publicado por Bloembergen, Purcel y Pound en la mitad del siglo pasado (Bloembergen *et al*, 1948) y que es considerado la base de los fundamentos de la Relajación Magnética Nuclear.

Vamos a asumir un retículo rígido de N spines. Bajo la acción de un campo magnético externo y constante H_0 , y considerando la interacción dipolo-dipolo entre los momentos magnéticos nucleares $\mu_i = \gamma_i \hbar I_i$ y $\mu_j = \gamma_j \hbar I_j$ separados una distancia r_{ij} , el Hamiltoniano (H^a) del sistema es:

$$H^a = \sum_i \gamma_i \hbar I_i \cdot H_0 + \sum_i \gamma_i \hbar I_i \cdot \sum_j \left(\frac{\gamma_j \hbar I_j}{(r_{ij})^3} - \frac{3\gamma_j \hbar r_{ij}^2 (r_{ij} \cdot I_j)}{(r_{ij})^5} \right) \quad (2.1)$$

En la ecuación 2.1 el primer término del miembro derecho se corresponde con la interacción de cada uno de los momentos magnéticos nucleares con el campo magnético externo (H_0). El segundo término es la resultante de la interacción dipolar de cada uno de los núcleos con el resto de los momentos magnéticos nucleares en su

entorno (figura 2.1 A). La sumatoria por j dentro del segundo término es lo que se conoce como campo magnético local (H_{loc}):

$$H_{loc} = \sum_j \left(\frac{\gamma_j \hbar I_j}{(r_{ij})^3} - \frac{3\gamma_j \hbar \vec{r}_{ij} (\vec{r}_{ij} \bullet I_j)}{(r_{ij})^5} \right) \quad (2.2)$$

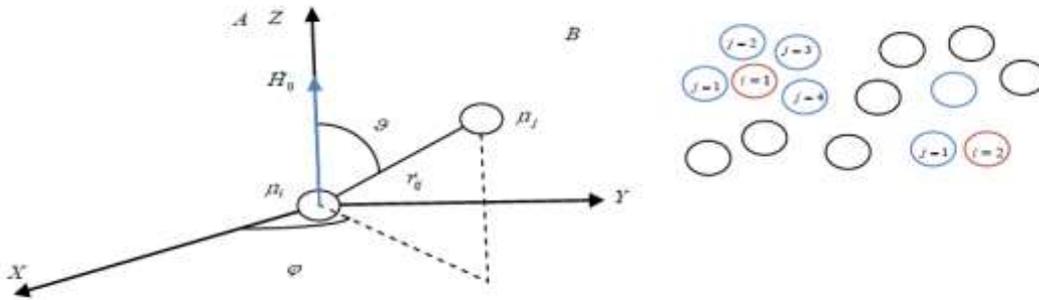


Figura 2.1. Interacción dipolar

Leyenda: A, interacción magnética dipolar entre dos núcleos de momentos magnéticos μ_i y μ_j separados una distancia r_{ij} . θ y ϕ son los ángulos radiales y azimutales que se emplean para identificar la posición de μ_j con respecto a μ_i en coordenadas esféricas. B, conjunto de elipses que representan momentos magnéticos en un retículo rígido, donde se identifican en color rojo 2 núcleos i (núcleos en estudio) con diferentes entornos magnéticos (momentos magnéticos destacados en azul) y, por tanto, con diferentes valores de H_{loc} , $H_R^Z = (H_0 + H_{loc}^Z)k$ y $\omega_R = -\gamma H_R^Z$

Para describir su efecto la interacción dipolar se asume como una perturbación V , donde:

$$\begin{aligned} V &= \sum_{i < j} V_{ij} \\ V_{ij} &= \gamma^2 \hbar^2 r_{ij}^{-3} [A + B + C + D + E + F] \\ A &= I_{xi} I_{xj} (1 - 3 \cos^2 \theta_{ij}) \\ B &= -\frac{1}{4} [(I_{xi} - iI_{yi})(I_{xj} + iI_{yj}) + (I_{xi} + iI_{yi})(I_{xj} - iI_{yj})] (1 - 3 \cos^2 \theta_{ij}) \\ C &= -\frac{3}{2} [(I_{xi} + iI_{yi})I_{zj} + (I_{xj} + iI_{yj})I_{zi}] \text{sen } \theta_{ij} \cos \theta_{ij} e^{-i\phi_{ij}} e^{iH_{ij}\phi} \\ D &= -\frac{3}{2} [(I_{xi} - iI_{yi})I_{zj} + (I_{xj} - iI_{yj})I_{zi}] \text{sen } \theta_{ij} \cos \theta_{ij} e^{i\phi_{ij}} e^{-iH_{ij}\phi} \\ E &= -\frac{3}{4} (I_{xi} + iI_{yi})(I_{xj} + iI_{yj}) \text{sen}^2 \theta_{ij} e^{-2i\phi_{ij}} e^{2iH_{ij}\phi} \\ F &= -\frac{3}{4} (I_{xi} - iI_{yi})(I_{xj} - iI_{yj}) \text{sen}^2 \theta_{ij} e^{2i\phi_{ij}} e^{-2iH_{ij}\phi} \end{aligned} \quad (2.3)$$

Donde θ y ϕ son los ángulos radiales y azimutales que caracterizan la posición de μ_j con respecto a μ_i en un sistema de coordenadas esféricas (figura 2.1 A). En un retículo

rígido las contribuciones dominantes de la perturbación aparecen contenidas en los términos A y B. Los términos de la E a la F representan perturbaciones periódicas de pequeña amplitud. Clásicamente A provoca el cambio de la componente Z del campo magnético resultante que siente el núcleo en estudio como resultado de su interacción con la componente Z del campo magnético local resultante originado por los momentos magnéticos vecinos ($H_R^Z = (H_0 + H_{loc}^Z)k$). Al cambiar $H_R^Z = (H_0 + H_{loc}^Z)k$ cambia también su frecuencia de resonancia ($\omega_R = -\gamma H_R^Z$). Así, como en el interior de este retículo rígido los núcleos en estudio van a estar ubicados en diferentes posiciones, estos van a tener diferentes entornos magnéticos; es decir, van a estar rodeados por diferentes distribuciones de momentos magnéticos vecinos y van a sentir, por tanto, diferentes campos magnéticos locales (H_{loc}), ver figura 2.1 B. Por ende; habrá dentro del retículo una distribución de campos magnéticos locales ($(H_{loc})_i$), lo cual lleva a la existencia de una distribución en los valores de las componentes Z del campo magnético resultante que sienten los núcleos en estudio ($(H_R^Z)_i$) y por tanto una distribución de frecuencias de resonancia ($(\omega_R)_i = -\gamma(H_R^Z)_i$). La variación de H_{loc} dependerá de las características geométricas y estructurales del retículo, sin embargo, puede establecerse la contribución del término A al valor medio cuadrático del campo local, la cual estará dada por la ecuación:

$$(H_{loc}^2)_{AV} = \frac{1}{3} \gamma^2 \hbar^2 I(I+1) \frac{\sum (1 - \cos^2 \theta_{ij})}{r_{ij}^6} \quad (2.4)$$

La existencia de una distribución de frecuencias de resonancia ($(\omega_R)_i = -\gamma(H_R^Z)_i$) conduce a un ensanchamiento de la línea de resonancia magnética dado por la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} (\omega_{loc}^2)_{AV} &= \gamma^2 (H_{loc}^2)_{AV} \\ (\omega_{loc}^2)_{AV} &= \frac{1}{3} \gamma^4 \hbar^2 I(I+1) \frac{\sum (1 - \cos^2 \theta_{ij})}{r_{ij}^6} \end{aligned} \quad (2.5)$$

El término B provoca el cambio simultáneo de orientación del momento magnético de 2 núcleos iguales que se encuentran cercanos y sus momentos magnéticos poseen diferente orientación con respecto al campo magnético externo constante (figura 2.2). Esto ocurre porque 2 núcleos iguales y cercanos, que sienten el mismo campo magnético resultante ($H_R = H_0 + H_{loc}$), van a precesar (en X, Y, Z) alrededor de $H_R = H_0 + H_{loc}$ con la misma frecuencia de resonancia $\omega_R = -\gamma H_R$; y cada uno va a provocar la aparición, en la posición de su vecino, de un campo magnético rotante (perpendicular a H_0) que varía con $\omega_R = -\gamma H_R$ y que induce el cambio de orientación del momento magnético del vecino. Este proceso limita el tiempo de vida media del núcleo en cada subnivel energético de Zeeman incrementando también el ancho de la línea.

La variación del ancho de la línea a partir de la contribución simultánea de A y B estará dada por la siguiente ecuación:

$$(\omega_{loc}^2)_{AV} = \frac{9}{4} \gamma^4 \hbar^2 \frac{I(I+1)}{3} \frac{\sum_j (1 - \cos^2 \vartheta_{ij})}{r_{ij}^6} \quad (2.6)$$

$$T_2^* = \frac{\pi}{2(\omega_{loc}^2)_{AV}}$$

Aquí, en el retículo rígido, T_2^* está básicamente determinado por la interacción magnética dipolar de los núcleos en estudio con los momentos magnéticos vecinos, especialmente con las contribuciones de los términos A y B.

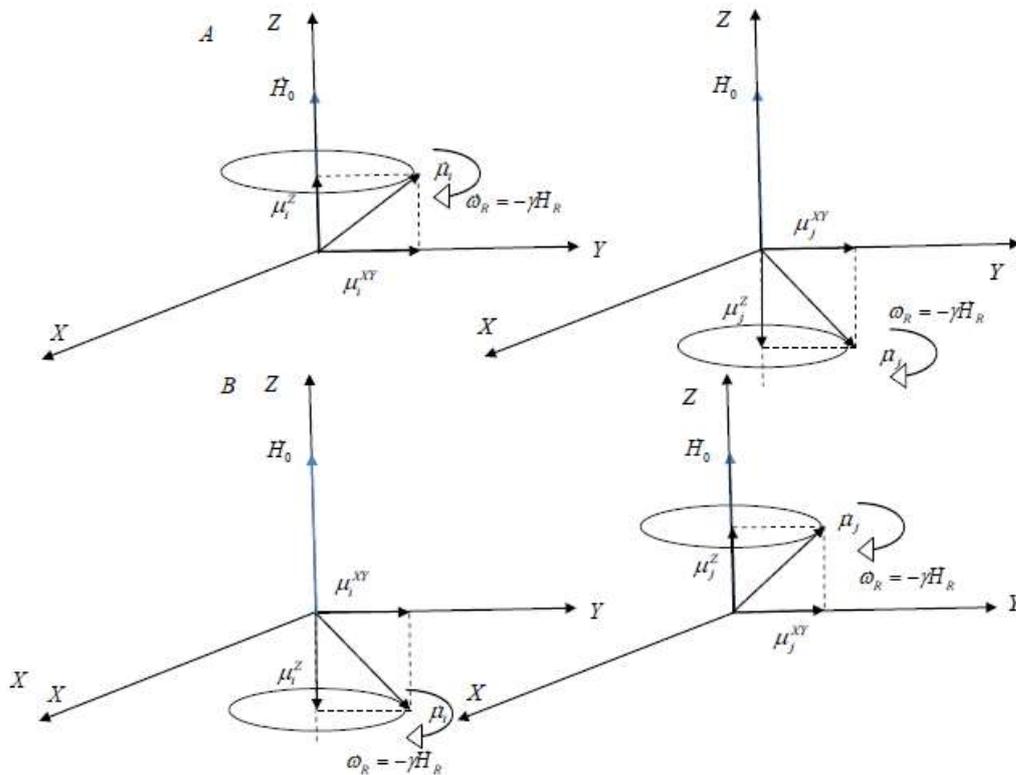


Figura 2.2. Efecto del término B de la perturbación dipolar

Leyenda: A, dos núcleos iguales y cercanos con momentos magnéticos μ_i y μ_j orientados en diferentes direcciones con respecto a H_0 y precesando en X, Y, Z con $\omega_R = -\gamma H_R$. B, como resultado de la rotación de las componentes transversales de los momentos magnéticos con $\omega_R = -\gamma H_R$, cada uno genera en la posición de su vecino un campo magnético rotante (perpendicular a H_0) que trae como consecuencia el cambio de orientación simultáneo de ambos momentos magnéticos con respecto a H_0 . El sentido de las rotaciones ha sido escogido tal que $\gamma > 0$

Cuando el retículo no es rígido, es decir, cuando hay presencia significativa de movimiento, lo cual significa que hay una variación de r_{ij} , ϑ_{ij} y ϕ_{ij} en función del tiempo, esto puede provocar transiciones entre los niveles de Zeeman y se dice, en ese caso, que el sistema de spines y el retículo están intercambiando energía. Básicamente, en presencia de movimiento, la perturbación $V=V(t)$:

$$\begin{aligned}
V &= \sum_i \sum_{j \neq i} V_{ij} \\
V_{ij} &= \gamma^2 \hbar^2 r(t)_{ij}^{-3} [A + B + C + D + E + F] \\
A &= I_{xi} I_{yj} (1 - 3 \cos^2 \vartheta_{ij}(t)) \\
B &= -\frac{1}{4} [(I_{xi} - iI_{yi})(I_{yj} + iI_{yj}) + (I_{xi} + iI_{yi})(I_{yj} - iI_{yj})] (1 - 3 \cos^2 \vartheta_{ij}(t)) \\
C &= -\frac{3}{2} [(I_{xi} + iI_{yi})I_{yj} + (I_{yj} + iI_{yj})I_{xi}] \text{sen} \vartheta_{ij}(t) \cos \vartheta_{ij}(t) e^{-i\varphi_{ij}(t)} e^{-iH_0 t} \\
D &= -\frac{3}{2} [(I_{xi} - iI_{yi})I_{yj} + (I_{yj} - iI_{yj})I_{xi}] \text{sen} \vartheta_{ij}(t) \cos \vartheta_{ij}(t) e^{i\varphi_{ij}(t)} e^{-iH_0 t} \\
E &= -\frac{3}{4} (I_{xi} + iI_{yi})(I_{yj} + iI_{yj}) \text{sen}^2 \vartheta_{ij}(t) e^{-2i\varphi_{ij}(t)} e^{-2iH_0 t} \\
F &= -\frac{3}{4} (I_{xi} - iI_{yi})(I_{yj} - iI_{yj}) \text{sen}^2 \vartheta_{ij}(t) e^{2i\varphi_{ij}(t)} e^{-2iH_0 t}
\end{aligned} \tag{2.7}$$

Si definimos las funciones coordenadas que caracterizan las variaciones relativas de las posiciones de los núcleos como:

$$\begin{aligned}
F_{0j} &= (1 - 3 \cos^2 \vartheta_{ij}(t)) r(t)_{ij}^{-3} \\
F_{1j} &= \text{sen} \vartheta_{ij}(t) \cos \vartheta_{ij}(t) e^{-i\varphi_{ij}(t)} r(t)_{ij}^{-3} \\
F_{2j} &= \text{sen}^2 \vartheta_{ij}(t) e^{2i\varphi_{ij}(t)} r(t)_{ij}^{-3}
\end{aligned} \tag{2.8}$$

Entonces, las distribuciones de frecuencias existentes en el retículo producto del movimiento molecular son las siguientes:

$$\begin{aligned}
J_0(\omega) &= \int_{-\infty}^{+\infty} (1 - 3 \cos^2 \vartheta_{ij}(t)) r(t)_{ij}^{-3} e^{-i\omega t} dt \\
J_1(\omega) &= \int_{-\infty}^{+\infty} \text{sen} \vartheta_{ij}(t) \cos \vartheta_{ij}(t) e^{-i\varphi_{ij}(t)} r(t)_{ij}^{-3} e^{-i\omega t} dt \\
J_2(\omega) &= \int_{-\infty}^{+\infty} \text{sen}^2 \vartheta_{ij}(t) e^{2i\varphi_{ij}(t)} r(t)_{ij}^{-3} e^{-i\omega t} dt
\end{aligned} \tag{2.9}$$

Si $J_1(\omega_0) \neq 0$ y $J_1(-\omega_0) \neq 0$ entonces los términos C y D de la perturbación serán seculares y ocurrirán transiciones con $\Delta m = \pm 1$. Si $J_2(2\omega_0) \neq 0$ y $J_2(-2\omega_0) \neq 0$ entonces los términos E y F de la perturbación serán seculares y ocurrirán transiciones con $\Delta m = \pm 2$. Esto garantizará el intercambio de energía entre el sistema de spines y el retículo.

Otra forma de analizar el efecto de los campos magnéticos locales es considerar que el campo magnético local que produce un núcleo j sobre un núcleo i tiene 2 componentes: una parte estática $((H_{loc}^Z)_{ji})$ que depende de I_{zj} y una parte rotante $((H_{loc}^{XY})_{ji})$ que depende de $(I_{xj} - iI_{yj})$, ver figura 2.3. El movimiento molecular provoca las fluctuaciones de la parte estática del campo local. Si dentro de estas fluctuaciones encontramos variaciones temporales de la componente estática cuya frecuencia coincide con la

frecuencia de resonancia del núcleo i ; entonces el núcleo i se ve sometido a un campo magnético variable, originado gracias al movimiento molecular, que es capaz de inducir transiciones con $\Delta m = \pm 1$. Este es el efecto que provocan los términos C y D de la perturbación $V(t)$.

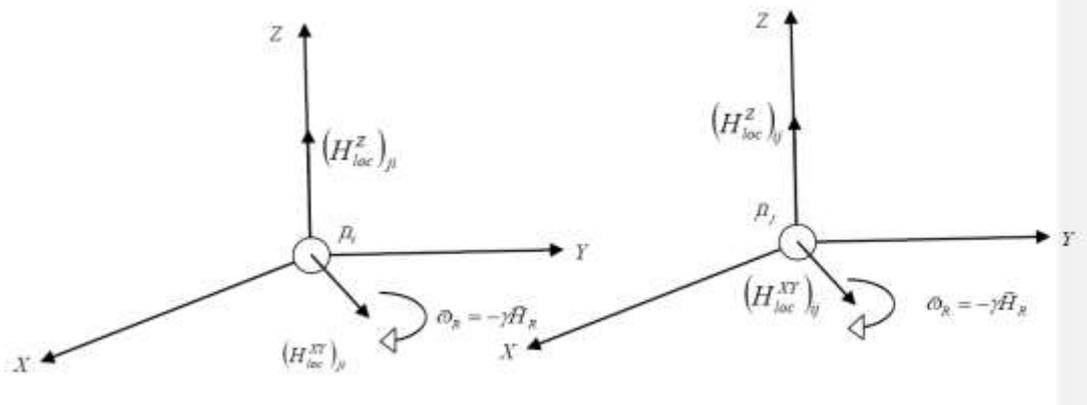


Figura 2.3. Componentes estática y rotante del campo magnético local que sienten dos núcleos i y j que se encuentran lo suficientemente cercanos

Leyenda: el núcleo j provoca la aparición, en la posición del núcleo i , de un campo magnético local con componentes estática $(H_{loc}^Z)_{ji}$ y rotante $(H_{loc}^{XY})_{ji}$. De igual forma, la cercanía de i provoca la aparición, en la posición del núcleo j , de un campo magnético local con componentes estática $(H_{loc}^Z)_{ij}$ y rotante $(H_{loc}^{XY})_{ij}$. El sentido de las rotaciones ha sido escogido tal que $\gamma > 0$

La componente rotante del campo magnético local consiste en 2 componentes circularmente polarizadas. En el caso del retículo rígido una de ellas tiene un efecto despreciable (rota en sentido contrario a la precesión del momento magnético del núcleo i alrededor del campo magnético resultante) y la otra, que rota en el mismo sentido de la precesión del momento magnético del núcleo i alrededor del campo magnético resultante, provoca el ensanchamiento de la línea causado por el término B de la perturbación V . En un retículo con movimiento, si existen movimientos adecuados con frecuencia $2\omega_0$ o $-2\omega_0$, la componente que era despreciable en el retículo rígido revierte su movimiento y ahora es efectiva pudiendo interactuar con el núcleo i . Este es el efecto que provocan los términos E y F de la perturbación $V(t)$. Como lo mismo ocurre en el núcleo j , debido al efecto de la componente rotante del campo local que se origina en el núcleo i , entonces habrá transiciones dobles.

De esta forma es claro que en un retículo móvil (no rígido) las perturbaciones contenidas en los términos C, D, E y F de la perturbación $V(t)$ son capaces de provocar intercambio de energía entre el sistema de spines y el retículo a través de la ocurrencia de transiciones con $\Delta m = \pm 1$ y $\Delta m = \pm 2$.

Las probabilidades de ocurrencia de las transiciones con $\Delta m = \pm 1$, que puede ser entre los 2 subniveles magnéticos de Zeeman que surgen cuando $I = 1/2$ o entre subniveles consecutivos cuando $I > 1/2$, pueden evaluarse como:

$$\begin{aligned}
W_{+-} &= W \left[1 - \left(\frac{\gamma \hbar H_0}{2kT} \right) \right] \\
W_{-+} &= W \left[1 + \left(\frac{\gamma \hbar H_0}{2kT} \right) \right] \\
W &= \frac{3}{4} \gamma^4 \hbar^2 I(I+1) \left[J_1(\nu_0) + \frac{1}{2} J_2(2\nu_0) \right]
\end{aligned}
\tag{2.10}$$

Donde $\nu_0 = \omega_0/2\pi$, el signo + representa el subnivel de menor energía (con población N+) y el signo – el de mayor energía (con población N-). Si la diferencia de población entre estos subniveles es $n = (N+) - (N-)$ y su valor en el estado de equilibrio termodinámico es $n_0 = ((N+) + (N-)) (\gamma \hbar H_0 / 2kT)$ entonces:

$$\begin{aligned}
\frac{dn}{dt} &= \frac{dN_+}{dt} - \frac{dN_-}{dt} \\
\frac{dn}{dt} &= 2N_+ W_{+-} - 2N_- W_{-+} \\
\frac{dn}{dt} &= 2W(n_0 - n) \\
\frac{dn}{dt} &= \frac{1}{T_1} (n_0 - n) \\
\frac{1}{T_1} &= \frac{3}{2} \gamma^4 \hbar^2 I(I+1) \left[J_1(\nu_0) + \frac{1}{2} J_2(2\nu_0) \right]
\end{aligned}
\tag{2.11}$$

La expresión de $1/T_1$ en la ecuación 2.11 es válida para interacciones homonucleares entre núcleos con $I=1/2$.

En un retículo en movimiento los términos A y B de la perturbación dipolar (que en un retículo rígido provocaban el ensanchamiento de la línea descrito en la ecuación 2.6) van a ser seculares si utilizamos valores de frecuencias “cerca de cero” para $J_0(\nu)$, es decir, la perturbación será secular hasta valores de $\nu = \omega/2\pi$ para los cuales $h\nu$ está en el mismo orden que el desdoblamiento energético provocado por la propia perturbación. Al ser seculares, A y B provocarán un ensanchamiento de la línea ($\Delta\omega = 2\pi\Delta\nu = 1/T_2'$) dado por:

$$\frac{1}{T_2'} = \frac{3}{2} \gamma^2 \hbar \left[\frac{I(I+1)}{3} \right]^{\frac{1}{2}} \left[\int_{-\frac{1}{\pi T_2'}}^{+\frac{1}{\pi T_2'}} J_0(\nu) d\nu \right]^{\frac{1}{2}}
\tag{2.12}$$

El intercambio de energía entre los núcleos en estudio y su entorno, provocado por los términos C, D, E y F de la perturbación V(t), limita el tiempo de vida media de los núcleos en cada uno de los subniveles energéticos de Zeeman y contribuye, por tanto, adicionalmente al ensanchamiento de la línea. Para núcleos con $I=1/2$ el ensanchamiento resultante de la línea será recogido en $1/T_2$ y estará dado por:

$$\frac{1}{T_2} = \left(\frac{2}{\pi}\right)^2 \frac{1}{T_1} + \frac{1}{2} \frac{1}{T_1}$$

$$\frac{1}{T_2} = \left(\frac{2}{\pi}\right)^2 \frac{3}{2} \gamma^2 \hbar \left[\frac{I(I+1)}{3} \right]^{\frac{1}{2}} \left[\int_{-\frac{1}{\pi_1}}^{\frac{1}{\pi_2}} J_0(\nu) d\nu \right]^{\frac{1}{2}} + \frac{3}{4} \gamma^4 \hbar^2 I(I+1) \left[J_1(\nu_0) + \frac{1}{2} J_2(2\nu_0) \right]$$

(2.13)

Así, T_1 es una constante de tiempo que refleja la probabilidad de las transiciones entre los subniveles energéticos de Zeeman inducidas por la interacción con los momentos magnéticos vecinos y el movimiento molecular, los cuales garantizan el flujo de energía entre el sistema de spines y el retículo. Por su parte T_2 es una constante de tiempo que refleja el ensanchamiento de la línea de RMN (si excluimos el ensanchamiento debido a las inhomogeneidades de H_0); sin embargo, gracias al aporte de T_1 al ensanchamiento de la línea, también T_2 puede relacionarse con la probabilidad de las transiciones entre los subniveles energéticos de Zeeman que garantizan el flujo energético entre el sistema de spines y el retículo.

Es claro que para tener expresiones más “potables” de $1/T_1$ y $1/T_2$ en las ecuaciones 2.11 y 2.13 es necesario tener, a su vez, las expresiones de las transformadas de Fourier de cada una de las 3 funciones espaciales que describen la interacción dipolar: $J_0(\nu)$, $J_1(\nu)$ y $J_2(\nu)$. Para ello vamos a tener en cuenta la función de correlación $K(\tau)$ que expresa como están relacionados los estados de interacción dipolar de los núcleos en un instante t y otro $t+\tau$:

$$K(\tau) = (F(t)F^*(t+\tau))_{AV} \quad (2.14)$$

En la ecuación 2.14 K es una función real dependiente de τ e independiente de t y que es cero para grandes valores de τ . $J(\nu)$ es la transformada de Fourier de $K(\tau)$:

$$J(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} K(\tau) e^{2\pi i \nu \tau} d\tau \quad (2.15)$$

Para simplificar el análisis se asume que la función de correlación tiene forma de exponencial decreciente:

$$K(\tau) = (F(t)F^*(t))_{AV} e^{-\frac{|\tau|}{\tau_c}} \quad (2.16)$$

En la ecuación 2.16 τ_c es una constante de tiempo que caracteriza el movimiento molecular y, dada esta forma de la función de correlación, es el valor de τ para el cual la correlación entre las interacciones dipolares en dos instantes diferentes de tiempo se reduce e veces. Así:

$$J_i(\nu) = \left(F_i(t) F_i^*(t) \right)_{AV} \frac{2\tau_c}{1 + 4\pi^2 \nu^2 \tau_c^2} \quad (2.17)$$

$i = 0, 1, 2$

De esta forma, “potabilizar” las expresiones de $1/T_1$ y $1/T_2$ en las ecuaciones 2.11 y 2.13 significa calcular, a partir de la ecuación 2.17, las expresiones de las funciones $J_0(\nu_0)$, $J_1(\nu_0)$ y $J_2(\nu_0)$ y para ello se requiere, básicamente, computar las expresiones $(F_i(t) F_i^*(t))_{AV}$ para $i = 0, 1$ y 2 .

Los movimientos moleculares que más aportan a la relajación magnética nuclear, especialmente en medios biológicos, son la rotación y la difusión molecular.

Relajación magnética Nuclear modulada por la rotación

Para el caso de núcleos con $I=1/2$, que interactúan dipolarmente con los momentos magnéticos de su entorno de forma tal que se mantiene constante la distancia entre los entes interactuantes y varía aleatoriamente la dirección del vector que los une, si asumimos geometría esférica y una función de correlación de tipo monoexponencial, entonces las velocidades de relajación longitudinal ($1/T_1$) y transversal ($1/T_2$) pueden ser descritas por las siguientes ecuaciones (Kubo y Tomita, 1954; Solomon, 1955; Hubbard, 1961; Woessner, 1962; Woessner, 1969):

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} &= \frac{9}{8} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma^4 \hbar^2 [J_1(\omega_0) + J_2(2\omega_0)] \\ \frac{1}{T_2} &= \frac{9}{32} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma^4 \hbar^2 [J_0(0) + 10J_1(\omega_0) + J_2(2\omega_0)] \end{aligned} \quad (2.18)$$

Donde μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío. La ecuación 2.18 ha sido la más empleada en las condiciones planteadas y coincide con las ecuaciones 2.11 y 2.13 planteadas por Bloembergen, Purcell y Pound (Bloembergen et al, 1948), salvo en el factor $1/2$ que aparece multiplicando a $J_2(2\omega_0)$ en la expresión para $1/T_1$. El factor $(\mu_0/4\pi)^2$ es imprescindible para un correcto análisis dimensional y como factor escala.

Si se asume que la distancia que separa los entes interactuantes dipolarmente es invariante, de valor b , y que solo varía aleatoriamente la orientación del radiovector que los une (molécula rígida que contiene ambos entes interactuantes y que rota) entonces (Bloembergen et al, 1948):

$$\begin{aligned}
F_0 &= (1 - 3\cos^2 \vartheta) b^{-3} \\
F_1 &= \sin \vartheta \cos \vartheta e^{i\varphi} b^{-3} \\
F_2 &= \sin^2 \vartheta e^{2i\varphi} b^{-3} \\
\left(F_0(t) F_0^*(t) \right)_{AV} &= \frac{4}{5b^6} \\
\left(F_1(t) F_1^*(t) \right)_{AV} &= \frac{2}{15b^6} \\
\left(F_2(t) F_2^*(t) \right)_{AV} &= \frac{8}{15b^6}
\end{aligned}
\tag{2.19}$$

A partir de las ecuaciones 2.17 y 2.19, la ecuación 2.18 puede ser reescrita de acuerdo a (Kubo y Tomita, 1954; Solomon, 1955; Hubbard, 1961; Woessner, 1962; Woessner, 1969):

$$\begin{aligned}
\frac{1}{T_1} &= \frac{3}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{b^6} \left[\frac{\tau_c}{1 + (\omega_0 \tau_c)^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4(\omega_0 \tau_c)^2} \right] \\
\frac{1}{T_2} &= \frac{3}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{b^6} \left[3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1 + (\omega_0 \tau_c)^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4(\omega_0 \tau_c)^2} \right]
\end{aligned}
\tag{2.20}$$

En la ecuación 2.20 τ_c es el tiempo de correlación rotacional de la molécula que contiene los entes interactuantes.

En el caso de la presencia de un paramagnético en la muestra, el núcleo en estudio se relaja adicionalmente gracias a su interacción dipolar con el spin electrónico S de acuerdo a (Solomon, 1955):

$$\begin{aligned}
\frac{1}{T_1} &= \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^2 \gamma_s^2 \hbar^2}{b^6} \left[\frac{\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 - \omega_{0s})^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{3\tau_{C-e}}{1 + \omega_0^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 + \omega_{0s})^2 \tau_{C-e}^2} \right] \\
\frac{1}{T_2} &= \frac{1}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^2 \gamma_s^2 \hbar^2}{b^6} \left[4\tau_c + \frac{\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 - \omega_{0s})^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{3\tau_{C-e}}{1 + \omega_0^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + \omega_{0s}^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 + \omega_{0s})^2 \tau_{C-e}^2} \right]
\end{aligned}
\tag{2.21}$$

Aquí γ_s y ω_{0s} son la razón giromagnética y la frecuencia de resonancia, respectivamente, del electrón no apareado en la estructura del elemento paramagnético. En la ecuación 2.21 τ_{C-e} es el tiempo de correlación resultante de las contribuciones del tiempo de correlación rotacional de la molécula que contiene los entes interactuantes (τ_c) y el tiempo de relajación longitudinal del spin electrónico (τ_s), de forma tal que $1/\tau_{C-e} = 1/\tau_c + 1/\tau_s$. Como es evidente, si $\tau_s \ll \tau_c$, entonces $\tau_{C-e} = \tau_s$.

Relajación Magnética Nuclear modulada por la rotación en el caso de la asimetría esférica

Si en vez de considerar que los 2 entes interactuantes están embebidos en una molécula de geometría esférica rígida que se mueve isotrópicamente en un medio continuo de viscosidad η ; asumimos que los mismos están insertados en una molécula rígida de geometría elipsoidal que se mueve anisotrópicamente en este medio (el movimiento del elipsoide es diferente en dependencia del eje principal con respecto al cual se realiza); entonces las funciones densidad espectral ($J_i(\omega)$) se calculan según la ecuación (Woessner, 1962; Woessner et al, 1969):

$$\begin{aligned}
 J_i(\omega) &= K_i \left[C_+ \left(\frac{\tau_+}{1 + (\omega\tau_+)^2} \right) + C_- \left(\frac{\tau_-}{1 + (\omega\tau_-)^2} \right) + C_1 \left(\frac{\tau_1}{1 + (\omega\tau_1)^2} \right) + C_2 \left(\frac{\tau_2}{1 + (\omega\tau_2)^2} \right) \right] \\
 d &= \frac{1}{2} \left[3(l'^2 + m'^2 + n'^2) - 1 \right] \\
 e &= \frac{1}{6} \left[\delta_1 (6l'^2 + 3m'^2 + 3n'^2 - 1) + \delta_2 (6m'^2 + 3l'^2 + 3n'^2 - 1) + \delta_3 (6n'^2 + 3l'^2 + 3m'^2 - 1) \right] \\
 C_+ &= d - e \\
 C_- &= d + e \\
 C_1 &= 6(m')^2(n')^2 \\
 C_2 &= 6(l')^2(n')^2 \\
 C_3 &= 6(l')^2(m')^2 \\
 \frac{1}{\tau_1} &= 4R_1 + R_2 + R_3 \\
 \frac{1}{\tau_2} &= 4R_2 + R_1 + R_3 \\
 \frac{1}{\tau_3} &= 4R_3 + R_2 + R_1 \\
 \frac{1}{\tau_{\pm}} &= 6 \left[R \pm (R^2 - L^2)^{\frac{1}{2}} \right] \\
 \delta_i &= \frac{(R_i - R)}{(R^2 - L^2)^{\frac{1}{2}}} \\
 L^2 &= \frac{1}{3} (R_1R_2 + R_1R_3 + R_2R_3) \\
 R &= \frac{1}{3} (R_1 + R_2 + R_3) \\
 K_0 &= \frac{4}{5}, K_1 = \frac{2}{15}, K_2 = \frac{8}{15}
 \end{aligned}$$

(2.22)

Donde R_1 , R_2 y R_3 son los coeficientes de difusión rotacional alrededor de cada uno de los 3 ejes del elipsoide. l' , m' y n' son los cosenos directores del radiovector que une a los 2 entes interactuantes embebidos dentro del elipsoide con respecto a un sistema de coordenadas ubicado de forma que coincide con los 3 ejes del elipsoide.

En líquidos, donde $\omega^2\tau_i^2 \ll 1$, las velocidades de relajación longitudinal y transversal van a estar dadas por la ecuación:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_2} = \frac{3}{4} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} [C_+ \tau_+ + C_- \tau_- + C_1 \tau_1 + C_2 \tau_2] \quad (2.23)$$

La ecuación 2.22 es evidentemente compleja, sin embargo, se simplifica notablemente si el movimiento alrededor de 2 de los ejes principales del elipsoide se realiza con igual coeficiente de difusión rotacional ($R_2=R_3$):

$$J_l(\omega) = 2K_l \left[A \left(\frac{\tau_A}{1+(\omega\tau_A)^2} \right) + B \left(\frac{\tau_B}{1+(\omega\tau_B)^2} \right) + C \left(\frac{\tau_C}{1+(\omega\tau_C)^2} \right) \right]$$

$$A = \frac{1}{4} (3l^2 - 1)^2$$

$$B = 3l^2 (1 - l^2)$$

$$C = \frac{3}{4} (l^2 - 1)^2$$

$$\frac{1}{\tau_A} = 6R_2$$

$$\frac{1}{\tau_B} = 5R_2 + R_1$$

$$\frac{1}{\tau_C} = 4R_1 + 2R_2 \quad (2.24)$$

La ecuación 2.24 se cumple tanto cuando $R_2 > R_1$ como cuando $R_2 < R_1$. Aquí el movimiento del elipsoide es simétrico alrededor de X' (eje X del sistema coordenado rectangular que coincide con los 3 ejes principales del elipsoide (X', Y', Z')), por ello la función densidad espectral solo depende de l' y no de m' o n' . Es decir, las funciones $J(\omega)$ solo dependen del ángulo entre el radiovector que une los entes interactuantes y el eje de simetría para el movimiento del elipsoide (X'). Este caso particular se puede subdividir, a su vez, en 3 casos específicos:

a) Si el radiovector que une los entes interactuantes es paralelo al eje de simetría, entonces $l'=1$ ($\text{Cos}0^\circ=1$) y:

$$J_i(\omega) = 2K_i \frac{\tau_A}{1 + (\omega\tau_A)^2}$$

$$A = 1$$

$$B = 0$$

$$C = 0$$

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left[\frac{\tau_A}{1 + (\omega_0\tau_A)^2} + \frac{4\tau_A}{1 + (2\omega_0\tau_A)^2} \right]$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left[3\tau_A + \frac{5\tau_A}{1 + (\omega_0\tau_A)^2} + \frac{2\tau_A}{1 + (2\omega_0\tau_A)^2} \right]$$

(2.25)

Puede verse la similitud de las ecuaciones para $1/T_1$ y $1/T_2$ en la ecuación 2.25 con las obtenidas por Kubo y Tomita en 1954 (Kubo y Tomita, 1954), Solomon en 1955 (Solomon, 1955) y por P. S. Hubbard en 1961 (Hubbard, 1961) mostradas en la ecuación 2.20.

b) Si el radiovector que une los entes interactuantes es perpendicular al eje de simetría, entonces $\theta = 90^\circ$ ($\cos 90^\circ = 0$) y:

$$J_i(\omega) = 2K_i \left[\frac{1}{4} \left(\frac{\tau_A}{1 + (\omega\tau_A)^2} \right) + \frac{3}{4} \left(\frac{\tau_C}{1 + (\omega\tau_C)^2} \right) \right]$$

$$A = \frac{1}{4}$$

$$B = 0$$

$$C = \frac{3}{4}$$

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{40} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left[\left(\frac{\tau_A}{1 + (\omega_0\tau_A)^2} \right) + \left(\frac{4\tau_A}{1 + (2\omega_0\tau_A)^2} \right) + \left(\frac{3\tau_C}{1 + (\omega_0\tau_C)^2} \right) + \left(\frac{12\tau_C}{1 + (2\omega_0\tau_C)^2} \right) \right]$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{9}{32} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \frac{1}{5} \left[2\tau_A + \frac{10}{3} \left(\frac{\tau_A}{1 + (\omega_0\tau_A)^2} \right) + \frac{4}{3} \left(\frac{\tau_A}{1 + (2\omega_0\tau_A)^2} \right) + 6\tau_C + \frac{10}{3} \left(\frac{3\tau_C}{1 + (\omega_0\tau_C)^2} \right) + 4 \left(\frac{\tau_C}{1 + (2\omega_0\tau_C)^2} \right) \right]$$

(2.26)

c) Si el radiovector que une los entes interactuantes forma un ángulo de 45° con el eje de simetría del elipsoide:

$$\begin{aligned}
J_i(\omega) &= 2K_i \left[\frac{1}{16} \left(\frac{\tau_A}{1 + (\omega\tau_A)^2} \right) + \frac{3}{4} \left(\frac{\tau_B}{1 + (\omega\tau_B)^2} \right) + \frac{3}{16} \left(\frac{\tau_C}{1 + (\omega\tau_C)^2} \right) \right] \\
A &= \frac{1}{16} \\
B &= \frac{3}{4} \\
C &= \frac{3}{16} \\
\frac{1}{T_1} &= \frac{3}{160} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left[\frac{\tau_A}{1 + (\omega_0\tau_A)^2} + \frac{4\tau_A}{1 + (2\omega_0\tau_A)^2} + 12 \left(\frac{\tau_B}{1 + (\omega_0\tau_B)^2} + \frac{4\tau_B}{1 + (2\omega_0\tau_B)^2} \right) \right] \\
&\quad + 3 \left(\frac{\tau_C}{1 + (\omega_0\tau_C)^2} + \frac{4\tau_C}{1 + (2\omega_0\tau_C)^2} \right) \\
\frac{1}{T_2} &= \frac{3}{320} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left[3\tau_A + \frac{5\tau_A}{1 + (\omega_0\tau_A)^2} + \frac{2\tau_A}{1 + (2\omega_0\tau_A)^2} + 12 \left(3\tau_B + \frac{5\tau_B}{1 + (\omega_0\tau_B)^2} + \frac{2\tau_B}{1 + (2\omega_0\tau_B)^2} \right) \right] \\
&\quad + 3 \left(3\tau_C + \frac{5\tau_C}{1 + (\omega_0\tau_C)^2} + \frac{2\tau_C}{1 + (2\omega_0\tau_C)^2} \right)
\end{aligned} \tag{2.27}$$

Es posible asumir como mayoritario o representativo uno de los casos a), b) o c), sin embargo, en realidad, siendo el movimiento anisotrópico, puede existir una distribución de orientaciones del radiovector que une los entes interactuantes con respecto al eje de simetría del elipsoide. En ese caso las velocidades de relajación serían la sumatoria sopesada de las contribuciones de cada orientación.

Relajación Magnética Nuclear modulada por la difusión

Vamos a considerar dos núcleos i y j ($I=1/2$) embebidos, cada uno, dentro de moléculas esféricas de radio a , las cuales difunden en un medio continuo de viscosidad dinámica absoluta η a la temperatura absoluta T . Las velocidades de relajación magnética nuclear debidas a la interacción dipolar entre i y j están dadas por la ecuación 2.20 si se considera una distancia fija (b) entre los entes interactuantes y que la rotación molecular modula la relajación. Sin embargo; si consideramos la difusión simultánea de las moléculas que contienen a i y j , dentro de una capa esférica de radio r y ancho dr , entonces la distancia entre los entes interactuantes (r) variará modulando la interacción dipolar (Bloembergen et al, 1948; Ayant et al, 1977). En este caso, considerando un régimen de intercambio rápido ($(\omega_0\tau_C)^2 \ll 1$), la ecuación 2.20 puede escribirse como:

$$\begin{aligned}
\frac{1}{T_1} &= 2 \frac{3}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} 5\tau_C = 3 \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \tau_C \\
\frac{1}{T_2} &= 2 \frac{3}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} 10\tau_C = 3 \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \tau_C
\end{aligned} \tag{2.28}$$

En la ecuación 2.28 hemos considerado el caso particular de 2 protones ubicados en diferentes moléculas, siendo la molécula j (la que contiene al protón j) una molécula de agua. Particularmente, hemos tenido en cuenta la interacción dipolar de un protón ubicado en la molécula i (que contiene el protón i) con los 2 protones en la molécula j . Asumiendo τ_c como el tiempo que necesita el protón j para moverse una distancia r a

partir de la posición del protón i, en cualquier dirección, como resultado de la difusión caracterizada por el coeficiente de difusión translacional D ($\tau_c=f(r, D)$), entonces:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_2} = 3 \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} f(r, D) \quad (2.29)$$

Aquí D tiene en cuenta la difusión simultánea de las moléculas que contienen los protones i y j. Multiplicando la ecuación 2.29 por el número de moléculas de agua j por cm^3 (N_0^j) es posible evaluar las velocidades de relajación magnética protónica en la unidad de volumen:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_2} = 3 \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} f(r, D) N_0^j \quad (2.30)$$

Entonces, multiplicando la ecuación 2.30 por el volumen de la capa esférica ($4\pi r^2 dr$) es posible describir las velocidades de relajación magnética protónica en todo el volumen de la capa:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_2} = 3 \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} f(r, D) N_0^j 4\pi r^2 dr \quad (2.31)$$

Finalmente, integrando desde el radio de máxima aproximación (2a) hasta ∞ , es posible evaluar las velocidades de relajación magnética protónica en el volumen completo:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_2} = 3 \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma^4 \hbar^2 N_0^j \int_{2a}^{\infty} \frac{1}{r^6} f(r, D) 4\pi r^2 dr$$

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a} \quad (2.32)$$

Para el caso del agua libre, $f(r, D)=r^2/12D$ y la ecuación 2.32 se convierte en:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_2} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\pi \gamma^4 \hbar^2 N_0^j}{2aD} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\pi \gamma^4 \hbar^2 N_0^j}{2a} \frac{1}{kT} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{3\pi^2 \gamma^4 \hbar^2 N_0^j}{kT} \eta \quad (2.33)$$

La presencia de un paramagnético dentro de la muestra provoca una interacción dipolar entre el núcleo en estudio y el electrón no apareado localizado en la estructura del elemento paramagnético (Bloembergen et al, 1948; Solomon, 1955; Koenig y Schillinger II, 1969; Cabal-Mirabal, 2020). Solomon (Solomon, 1955) describió esta interacción de acuerdo a:

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} &= \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r_{N-e}^6} \left[\frac{\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 - \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{3\tau_{C-e}}{1 + \omega_0^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 + \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} \right] \\ \frac{1}{T_2} &= \frac{1}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r_{N-e}^6} \left[4\tau_{C-e} + \frac{\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 - \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{3\tau_{C-e}}{1 + \omega_0^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + \omega_{0S}^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 + \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} \right] \end{aligned} \quad (2.34)$$

Donde el subíndice S se refiere al electrón no apareado en la estructura del elemento paramagnético, r_{N-e} es la distancia entre el núcleo en estudio y el electrón no apareado y τ_{C-e} es el tiempo de correlación efectivo resultante de la combinación de los procesos que modulan la interacción dipolar núcleo-electrón.

Si multiplicamos la ecuación 2.34 por el número de elementos paramagnéticos por cm^3 alrededor del núcleo en estudio (N_e), es posible evaluar las velocidades de relajación magnética nuclear en la unidad de volumen:

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} &= \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^2 \gamma_S^2 \hbar^2 N_e}{r_{N-e}^6} \left[\frac{\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 - \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{3\tau_{C-e}}{1 + \omega_0^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 + \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} \right] \\ \frac{1}{T_2} &= \frac{1}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^2 \gamma_S^2 \hbar^2 N_e}{r_{N-e}^6} \left[4\tau_{C-e} + \frac{\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 - \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{3\tau_{C-e}}{1 + \omega_0^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + \omega_{0S}^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 + \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} \right] \end{aligned} \quad (2.35)$$

Vamos a considerar que las moléculas que contienen el núcleo en estudio y el elemento paramagnético tienen geometría esférica, con centros respectivos en el núcleo en estudio y en el electrón no apareado. Si la molécula que contiene al núcleo en estudio difunde alrededor del elemento paramagnético con un coeficiente de difusión translacional D^* ; dentro de una capa esférica con centro en el electrón no apareado, radio que cambia entre r_{N-e} y $r_{N-e} + dr_{N-e}$ y volumen $4\pi(r_{N-e})^2 dr_{N-e}$; entonces multiplicando la ecuación 2.35 por $4\pi(r_{N-e})^2 dr_{N-e}$ es posible evaluar las velocidades de relajación magnética nuclear en el volumen de la esfera:

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{2\pi \gamma^2 \gamma_S^2 \hbar^2 N_e}{5 r_{N-e}^4} \left[\frac{\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 - \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{3\tau_{C-e}}{1 + \omega_0^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 + \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} \right] \\ \frac{1}{T_2} &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\pi \gamma^2 \gamma_S^2 \hbar^2 N_e}{5 r_{N-e}^4} \left[4\tau_{C-e} + \frac{\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 - \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{3\tau_{C-e}}{1 + \omega_0^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + \omega_{0S}^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 + \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} \right] \end{aligned} \quad (2.36)$$

Finalmente, integrando desde la distancia de máxima aproximación entre las moléculas que contienen el núcleo en estudio y el elemento paramagnético (d) e ∞ , es posible evaluar las velocidades de relajación magnética nuclear en todo el volumen:

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{2\pi \gamma^2 \gamma_S^2 \hbar^2 N_e}{15 d^3} \left[\frac{\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 - \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{3\tau_{C-e}}{1 + \omega_0^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 + \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} \right] \\ \frac{1}{T_2} &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\pi \gamma^2 \gamma_S^2 \hbar^2 N_e}{15 d^3} \left[4\tau_{C-e} + \frac{\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 - \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{3\tau_{C-e}}{1 + \omega_0^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + \omega_{0S}^2 \tau_{C-e}^2} + \frac{6\tau_{C-e}}{1 + (\omega_0 + \omega_{0S})^2 \tau_{C-e}^2} \right] \end{aligned} \quad (2.37)$$

Asumiendo que: $\tau_{C-e} = \tau_S(1 - 3/2(\tau_S/3\tau_D)^{1/2})$, $\omega_0 \ll \omega_{0S}$ y $\omega_0\tau_{C-e} \ll 1$ (donde $\tau_D = d^2/3D^*$ es el tiempo que toma el núcleo en estudio para difundir fuera del rango del campo magnético dipolar del elemento paramagnético), la ecuación 2.37 se transforma en (Koenig y Schillinger II, 1969):

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{2\pi}{15} \frac{\gamma^2 \gamma_S^2 \hbar^2 N_e}{d^3} \left[3\tau_{C-e} + \frac{7\tau_{C-e}}{1 + (\omega_{0S}\tau_{C-e})^2} \right] \\ \frac{1}{T_2} &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\pi}{15} \frac{\gamma^2 \gamma_S^2 \hbar^2 N_e}{d^3} \left[7\tau_{C-e} + \frac{13\tau_{C-e}}{1 + (\omega_{0S}\tau_{C-e})^2} \right] \end{aligned} \quad (2.38)$$

En el límite en el cual las fluctuaciones en los campos magnéticos locales vistas por el núcleo en estudio son principalmente gracias a los cambios de orientación del momento magnético del electrón no pareado (a la velocidad τ_S^{-1}), lo cual significa que los procesos de difusión son mucho más lentos que la relajación magnética longitudinal del electrón no pareado ($\tau_S \ll \tau_D$), entonces la ecuación 2.38 se transforma en:

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{2\pi}{15} \frac{\gamma^2 \gamma_S^2 \hbar^2 N_e}{d^3} \left[3\tau_S + \frac{7\tau_S}{1 + (\omega_{0S}\tau_S)^2} \right] \\ \frac{1}{T_2} &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\pi}{15} \frac{\gamma^2 \gamma_S^2 \hbar^2 N_e}{d^3} \left[7\tau_S + \frac{13\tau_S}{1 + (\omega_{0S}\tau_S)^2} \right] \end{aligned} \quad (2.39)$$

Relajación Magnética Protónica en el agua

Vamos a analizar el caso particular de la relajación magnética protónica en el agua porque este medio constituye un medio de referencia fundamental en los experimentos de resonancia magnética al poderse estimar teóricamente, como veremos, los valores de T_1 e incluso de T_2 a diferentes temperaturas. Por otro lado, la independencia con v_0 permite emplear el agua como referencia en diferentes equipos de Resonancia Magnética con diferentes sistemas magnéticos generadores del campo magnético externo constante. En el caso de la relajación magnética protónica del agua vamos a tener 2 contribuciones fundamentales, una contribución intramolecular y otra intermolecular (Bloembergen et al, 1948):

$$\frac{1}{T_1} = \left(\frac{1}{T_1}\right)_{\text{intra}} + \left(\frac{1}{T_1}\right)_{\text{inter}} \quad (2.40)$$

La contribución intramolecular se refiere fundamentalmente a la interacción dipolar entre los 2 protones constituyentes de la molécula de agua y está modulada por el movimiento de rotación de las moléculas de agua. Por ello las velocidades de relajación magnética protónica estarán dadas por la ecuación 2.20; donde $b = 1.58 \cdot 10^{-10}$ m es la distancia entre los dos protones en la molécula de agua, $\tau_C = (4\pi a^3/3kT) \eta$, a es el radio de la molécula de agua y η la viscosidad dinámica absoluta del agua a la temperatura

absoluta T . Entonces, a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\eta = 0.001003\text{ Kg/ms}$, $a = 1.5 \cdot 10^{-10}\text{ m}$, $k = 1.38 \cdot 10^{-23}\text{ J/K}$ y $(1/T_1)_{\text{intra}} = (1/T_2)_{\text{intra}} = 0.19\text{ s}^{-1}$ (Bloembergen et al, 1948).

En el caso de la componente intermolecular está relacionada con la interacción dipolar entre protones de diferentes moléculas de agua y estará modulada por la difusión de acuerdo a lo establecido en la ecuación 2.33. Si empleamos la ecuación de Stokes-Einstein donde $D = kT/6\pi\eta a$, para $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ $(1/T_1)_{\text{inter}} = (1/T_2)_{\text{inter}} = 0.10\text{ s}^{-1}$ (Bloembergen et al, 1948).

Así, en el agua a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ $(1/T_1) = (1/T_2) = 0.29\text{ s}^{-1}$ y $T_1 = T_2 = 3.4\text{ s}$ (Bloembergen et al, 1948). Sin embargo, la presencia de oxígeno molecular disuelto en el agua, el cual es un paramagnético, reduce el valor de T_1 determinado experimentalmente a $2.3 \pm 0.5\text{ s}$ (Bloembergen et al, 1948).

Relajación Magnética Protónica en disoluciones de proteínas

Las disoluciones acuosas de proteínas (figura 2.4) están compuestas fundamentalmente por las macromoléculas proteicas y agua. El agua puede encontrarse enlazada a las moléculas de proteínas ($\text{H}_2\text{O}^{\text{B}}$) como consecuencia de interacciones electrostáticas con los grupos polares presentes en la estructura macromolecular, fundamentalmente enlaces por puentes de hidrógeno, o moviéndose libremente en la solución ($\text{H}_2\text{O}^{\text{F}}$) (Halle, 2004; Kiihne y Bryant, 2000; Venu et al, 1997; Lores y Cabal, 2005; Lores et al, 2019; Lores et al 2022; Somoano et al, 2022).

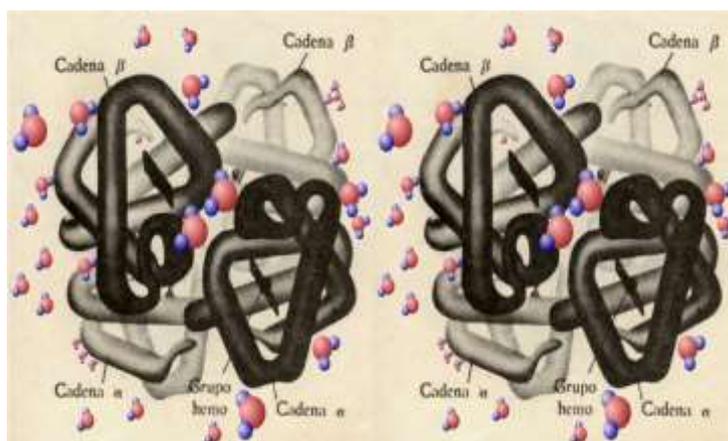


Figura 2.4. Disolución acuosa de proteínas. Se ha tomado como ejemplo la hemoglobina (Hb),
Leyenda: pueden observarse, coloreadas de negro y gris, las cuatro cadenas que conforman la globina en la estructura de la Hb, así como los 4 grupos Hemo. Se observan, además, coloreadas de rojo y azul, el $\text{H}_2\text{O}^{\text{B}}$ y el $\text{H}_2\text{O}^{\text{F}}$

La Relajación Magnética Protónica en disoluciones acuosas de proteínas está determinada por la contribución dominante de los protones de las moléculas de agua y de protones pertenecientes a la estructura de la proteína que se intercambian rápidamente con protones del solvente y son llamados protones lábiles (Halle, 2004; Kiihne y Bryant, 2000; Venu *et al*, 1997; Lores y Cabal, 2005; Lores *et al*, 2019; Lores *et al* 2022; Somoano *et al*, 2022). El resto de los protones de la estructura macromolecular se relajan muy rápidamente, con tiempos de relajación mucho menores que los tiempos muertos de la mayoría de los equipos empleados en los experimentos de relajación magnética, y por ello su contribución es despreciable (Lores y Cabal, 2005). Los dos modelos más socorridos para describir la Relajación Magnética Protónica en disoluciones acuosas de proteínas se describen a continuación:

Modelo de intercambio entre 2 sitios

Este modelo fue planteado por Dazkiewicz y colaboradores en 1963 (Dazkiewicz *et al*, 1963) y considera al $\text{H}_2\text{O}^{\text{B}}$ irrotacionalmente enlazada a la superficie de la proteína, tal que su tiempo de residencia ($\tau_{\text{res}}^{\text{B}}$) es mucho mayor que el tiempo de correlación rotacional de la macromolécula (τ_{R}) y mucho menor que los valores medidos de T_1 y T_2 . De esta forma se establecerá un intercambio rápido de moléculas de agua entre las fases enlazada y libre y las velocidades de relajación longitudinal y transversal ($R_i=1/T_i$, $i=1, 2$) pueden ser calculadas de la siguiente forma (Koenig y Schillinger I, 1969; Koenig y Schillinger II, 1969; Cabal-Mirabal *et al*, 2020; Kiihne y Bryant, 2000; Lores y Cabal, 2005; Lores *et al*, 2019; Lores *et al*, 022):

$$\begin{aligned}
 R_1(\omega_0) &= R_{1w}^{\text{bulk}} + \delta_1 \tau_c \left[\frac{0.2}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{0.8}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right] \\
 \delta_1 &= P_b \frac{3}{2} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{4b^6} \\
 R_2(\omega_0) &= R_{2w}^{\text{bulk}} + \delta_2 \tau_c \left[\frac{3}{5} + \frac{1}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{0.4}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right] \\
 \delta_2 &= P_b \frac{3}{4} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{b^6}
 \end{aligned}
 \tag{2.41}$$

En el sistema de ecuaciones 2.41 R_{1w}^{bulk} y R_{2w}^{bulk} representan las velocidades de relajación magnética protónicas del solvente, γ la razón giromagnética del protón, y $b=1.58 \cdot 10^{-10}$ m es la distancia entre los 2 protones en el interior de la molécula de agua. τ_c es el tiempo de correlación efectivo correspondiente al agua enlazada ($1/\tau_c=1/\tau_{\text{res}}^{\text{B}}+1/\tau_{\text{R}}$) (Halle, 2004). Como el agua ha sido considerada irrotacionalmente enlazada a la proteína ($\tau_{\text{res}}^{\text{B}} \gg \tau_{\text{R}}$), entonces $\tau_c = \tau_{\text{R}}$. $P_b = (n_{ws} N_P) / (N_w (1-V))$ es la fracción de agua enlazada a la macromolécula, siendo una función del número de sitios disponibles para el enlace del agua a cada molécula de proteína (n_{ws}), la concentración molar de proteínas (N_P), la molaridad del agua (N_w) y la fracción de volumen (V) ocupada por las macromoléculas (Koenig y Schillinger I, 1969; Lores y Cabal, 2005). Asumiendo $10 \geq n_{ws}$ como ha sido sugerido por varios autores (Halle, 2004; Koenig y Schillinger I, 1969), P_b está en el orden de 10^{-4} y la fracción de agua libre, que aparece

multiplicando a R_{1w}^{bulk} y R_{2w}^{bulk} en la ecuación 2.41, puede ser considerada igual a 1 (Koenig y Schillinger I, 1969; Lores et al, 2022).

Este modelo, a pesar de haber sido ampliamente utilizado por nuestro grupo de investigación y otros autores (Kiihne y Bryant, 2000; Koenig y Schillinger I, 1969; Lores y Cabal, 2005; Lores et al, 2019), ha sido ampliamente criticado por los pequeños valores de n_{ws} obtenidos a partir de su empleo, su pobre descripción de los resultados experimentales en los experimentos de dispersión y por no tener en cuenta la contribución a la relajación magnética protónica de los protones lábiles y el aporte de la relajación cruzada (Halle, 2004).

Modelo de intercambio de 3 sitios

Este modelo considera que en las disoluciones acuosas de proteínas hay 3 tipos de agua: interna (in), hidratada (hy) y libre (bulk) (Halle, 2004; Venu et al, 1997, Lores et al, 2022, Somoano et al, 2022). El agua interna está extensivamente enlazada a la proteína, a través de enlaces por puentes de hidrógeno, en pequeñas cavidades y profundos orificios ubicados en la estructura macromolecular (Kuntz y Kauzmann, 1974; Denisov y Halle, 1996; Denisov et al, 1996), teniendo tiempos de residencia promedio ($\tau_{\text{res}}^{\text{in}}$) desde 10^{-10} s hasta 10^{-3} s (Kuntz y Kauzmann, 1974; Denisov y Halle, 1996; Denisov et al, 1996; Otting y Wuthrich, 1989; Modig et al, 2004) y tiempos de correlación rotacional ($\tau_{\text{C}}^{\text{in}}$) mayores que 10^{-9} s (Halle y Denisov, 2001; Halle et al, 1999). El agua hidratada está enlazada a la superficie externa de la proteína a través de enlaces por puentes de hidrógeno, teniendo tiempos de residencia promedios ($\tau_{\text{res}}^{\text{hy}}$) y tiempos de correlación rotacional ($\tau_{\text{C}}^{\text{hy}}$) en el rango desde 10^{-10} s hasta 10^{-11} s (Denisov y Halle, 1996; Modig et al, 2004). El agua libre está caracterizada por tiempos de correlación rotacional ($\tau_{\text{C}}^{\text{bulk}}$) en el orden de 10^{-12} s (Koenig y Schillinger I, 1969; Halle, 2004). También se tiene en cuenta la contribución a la relajación de los protones lábiles (p), los cuales son protones que están localizados en residuos específicos en la estructura macromolecular y poseen tiempos de residencia promedios ($\tau_{\text{res}}^{\text{p}}$) menores que el resto de los protones en la estructura proteica. Las moléculas de agua interna e hidratada, así como los protones lábiles, se intercambian rápidamente con el solvente: $\tau_{\text{res}}^{\text{in}} \ll (R_{1w}^{\text{in}})^{-1}$, $\tau_{\text{res}}^{\text{hy}} \ll (R_{1w}^{\text{hy}})^{-1}$, $\tau_{\text{res}}^{\text{p}} \ll R_{1p}^{-1}$. Los perfiles de dispersión de relajación magnética protónica ($^1\text{H MRD}$) en disoluciones acuosas de proteínas pueden ser descritos utilizando el siguiente sistema de ecuaciones (Venu et al, 1997; Lores et al, 2022):

$$\begin{aligned}
R_{1w}(\omega_0) &= R_{1w}^{bulk} + \alpha + \beta \tau_R \left[\frac{0.2}{1 + (\omega_0 \tau_R)^2} + \frac{0.8}{1 + 4(\omega_0 \tau_R)^2} \right] \\
\alpha &= \left(\frac{N_{hy}}{N_T} \right) \left(\langle R_{1w}^{hy} \rangle - R_{1w}^{bulk} \right) + 0.1 \beta_{inter} \tau_R \\
\beta &= \beta_{intra} + 0.9 \beta_{inter} + \beta_p \\
\beta_{intra} &= \frac{1}{N_T} \frac{3}{2} \sum_{\mu} (D_{\mu}^{intra} A_{\mu}^{intra})^2 \\
\beta_{inter} &= \frac{1}{N_T} \sum_{\mu} \sum_i k_i \frac{1}{2} \left[(D_{\mu 1i}^{inter} A_{\mu 1i}^{inter})^2 + (D_{\mu 2i}^{inter} A_{\mu 2i}^{inter})^2 \right] \\
D &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right) \frac{\gamma^2 \hbar}{(r_{H-H})^3} \\
\beta_p &= \frac{[R_{1p}(0) - R_{1p}(\omega_{\alpha})]}{\tau_R} \\
R_{1p}(\omega) &= \frac{1}{2(N_T + N_p)} \sum_p \frac{N_{pk}}{T_{1pk}(\omega) + (\tau_{res}^p)_k}
\end{aligned} \tag{2.42}$$

Donde $\langle R_{1w}^{hy} \rangle$ es el valor medio de la velocidad de relajación magnética protónica longitudinal del agua hidratada. α (caracterizando el plateau de la velocidad de relajación para las altas frecuencias) es originado por las N_{hy} moléculas de agua hidratadas en la superficie de la proteína y β (caracterizando la magnitud de la dispersión) es originado por las N_{in} moléculas de agua interna y los protones lábiles ubicados en la estructura macromolecular. A es un parámetro generalizado para describir el orden orientacional y D es la constante de interacción dipolar. En el sistema de ecuaciones 2.42 μ suma sobre todas las N_{in} moléculas de agua interna, i suma sobre todas las interacciones dipolares intermoleculares con protones en la estructura de la proteína, k suma sobre todos los grupos de protones lábiles y los subíndices 1 y 2 se refieren a los 2 protones en las moléculas de agua interna (Venu et al, 1997; Lores et al, 2022). N_T es el número total de moléculas de agua enlazadas por molécula de proteína ($N_T = N_{in} + N_{hy}$), N_p el número total de protones lábiles y N_{pk} es el número total de protones lábiles en cada grupo tal que $N_p = N_{p1} + N_{p2} + \dots + N_{pk}$. Para interacciones dipolares intermoleculares dentro del cluster de las moléculas de agua interna

$k_i = 3/2 \left(\frac{0.2}{1 + (\omega_0 \tau_R)^2} + \frac{0.8}{1 + 4(\omega_0 \tau_R)^2} \right) / \left(0.1 + \frac{0.3}{1 + (\omega_0 \tau_R)^2} + \frac{0.6}{1 + 4(\omega_0 \tau_R)^2} \right)$ y para interacciones dipolares intermoleculares con los protones de la proteína $k_i = 1$. ω_{α} es una frecuencia de resonancia en el plateau de velocidades de relajación en la zona de altas frecuencias. El sistema de ecuaciones 2.42 es estrictamente válido para pares de núcleos con $I=1/2$ aislados y acoplados a través de una interacción de tipo dipolar. Si $\tau_{res}^{in}, \tau_{res}^p \gg \tau_R$, entonces $\tau_C^{in} = \tau_R$ ($1/\tau_C^{in} = 1/\tau_{res}^{in} + 1/\tau_R$) y $\tau_C^p = \tau_R$ ($1/\tau_C^p = 1/\tau_{res}^p + 1/\tau_R$).

Para tener en cuenta la contribución de la relajación cruzada, se adiciona un término negativo a la primera ecuación del sistema de ecuaciones 2.42 para obtener:

$$R_1(\omega_0) = R_{1w}^{\text{bulk}} + \alpha + \beta\tau_R \left[\frac{0.2}{1 + (\omega_0\tau_R)^2} + \frac{0.8}{1 + 4(\omega_0\tau_R)^2} \right] - \beta_{\text{cross}}\tau_R F_{\text{cross}}(\omega_0\tau_R)$$

$$F_{\text{cross}}(\omega_0\tau_R) = \frac{\left[\frac{1.2}{1 + 4(\omega_0\tau_R)^2} - 0.2 \right]^2}{0.1 + \frac{0.3}{1 + (\omega_0\tau_R)^2} + \frac{0.6}{1 + 4(\omega_0\tau_R)^2}}$$

(2.43)

Aquí $F_{\text{cross}}(\omega_0\tau_R)$ es obtenido para el caso particular de la interacción de los protones del agua enlazada con un solo protón en la estructura macromolecular (Venu et al, 1997; Lores et al, 2022). Casos más generales e inclusivos dan lugar a términos más complejos para describir el aporte de la relajación cruzada, los cuales no poseen soluciones analíticas (Venu et al, 1997). β_{cross} representa la contribución de la relajación cruzada a la magnitud total de la dispersión. Ha sido demostrado, tanto en soluciones diluidas como concentradas de proteínas, que el término correspondiente a la relajación cruzada en la ecuación 2.43 puede ser despreciado (Venu et al, 1997; Lores *et al* 2022).

Un análisis similar al realizado aquí para la relajación magnética protónica longitudinal puede ser hecho para el caso de la relajación transversal (Somoano et al, 2022), donde los valores de α y β serán diferentes.

Capítulo 3: Procedimientos experimentales para determinaciones de Relajación Magnética Nuclear



Giromag 02 modificado, actualización del primer equipo de Relajación Magnética Nuclear construido en Cuba. Centro de Biofísica Médica. Universidad de Oriente. Década de los 90. Siglo XX.

Equipamiento para mediciones de Relajación Magnética Nuclear

El diagrama en bloques básico de un equipo destinado para experimentos de relajación magnética nuclear aparece descrito en la figura 3.1 (Chizick y Cabal, 1983; Lores-Guevara, 2005).

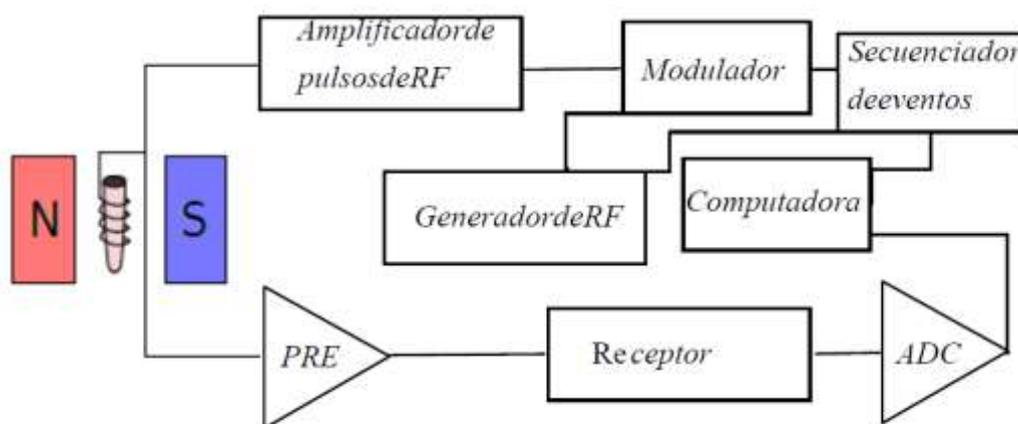


Figura 3.1. Diagrama en bloques de una instalación para experimentos de relajación magnética Nuclear

En la figura 3.1 la computadora permite controlar el experimento a través de un software de propósito específico (Artigas et al, 2007; Portuondo y Artigas, 2007; Artigas et al, 2004) que permite seleccionar y configurar los procedimientos experimentales a emplear para las determinaciones de T_1 y T_2 , los cuales serán descritos en detalle en este capítulo. A través de ella es posible también visualizar y procesar adecuadamente la señal de resonancia magnética nuclear (Artigas et al, 2007), lo cual conduce al cálculo de los tiempos de relajación magnética nuclear. Esta computadora es usualmente una computadora de mesa (Desktop), pero, puede ser también una computadora portátil (Laptop) o incluso un medio de cómputo y procesamiento de propósito específico que se asocie a un medio de visualización que posibilite la observación de la señal de RMN y/o mostrar los valores determinados de T_1 y T_2 .

Dentro o fuera de la computadora, pero siempre controlada por ella, encontraremos una tarjeta secuenciadora de eventos cuya función básica es generar, a partir de las indicaciones que emite el usuario a través del software, la secuencia de pulsos de radiofrecuencia (RF) que será utilizada (Simón et al, 2006; Alberteris et al, 2012). Esto incluye el número y tipo de pulsos, su duración, amplitud, el intervalo de tiempo entre ellos y la secuencia en la cual serán utilizados. A este esquema se le suele llamar Secuencia de Pulsos, Serie de Pulsos o Serie de Impulsos indistintamente. A la salida de

esta tarjeta vamos a tener precisamente una Secuencia de Pulsos que puede ser incluso de 1 solo pulso.

La RF se emplea para proporcionar a la muestra el campo magnético rotante H_1 (capítulo 1). Como Generador de RF se pueden emplear 2 opciones: un cristal de cuarzo o un sintetizador de frecuencias (Sóñora et al, 2006; Sóñora, 2006; Rosada et al, 2006). El empleo de una u otra opción estará relacionado fundamentalmente con las características y el propósito del equipo en cuestión; así, un equipo destinado a trabajar en una frecuencia de resonancia específica puede emplear un cristal de cuarzo, mientras que uno que soporta experimentos en un rango de frecuencias utilizará un sintetizador. El Generador de radiofrecuencias es usualmente controlado desde la computadora, determinando cuando está o no activa la generación de RF. El objetivo de apagar y encender el generador de radiofrecuencias está relacionado con la posibilidad de poder controlar la fase de los pulsos (Fukushima y Roeder, 1981).

La RF que proviene del Generador de RF y los pulsos que se originan en la tarjeta secuenciadora de eventos se mezclan (multiplican) en el modulador (Sóñora, 2005) para obtener a la salida los pulsos de RF. Con el objetivo de alcanzar los valores requeridos de H_1 estos pulsos son amplificados en el amplificador de RF (López, 2006). El Amplificador de RF es usualmente controlado desde la computadora, y a través de la tarjeta secuenciadora de eventos, por un pulso de Gating que determina cuando está o no activa la amplificación de RF. La potencia usualmente requerida en los experimentos de relajación magnética nuclear oscila entre 100 W y 1000 W (Fukushima y Roeder, 1981). Los pulsos a la salida del amplificador de RF se entregan a la bobina, que contiene la muestra en estudio, para obtener la señal de resonancia magnética nuclear.

La muestra contenida en la bobina, y la propia bobina, se encuentran en el interior de un sistema magnético que genera el campo magnético constante H_0 . Este sistema magnético puede ser un electroimán, un imán permanente o un imán superconductor (caso muy especial de electroimán). Emplear electroimanes no superconductores nos permite alcanzar valores de H_0 hasta 0.3 T y puede requerir instalaciones adicionales para el enfriamiento del sistema magnético fundamentalmente a base de circulación de agua. Con el uso de imanes permanentes puede alcanzarse valores de H_0 de hasta 0.35 T, pero debe vigilarse especialmente la deriva con la temperatura propia de estos imanes, es muy buena opción limitar efectivamente su intercambio de calor con el medio. En el caso de los imanes superconductores es posible obtener valores de H_0 superiores a 1.5 T, pero son los más costosos al requerirse su enfriamiento perpetuo con el empleo de refrigerantes como el helio líquido. Para aplicaciones de relajación magnética nuclear los requerimientos de homogeneidad de H_0 son menos exigentes que los necesarios en aplicaciones de imágenes y espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

La bobina en el diagrama puede ser una sola bobina empleada en función de bobina excitadora o transmisora (suministradora de la RF) y receptora de la señal de RMN (López, 2014). Sin embargo; emplear dos bobinas separadas, una excitadora y otra receptora, tiene ventajas como la reducción del tiempo muerto durante la recepción de la señal de resonancia magnética y la posibilidad de incrementar la homogeneidad del campo magnético de RF en el interior de la muestra si la bobina excitadora es mayor que la receptora (Meiboon y Gill, 1958). En el caso de las 2 bobinas separadas, ambas deben estar desacopladas ya que, incluso un pequeño acople, puede inducir corrientes en la bobina receptora sintonizada provocando el deterioro de la homogeneidad del campo de RF. La tabla 3.1 muestra las características principales de bobinas empleadas en experimentos clásicos de relajación magnética nuclear (Meiboon y Gill, 1958; Bloembergen *et al*, 1948).

Tabla 3.1. Características principales de bobinas empleadas en experimentos clásicos de relajación magnética nuclear

Referencia	Tipo	Geometría	Dimensiones	Número de vueltas	Tipo de alambre
Meiboon y Gill 1958	Excitadora ^a	rectangular	4cmx2cm	2	cobre
Meiboon y Gill 1958	Receptora	cilíndrica	Diámetro y longitud 1cm	6	Cobre No. 34
Bloembergen et al 1948	Excitación-recepción	cilíndrica	Diámetro 0.7 cm y longitud 1.5 cm	12	Cobre 18

^a compuesta por 2 secciones separadas 2 cm y ubicadas a ambos lados del tubo que contiene la muestra de forma tal que el lado mayor del rectángulo sea paralelo al eje longitudinal del tubo portamuestra

Si la bobina receptora se ubica en el plano XY del sistema de coordenadas del laboratorio, paralela al eje Y, entonces la rotación de la componente M_Y de la magnetización nuclear (ecuación 1.24, capítulo 1) inducirá en dicha bobina un campo magnético (Bloch, 1946):

$$B_Y = 4\pi M_Y \quad (3.1)$$

Considerando que la bobina receptora posee N_V vueltas que rodean una muestra de sección transversal A, el flujo magnético efectivo a través de la bobina (F) será (Bloch, 1946):

$$F = 4\pi N_V A M_T = 4\pi N_V A \frac{\gamma H_1 T_2}{1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} M_0 \cos \omega_0 t \quad (3.2)$$

Y el voltaje (V) inducido en los terminales de la bobina será:

$$V = -\frac{1}{c} \frac{dF}{dt} = -\frac{1}{c} \frac{d \left(4\pi N_V A \frac{\gamma H_1 T_2}{1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} M_0 \cos \omega_0 t \right)}{dt}$$

$$V = \frac{4\pi N_V A}{c} \frac{\gamma H_1 T_2}{1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} M_0 \omega_0 \sin \omega_0 t \quad (3.3)$$

En la ecuación 3.3 se ha considerado que $\omega = \omega_0$ y que se ha alcanzado el estado base (steady state) donde los términos exponenciales decrecientes que rigen la evolución temporal de M_Y han tendido a cero, así como la influencia de los tiempos de relajación magnética nuclear: T_1 y T_2 . Si sustituimos M_0 por lo establecido en la ecuación 1.10 del capítulo 1:

$$V = -\frac{4\pi N_V A}{c} \frac{H_1 T_2}{1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} \frac{N \gamma^2 \hbar^2 I(I+1)}{3kT_C} \omega_0^2 \sin \omega_0 t \quad (3.4)$$

Donde N es el número de núcleos en la muestra con $I \neq 0$. Es evidente que tenemos como resultado una señal que oscila con una frecuencia ω_0 y cuya amplitud depende básicamente de las características de la bobina (N_V), la muestra (A , T_1 y T_2), el núcleo en estudio (γ , I), los valores de los campos magnético fijo ($\omega_0 = -\gamma H_0$) y rotante (H_1) aplicados y la temperatura de la bobina (T_C). Es importante destacar que, para una muestra determinada (valores determinados de γ , T_1 y T_2), el valor de H_1 debe ser tal que $\gamma^2 H_1^2 T_1 T_2 \ll 1$ para evitar la saturación de la señal descrita en la ecuación 3.4 (Abragam, 1961). La amplitud de esta señal es pequeña (Bloch, 1946), por lo cual se necesita el empleo de un Preamplificador (PRE) de baja figura de ruido inmediatamente después de la bobina para incrementar la misma. En los terminales de la bobina, adicionalmente al voltaje descrito por la ecuación 3.4, se inducirá otro voltaje generado fundamentalmente por la resistencia de la bobina (R) y que también depende de su temperatura (T_C), el cual se conoce como “ruido” (Hoult y Richards, 1976). Para disminuir la contribución del ruido, para incrementar la amplitud de la señal de resonancia magnética más allá del incremento generado en el PRE, y también para separar la envolvente de la señal del resto de la misma (detección) se utiliza un receptor (Hoult y Richards, 1976; Rosada y García, 2006; Rosada et al, 2008). La detección es muy útil en el experimento de relajación magnética nuclear donde, básicamente, empleamos las amplitudes de las señales para la determinación experimental de T_1 y T_2 .

El voltaje de ruido (V_r) generado en el canal de recepción (PRE+Receptor) estará dado por la siguiente ecuación (Hoult y Richards, 1976):

$$V_r = (4kT_c \delta f R)^{\frac{1}{2}} \quad (3.5)$$

Donde δf es el ancho de banda del receptor en Hertz (1/s).

Finalmente, después del receptor, se emplea un Conversor Análogo Digital (ADC) para convertir la señal analógica en digital y entregarla a la computadora para su visualización, procesamiento y el cálculo de T_1 y T_2 .

Procedimientos experimentales para mediciones de Relajación Magnética Nuclear

Inhomogeneidades del campo magnético externo constante (H_0). Evolución temporal de las distintas fracciones de magnetización

El campo magnético externo y constante (H_0) puede ser inhomogéneo, es decir, no tener igual valor en todo el volumen de la muestra en estudio. Así, existirá una función de distribución $f(H_z)$ que representa la fracción de núcleos que sienten un campo magnético de valor H_z (con una desviación $\Delta H_z = H_z - H_0$); la cual estará centrada en H_0 y tendrá un ancho dado por la desviación cuadrática media σ (Carr y Purcell, 1954). Si denotamos $dM(H_z)$ como la fracción de magnetización correspondiente a la fracción de núcleos ubicados en la zona del volumen en estudio donde el campo magnético externo y constante tiene un valor H_z ; entonces su evolución temporal, en los sistemas de coordenadas del laboratorio y rotativo, estará dada por las ecuaciones 3.6 y 3.7 (Carr y Purcell, 1954) respectivamente:

$$\frac{dM(H_z)}{dt} = \gamma dM(H_z) \times H_z \quad (3.6)$$

$$\left(\frac{dM(H_z)}{dt} \right)_{xyz} = \gamma dM(H_z) \times \left(H_z + \frac{\omega}{\gamma} \right) \quad (3.7)$$

En resonancia ($\omega = -\gamma H_0$), si $H_z = H_0$ la fracción de magnetización correspondiente ($dM(H_0)$) permanecerá fija en el sistema de coordenadas rotativas. Sin embargo, el resto de las fracciones de magnetización ($H_z \neq H_0$), en el sistema de coordenadas rotativas, precesarán alrededor de un campo efectivo $H_{ef} = H_z - H_0$ con una frecuencia dada por:

$$\omega_z = \gamma (H_z - H_0) \quad (3.8)$$

Esto significa que la existencia de inhomogeneidades de H_0 conduce a la existencia de una distribución de frecuencias de precesión dentro de la muestra correspondientes a las diferentes fracciones de magnetización presentes en la misma.

Si, además de H_0 , la muestra en estudio es sometida a la acción de un campo magnético variable H_1 (perpendicular a H_0 y rotando a su alrededor con una velocidad angular ω), la evolución temporal de $dM(H_Z)$ será:

$$\begin{aligned} \left(\frac{d\vec{M}(H_z)}{dt}\right)_{XYZ} &= \gamma d\vec{M}(H_z) \times \left(H_z + \frac{\omega}{\gamma} + H_1\right) \\ \left(\frac{d\vec{M}(H_z)}{dt}\right)_{XYZ} &= \gamma d\vec{M}(H_z) \times (H_{eff}) \\ H_{eff} &= \left(H_z + \frac{\omega}{\gamma}\right)k' + H_1 i' \end{aligned} \quad (3.9)$$

En resonancia ($\omega = -\gamma H_0$) $H_{eff} = (H_z - H_0)k' + H_1 i'$. Si $H_1 \gg (H_z - H_0)$, entonces la fracción de magnetización en estudio precesará alrededor de H_1 con una frecuencia $\omega_1 = -\gamma H_1$.

Pulsos de radiofrecuencia

En los experimentos de relajación magnética nuclear de pulsos el campo magnético externo y variable H_1 se entrega a la muestra a través de señales de RF (Hoult y Richards, 1976), limitadas en amplitud y duración, llamadas pulsos de RF (figura 3.2) (Abragam, 1961), siendo los mismos de tiempos de duración (τ_ω) cortos y gran amplitud (A_p). El campo magnético linealmente polarizado obtenido a través de estos pulsos de RF tiene magnitud $2H_1$ y su frecuencia satisface la condición de resonancia ($\omega_{RF} = -\gamma H_0$). Sólo una de las 2 componentes circularmente polarizadas que componen este campo linealmente polarizado, de magnitud H_1 y que rota en fase con la precesión de los momentos magnéticos, es capaz de provocar el cambio de dirección (nutación) de la magnetización. Si tomamos H_1 a lo largo del eje X' del sistema de coordenadas rotativo ($H_1 = H_1 i'$); en resonancia ($\omega = -\gamma H_0$) el campo magnético efectivo que recibe la región de la muestra, donde el valor del campo magnético externo y constante es H_z , será: $H_{eff} = H_1 i' + (H_z - H_0)k'$ y la magnetización correspondiente precesará alrededor de este H_{eff} con una frecuencia $\omega_{eff} = -\gamma H_{eff}$. Si $H_1 \gg \sigma$; y la duración del pulso de RF es tal que el ancho de banda de excitación es mucho mayor que el ancho frecuencial de la distribución $f(H_z)$ ($\tau_\omega \ll 1/\gamma\sigma$); entonces la magnetización precesará alrededor de H_1 con $\omega_1 = -\gamma H_1$. En este caso, todas las fracciones de magnetización precesarán juntas como una sola magnetización.

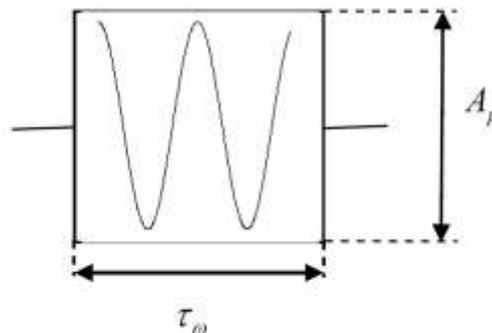


Figura 3.2. Pulso no selectivo de RF de amplitud A_p y duración τ_ω

Durante el tiempo que dura el pulso de RF (τ_w) el ángulo de nutación (θ) estará dado por $\theta = \gamma H_1 \tau_w$. Así pueden existir diferentes ángulos de nutación, pero, los más empleados en los experimentos de relajación magnética nuclear son $\theta = 90^\circ$ y $\theta = 180^\circ$. En concreto; el experimentador puede, dado un determinado núcleo en estudio, optimizar los valores de H_1 y τ_w tal que θ sea igual a 90° o 180° . Como ejemplo de un experimento clásico: S. Meiboon y D. Gill obtuvieron en su experimento de 1958 un pulso de $\theta = 180^\circ$ empleando valores de $H_1 = 0.3$ oersted y $\tau_w = 250 \mu s$ (Meiboon y Gill, 1958).

En una muestra que contiene núcleos con $I \neq 0$, y que ha sido sometida a un campo magnético externo y constante H_0 , se obtendrá al cabo de suficiente tiempo una magnetización nuclear en estado de equilibrio termodinámico M_0 que, en X' , Y' , Z' permanece fija y paralela a H_0 (ver figuras 1.4 A y 3.3 A). Al aplicar un pulso de 90° ($\gamma H_1 \tau_w = \pi/2$, $H_1 = H_1 i'$, $H_1 \ll H_0$, $H_1 \gg \sigma$, $\tau_w \ll 1/\gamma \sigma$, $\omega_{RF} = -\gamma H_0$) M_0 rota hacia la derecha (ecuación 3.9), alrededor de H_1 con frecuencia $\omega_1 = -\gamma H_1$, un ángulo de $\pi/2$ con respecto al eje Z' (Carr y Purcell, 1954; Guevara et al, 2014) y se ubica en el plano $X'Y'$ (ver figura 3.3B). Al retirar el pulso de RF cada fracción de magnetización rotará alrededor de un campo magnético efectivo $H_{eff} = H_Z - H_0$ de acuerdo a la ecuación 3.7 con una frecuencia descrita por la ecuación 3.8 (Carr y Purcell, 1954). La fracción de magnetización correspondiente a $f(H_Z = H_0)$, $dM(H_Z = H_0)$, se mantendrá fija encima del eje Y' (figura 3.3C). Sin embargo, las fracciones de magnetización correspondientes a $f(H_Z \neq H_0)$, $dM(H_Z \neq H_0)$, rotarán alrededor de $H_{eff} = H_Z - H_0$ en sentidos diferentes: $dM(H_Z > H_0)$ en el sentido de las manecillas del reloj y $dM(H_Z < H_0)$ en sentido contrario, formando una especie de abanico que reduce la magnetización resultante en el eje Y' : $M_{Y'}$ (figura 3.3C) (Carr y Purcell, 1954; Guevara et al, 2014).

Si colocamos, de forma conveniente, una bobina (ver figura 3.1) encima del eje Y del sistema de coordenadas del laboratorio, la rotación de la magnetización resultante $M_{Y'}$ alrededor de H_0 , recogida en M_Y , provocará una variación temporal del flujo magnético en su interior que inducirá una fuerza electromotriz capaz de originar una circulación de partículas cargadas que es lo que se conoce como señal de RMN (figura 3.4). Esta señal, conocida como Señal de Inducción Libre (SIL) o “cola”, tiene un máximo inicial y decae en el tiempo siguiendo el siguiente comportamiento temporal de la magnetización neta en Y' :

$$M_{Y'}(t) = M_0 \int f(H_Z) \cos(\gamma(H_Z - H_0)t) dH_Z \quad (3.10)$$

En la ecuación 3.10 se ha considerado que $f(H_Z)$ es simétrica y $M_{X'}(t) = 0$. La forma de la distribución $f(H_Z)$ determinará la forma de la señal inducida. Así, si $f(H_Z)$ tiene forma de una función de error $M_{Y'}(t)$ estará dada por la ecuación 3.11 y si $f(H_Z)$ tiene forma de una función rectangular $M_{Y'}(t)$ estará dada por la ecuación 3.12:

$$M_{Y'}(t) = M_0 \exp\left(-\frac{\gamma^2 \sigma^2}{2} t^2\right) \quad (3.11)$$

$$M_{Y'}(t) = M_0 \left[\frac{\text{sen}(\gamma h t)}{\gamma h t} \right] \quad (3.12)$$

En la ecuación 3.12 h es el ancho de $f(H_z)$ cuando esta tiene forma rectangular. Un sistema magnético inhomogéneo significa una $f(H_z)$ ancha y una $M_{Y'}(t)$ que cae rápidamente. Por el contrario, un sistema magnético homogéneo significa una $f(H_z)$ estrecha y una $M_{Y'}(t)$ que cae lentamente (Carr y Purcell, 1954).

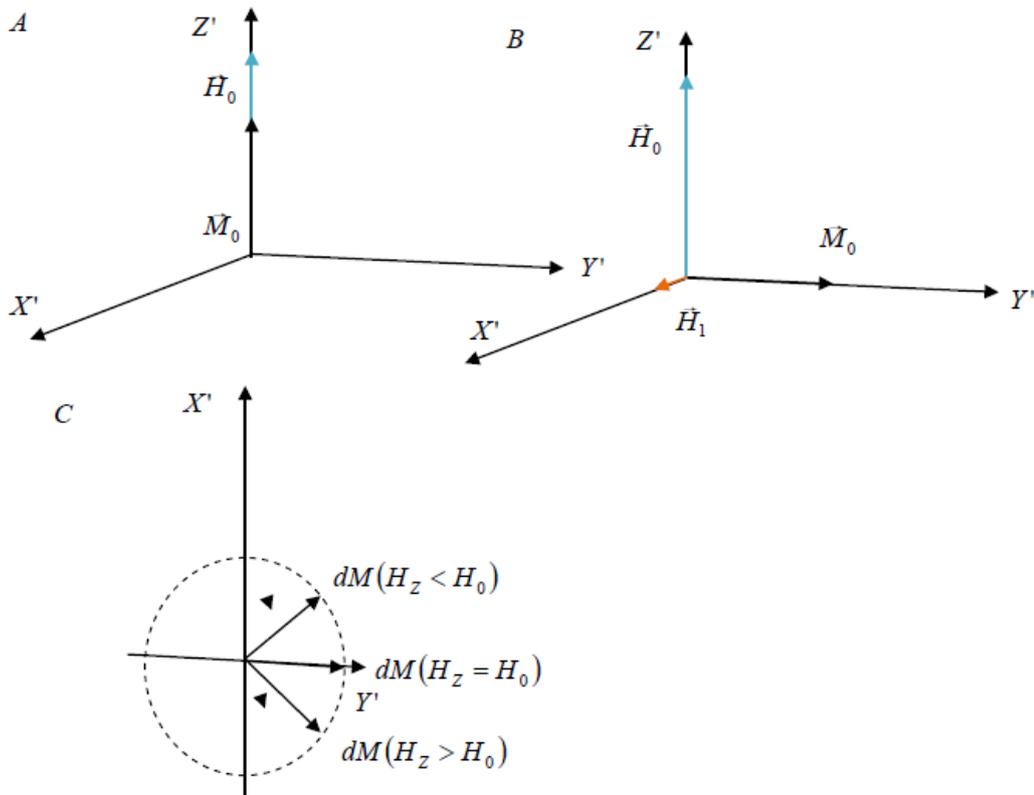


Figura 3.3. Modelo de vectores durante la aplicación de un pulso de 90°, formación de la señal de RMN conocida como “cola” o Señal de Inducción Libre (SIL)

Leyenda: A, establecimiento de una magnetización M_0 en una muestra que se encuentra sometida a un campo magnético externo y constante H_0 . B, Al aplicar un pulso de 90° ($\gamma H_1 \tau_w = \pi/2$, $H_1 = H_1 i'$, $H_1 \ll H_0$, $H_1 \gg \sigma$, $\tau_w \ll 1/\gamma \sigma$, $\omega_{RF} = -\gamma H_0$) M_0 rota hacia la derecha, alrededor de H_1 con frecuencia $\omega_1 = \gamma H_1$, un ángulo de $\pi/2$ con respecto al eje Z' y se ubica en el plano $X'Y'$. C, apertura del abanico. En la figura se ha considerado que $\gamma > 0$ y, por tanto, la rotación de la magnetización alrededor de H_0 se produce en el sentido de rotación de las manecillas del reloj

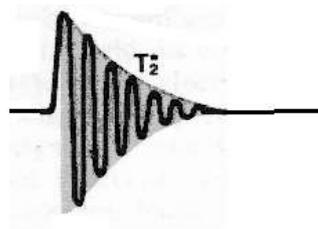


Figura 3.4. Señal de RMN después de un pulso de 90°, conocida como “cola” o Señal de Inducción Libre(SIL)

En el análisis que llevó a la ecuación 3.10 se ha considerado que $T_1=T_2=\infty$. Si la relajación transversal está presente entonces los valores de H_z , $f(H_z)$ y $dM(H_z)$ estarán afectados también por el efecto de los términos A y B de la perturbación dipolar (capítulo 2). Esto lleva a un incremento de σ y h en las ecuaciones 3.11 y 3.12 provocando un decrecimiento de $M_Y(t)$ y de la magnitud del SIL (ecuaciones 3.1-3.3) según un factor $\exp(-t/T_2)$.

Por otro lado, si consideramos la relajación longitudinal, entonces el abanico en $X'Y'$ (figura 3.3C) se “levantará” formando un ángulo con este plano y otro con el plano $X'Z'$. En la figura 3.5 se muestran las proyecciones del “abanico” (δM), una vez “levantado”, en los planos $X'Y'$ (figura 3.5 A) y $X'Z'$ (figura 3.5B). La proyección del abanico en $X'Y'$ da lugar a componentes de la magnetización en Y' , X' y $-X'$; por su parte la proyección del abanico en $X'Z'$ origina componentes de la magnetización en Z' , X' y $-X'$. En la figura 3.5 C se muestran las componentes resultantes de la magnetización en X' , $-X'$ y Z' ; mientras en la figura 3.5 D se muestra la componente resultante en Y' . El levantamiento paulatino y continuo del abanico provoca el decrecimiento de la componente resultante de la magnetización en Y' , así como el crecimiento de la componente resultante en Z' , es decir, reproduce la recuperación longitudinal de la magnetización. Esto provoca un decrecimiento de la magnitud del SIL según un factor $\exp(-t/2T_1)$.

Ambos procesos reducen la amplitud del SIL al disminuir el valor neto de M_Y de acuerdo a (Fukushima y Roeder, 1981):

$$A(t) = A_0 \exp\left(-\frac{1}{T_2^*} t\right)$$

$$\frac{1}{T_2^*} = \gamma \delta H_0 + \frac{1}{T_2} + \frac{1}{2T_1} \quad (3.13)$$

En la ecuación 3.13 δH_0 representa la inhomogeneidad del campo magnético externo y constante (H_0) y el término que lo incluye al efecto de estas inhomogeneidades descrito en las ecuaciones 3.11 y 3.12.

Después de un pulso de 90°, la relación señal a ruido a la salida del canal de recepción (ψ_{rms}) será (Hoult y Richards, 1976):

$$\psi_{rms} = \xi \zeta M_0 \left(\frac{\mu_0 Q \omega_0 V_C}{4 F k T_C \delta F} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.14)$$

Aquí $\xi \approx 1$ depende de la geometría de la bobina receptora y $\zeta = V_S / 2V_C$ (para el caso de una bobina en forma de solenoide) es el coeficiente de llenado, una medida del % del volumen de la bobina (V_C) ocupado por la muestra de volumen V_S . Q es el factor de calidad de la bobina y F la figura de ruido del preamplificador.

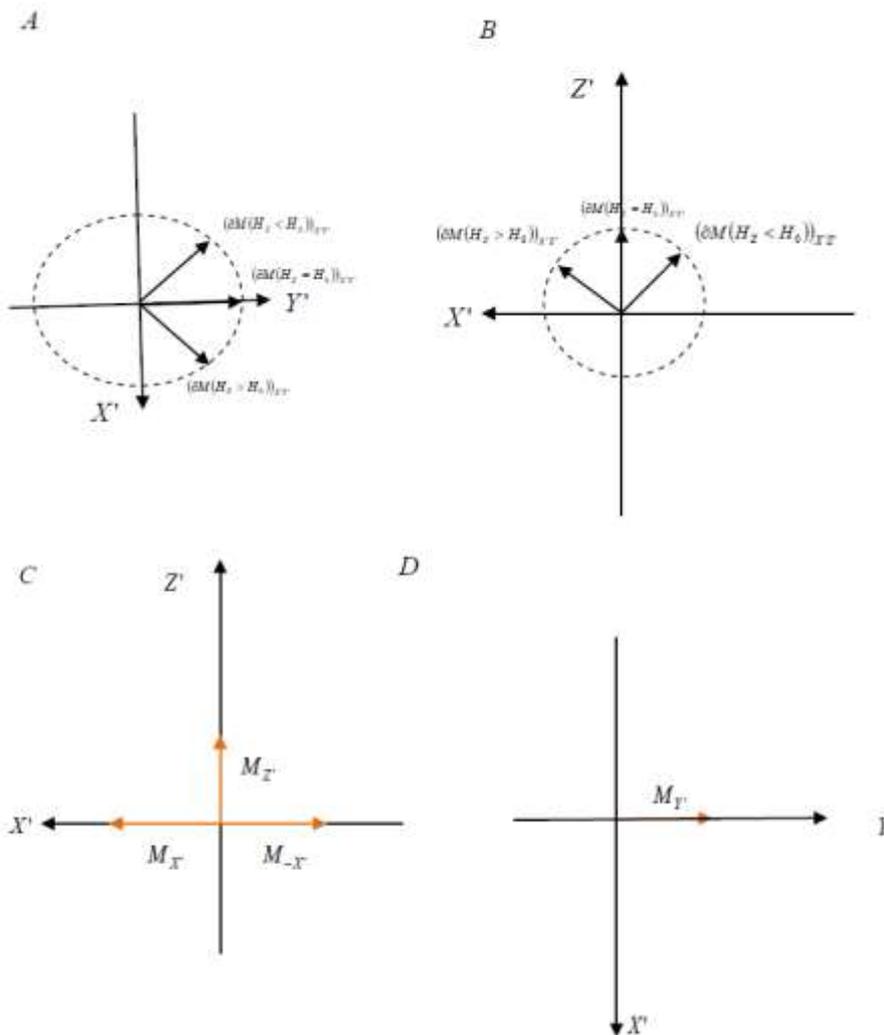


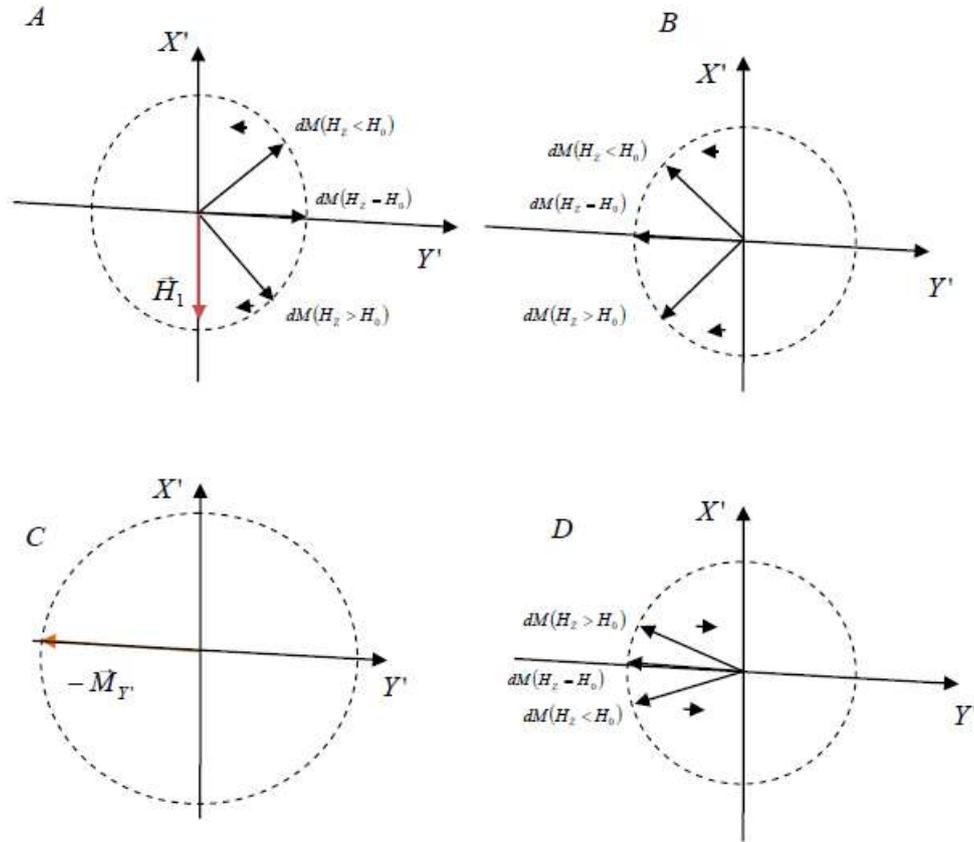
Figura 3.5. Modelo de vectores para la evolución de la magnetización después de un pulso de RF de 90° si se considera la influencia de la relajación longitudinal

Leyenda: Se muestran las proyecciones del “abanico”, una vez “levantado”, en los planos $X'Y'$ (A) y $X'Z'$ (B). También se muestran las componentes resultantes de la magnetización en X' , $-X'$ y Z' (C); así como en Y' (D). En la figura se ha considerado que $\gamma > 0$ y, por tanto, la rotación de la magnetización alrededor de H_0 se produce en el sentido de rotación de las manecillas del reloj.

Método de 90° - τ - 180° para la determinación experimental de T_2

Con la magnetización en estado de equilibrio termodinámico, ubicada en el eje Z' del sistema de coordenadas rotativo (Figura 3.3 A), se aplica a la muestra un pulso de 90° (ver

figura 3.3 B, $\gamma H_1 \tau_w = \pi/2$, $H_I = H_1 i'$, $H_1 \ll H_0$, $H_1 \gg \sigma$, $\tau_w \ll 1/\gamma\sigma$, $\omega_{RF} = -\gamma H_0$; lo cual conduce a la aparición de un SIL (figuras 3.4 y 3.7) (Abragam, 1961; Carr y Purcell, 1954). Al cabo de un intervalo de tiempo (τ) a partir del pulso de RF de 90° , que debe ser mayor que el tiempo de caída del SIL y menor que T_2 , se aplica un pulso de 180° ($\gamma H_1 \tau_w = \pi$, $H_I = H_1 i'$, $H_1 \ll H_0$,



$H_1 \gg \sigma$, $\tau_w \ll 1/\gamma\sigma$, $\omega_{RF} = -\gamma H_0$), ver figura 3.6 A. Como resultado del pulso de 180° (Carr y Purcell, 1954) las fracciones de magnetización permanecen en el plano $X'Y'$ rotando alrededor de H_0 , pero, ahora los diferentes sentidos de rotación de las fracciones $dM(H_z \neq H_0)$ llevan a un cierre del “abanico” (figura 3.6 B). Este cierre del “abanico” lleva hasta el punto en que todas las fracciones de magnetización se superponen en $-Y'$ (Figura 3.6C) para después volver a separarse como consecuencia de los diferentes sentidos de rotación de las fracciones $dM(H_z \neq H_0)$, ver figura 3.6D.

Figura 3.6. Modelo de vectores de la evolución de la magnetización hasta la formación de un ECO en el sistema de coordenadas rotativo

Leyenda: A, después de la apertura del “abanico” obtenida en el plano $X'Y'$ al retirar el pulso de RF de 90° (Figura 3.3C), y al cabo de un intervalo de tiempo τ , se aplica un pulso de 180° . B, la aplicación del pulso de RF de 180° provoca que las fracciones de magnetización permanezcan en el plano $X'Y'$ rotando alrededor de H_0 , pero, ahora con una tendencia a acercarse unas a otras dados sus sentidos de rotación. C, la tendencia paulatina al acercamiento lleva a una superposición de las fracciones de magnetización en $-Y'$ para dar lugar a $-M_Y$. D: finalmente, dados sus sentidos de rotación alrededor de H_0 , las fracciones de magnetización vuelven a separarse. En la figura se ha considerado que $\gamma > 0$ y, por tanto, la rotación de la magnetización alrededor de H_0 se produce en el sentido de rotación de las manecillas del reloj

Después del pulso de 180° hay en el plano X'Y' una magnetización resultante ($-M_Y$: sumatoria de todas las fracciones de magnetización que están rotando alrededor de H_0 en ese plano) cuya rotación alrededor de H_0 provoca una variación de flujo magnético en la bobina receptora (figura 3.1) convenientemente ubicada en el eje Y del sistema de coordenadas del laboratorio; lo cual induce una fuerza electromotriz que causa el movimiento de partículas cargadas y la aparición de una señal de RMN (Carr y Purcell, 1954). Esta señal incrementa su amplitud durante el acercamiento de las diferentes fracciones de magnetización en su rotación alrededor de H_0 , tiene un máximo llamado ECO durante la superposición (exactamente en el instante de tiempo 2τ) y disminuye su amplitud nuevamente cuando las fracciones de magnetización se separan (figura 3.7). Finalmente se espera un tiempo igual a $6T_1$ (conocido como tiempo de repetición o TR) para garantizar que la magnetización regrese al estado de equilibrio termodinámico (figura 3.3A). Si la secuencia de pulsos de RF 90° - τ - 180° -TR se vuelve a repetir de forma sucesiva e incrementando el valor de τ (figura 3.8) se obtiene una disminución en el módulo de la magnetización resultante en el eje -Y' después del pulso de 180° , la cual estará dada por la siguiente ecuación (Carr y Purcell, 1954):

$$M_Y(2\tau) = M_0 \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) \exp\left(-\frac{\gamma^2 G^2 D \tau^2}{3} 2\tau\right) \quad (3.15)$$

En la ecuación 3.15, G es el gradiente de campo magnético que siente la muestra y D es el coeficiente de difusión de las moléculas que contienen a los núcleos en estudio. Dada la relación de proporcionalidad directa entre $-M_Y(2\tau)$ y la amplitud del ECO ($A(2\tau)$), ecuaciones 3.3 y 3.4, puede escribirse sin pérdida de rigor lo siguiente:

$$A(2\tau) = A_0 \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) \exp\left(-\frac{\gamma^2 G^2 D \tau^2}{3} 2\tau\right) \quad (3.16)$$

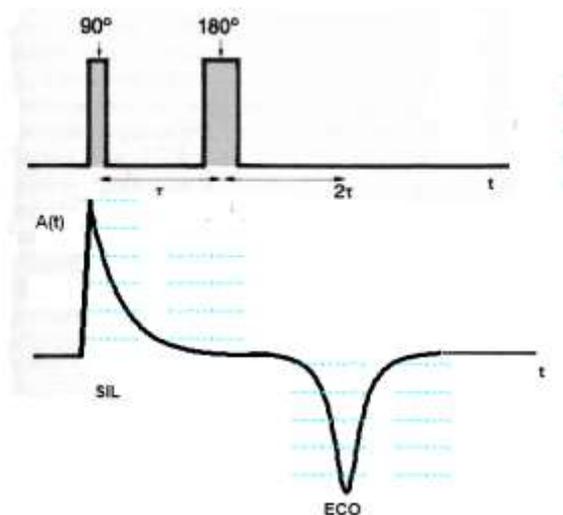


Figura 3.7. SIL y ECO después de la aplicación de una secuencia de pulsos de RF de 90° - τ - 180° . Ambos pulsos tienen igual fase, en este caso ambos se aplican por X'

Durante el empleo de esta secuencia el signo de las señales (SIL y ECO) puede cambiar en función de las fases de los pulsos de 90° y 180° (Fukushima y Roeder, 1981). Este método permite la determinación experimental de T_2 cuando los valores de D , G y τ son tales que $\gamma^2 G^2 D \tau^2 / 3 \ll 1/T_2$ y en este caso se obtendrá una caída exponencial de la amplitud del ECO donde el argumento del exponente depende linealmente de τ (Carr y Purcell, 1954). Por el contrario si $\gamma^2 G^2 D \tau^2 / 3$ no puede despreciarse frente a $1/T_2$ (por ejemplo $\gamma^2 G^2 D \tau^2 / 3 \gg 1/T_2$) no podrá determinarse experimentalmente el valor de T_2 y se obtendrá una caída exponencial de la amplitud del ECO donde el argumento del exponente depende cúbicamente de τ . En el caso del agua, a 25°C y empleando este método, Carr y Purcell (Carr y Purcell, 1954) determinaron que la caída de los ECOS era exponencial con un argumento que dependía cúbicamente de τ , lo cual condujo a un valor “aparente” de $T_2=0.2$ s.

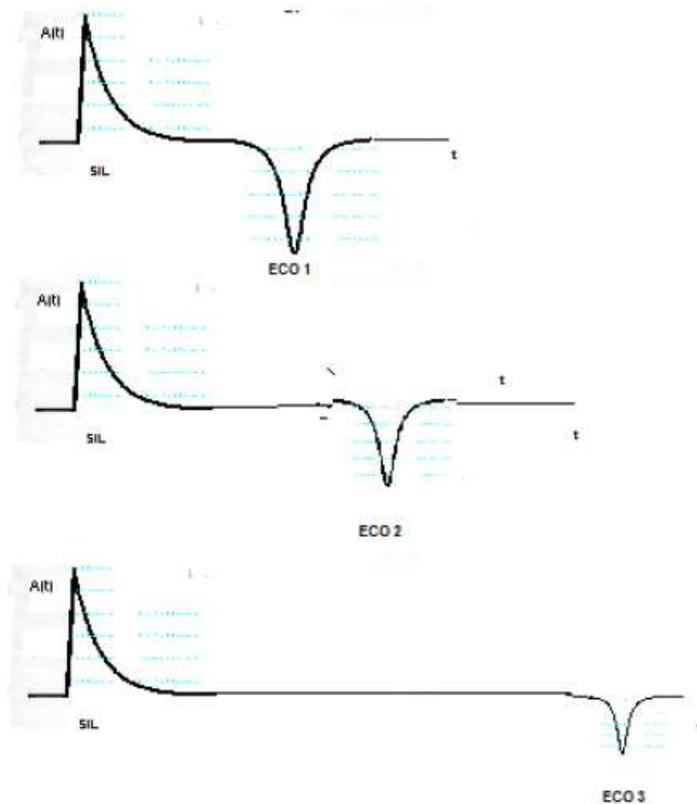


Figura 3.8. Secuencia de pulsos de 90° - τ - 180° -TR para la determinación experimental de T_2 . Se incrementa paulatinamente el valor de τ en cada cluster 90° - τ - 180° y la amplitud del ECO obtenido disminuye según la ecuación 3.16. Cada cluster 90° - τ - 180° está separado por el valor de $TR=6T_1$ del cluster siguiente

Este método es consumidor de tiempo dada la necesidad de esperar un tiempo $TR \sim 6T_1$ después de cada cluster de 90° - τ - 180° (Aragam, 1961). Con el objetivo de disminuir el tiempo de experimento, y la influencia del segundo exponente en las ecuaciones 3.15 y 3.16 (también conocido como término de la difusión), Carr y Purcell propusieron en 1954 el método que se describe a continuación (Carr y Purcell, 1954).

Método de Carr y Purcell para la determinación experimental de T_2

Con la magnetización en estado de equilibrio termodinámico, ubicada en el eje Z' del sistema de coordenadas rotativo (figura 3.3 A), se aplica a la muestra un pulso de 90° ($\gamma H_1 \tau_w = \pi/2$, $H_1 = H_1 i'$, $H_1 \ll H_0$, $H_1 \gg \sigma$, $\tau_w \ll 1/\gamma\sigma$, $\omega_{RF} = -\gamma H_0$); lo cual conduce a la aparición de un SIL (figuras 3.4 y 3.7) (Abragam, 1961; Carr y Purcell, 1954). Al cabo de un intervalo de tiempo (τ) a partir del pulso de RF de 90° , que debe ser mayor que el tiempo de caída del SIL y menor que T_2 , se aplica un pulso de 180° ($\gamma H_1 \tau_w = \pi$, $H_1 = H_1 i'$, $H_1 \ll H_0$, $H_1 \gg \sigma$, $\tau_w \ll 1/\gamma\sigma$, $\omega_{RF} = -\gamma H_0$); lo cual conduce a la aparición de un ECO (figuras 3.7 y 3.8) al cabo del tiempo 2τ (Carr y Purcell, 1954). Si, de forma sucesiva, se aplican a continuación $n-1$ pulsos de 180° ; en los instantes de tiempo 3τ , 5τ , $7\tau \dots (2n-1)\tau$ (donde n es el número total de pulsos de 180° a utilizar en la secuencia); se obtendrán $n-1$ nuevos ECOS en los instantes de tiempo 4τ , 6τ , $8\tau, \dots, 2n\tau$ (figuras 3.9 y 3.10). Los n ECOS obtenidos se corresponden con un valor de M_Y que cambia de signo y su módulo va disminuyendo de acuerdo a la ecuación (Carr y Purcell, 1954):

$$M_Y(2m\tau) = M_0 \exp\left(-\frac{2m\tau}{T_2}\right) \exp\left(-\frac{\gamma^2 G^2 D \tau^2}{3} 2m\tau\right) \quad (3.17)$$

Donde m es el número de orden de cada ECO. Dada la relación de proporcionalidad directa entre $M_Y(2m\tau)$ y la amplitud del ECO ($A(2m\tau)$), ecuaciones 3.3 y 3.4, puede escribirse sin pérdida de rigor lo siguiente:

$$A(2m\tau) = A_0 \exp\left(-\frac{2m\tau}{T_2}\right) \exp\left(-\frac{\gamma^2 G^2 D \tau^2}{3} 2m\tau\right) \quad (3.18)$$

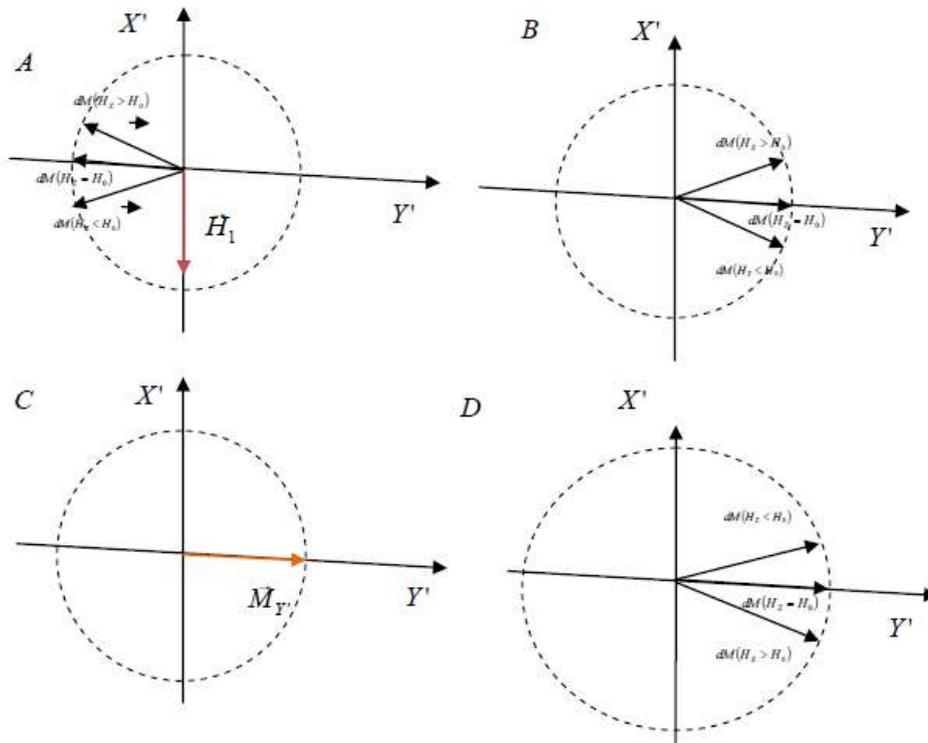


Figura 3.9. Modelo de vectores que muestra la evolución de la magnetización durante la secuencia de pulsos de RF de Carr y Purcell para la determinación experimental de T_2 . La figura es una continuación de la figura 3.6 y muestra la formación del segundo ECO.

Legenda: A, Después de la apertura del abanico que sigue al primer ECO (figura 3.6 D), se aplica un pulso de 180° . B, Como consecuencia del pulso de 180° las fracciones de magnetización se trasladan a los cuadrantes $X'Y'-X'$ y tienden a superponerse dados los diferentes sentidos de rotación de las fracciones de magnetización inducidas en fracciones de volumen donde $H_z \neq H_0$. C, Las fracciones de magnetización se superponen en Y' para generar M_Y que provoca la aparición del segundo ECO. D, Nuevamente se produce la apertura del abanico dados los diferentes sentidos de rotación de las fracciones de magnetización inducidas en fracciones de volumen donde $H_z \neq H_0$. Los pulsos de 90° y 180° tienen igual fase, en este caso ambos se aplican por X' . Se ha asumido que $\gamma > 0$, por lo cual las magnetizaciones rotan en el sentido de las manecillas del reloj

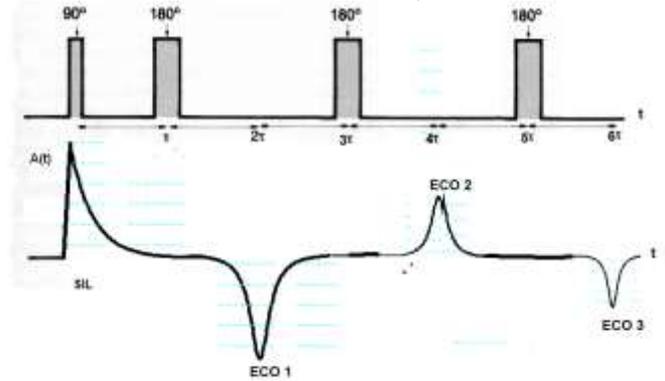


Figura 3.10. Caída de la amplitud de los ECOS durante la secuencia de pulsos de Carr y Purcell para la determinación experimental de T_2 . El valor de la amplitud de los ECOS obtenidos disminuye según la ecuación 3.18

En esta secuencia de pulsos de RF no se espera el valor de TR entre cada ECO, sino que la evolución temporal completa de la amplitud de los n ECOS se obtiene dentro de un intervalo de tiempo menor al T_2 de la muestra (Carr y Purcell, 1954). Por otro lado, los pulsos son coherentes: su dirección con respecto al sistema de coordenadas rotativo es la misma en todos ellos. Los ECOS son el resultado de los máximos en el valor de M_Y , que se obtienen de forma alterna en $-Y'$ y Y' , por ello la fase de cada ECO también se alterna siguiendo este patrón (figura 3.10).

Este método permite reducir en un factor igual a $1/n^2$ el efecto del segundo exponente en las ecuaciones 3.17 y 3.18 o, lo que es lo mismo, el efecto de la difusión en el gradiente de campo magnético (Carr y Purcell, 1954; Meiboom y Gill, 1958). De acuerdo con Carr y Purcell (Carr y Purcell, 1954), con un número suficiente de pulsos de 180° es posible eliminar este efecto, ellos obtuvieron un valor de $T_2 = 2.0$ s para el agua a 25°C y un comportamiento de la caída de los ECOS regido por el primer exponente en la ecuación 3.18. Además, este método posibilita detectar la presencia del fenómeno de convección molecular en la muestra en estudio, en este caso el primer ECO tendrá menor amplitud que el segundo ECO (Carr y Purcell, 1954).

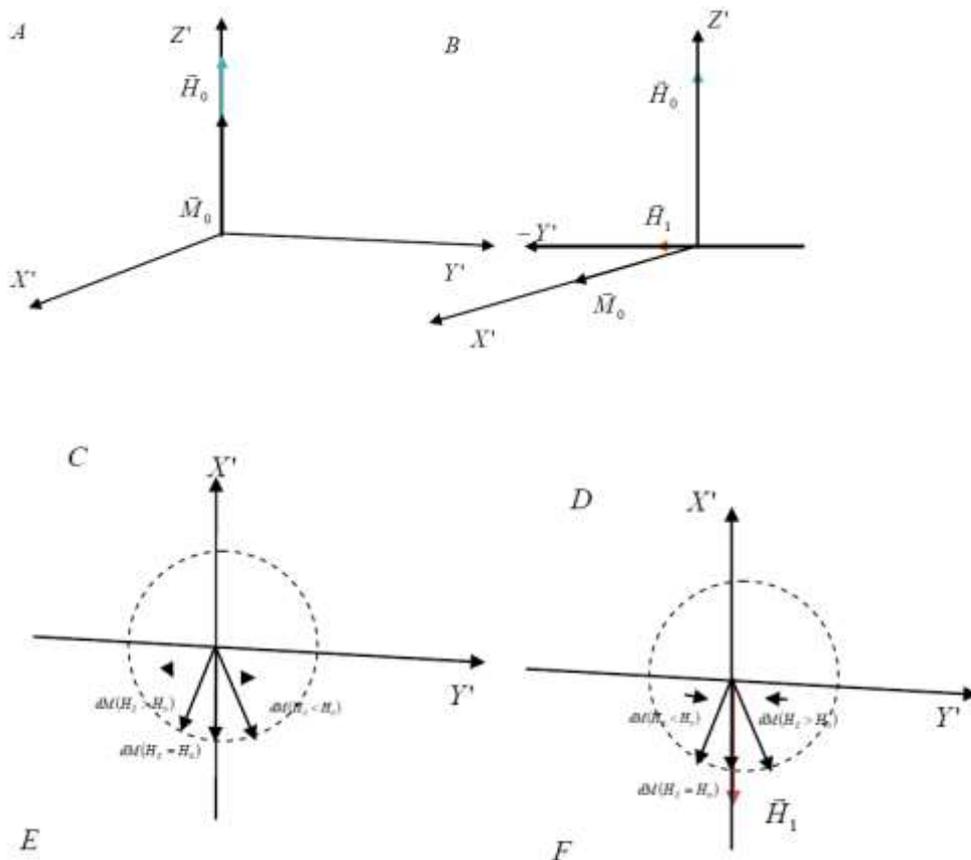
Sin embargo, este método requiere una gran exactitud en el pulso de 180° (Meiboom y Gill, 1958; Abragam, 1961). Si el pulso de 180° es inexacto, esto provoca una disminución “artificial” y acumulativa de M_Y , después de cada pulso de 180° que trae como consecuencia una disminución “artificial” del T_2 medido. Meiboom y Gill

(Meiboom y Gill, 1958) introdujeron en 1958 una corrección para disminuir este efecto indeseado.

Método de Carr, Purcell, Meiboom y Gill para la determinación experimental de T_2

Este método consiste en exactamente la misma secuencia de pulsos de RF descrita en el epígrafe anterior, pero, ahora los pulsos de 90° y 180° están defasados en $\pi/2$ (Meiboom y Gill, 1958). Por ejemplo, para el pulso de 90° : $H_1 = -H_1j'$ y para el pulso de 180° : $H_1 = H_1i'$, ver figura 3.11. La disminución de la amplitud de los ECOS se rige por la ecuación 3.18.

Como resultado de esta secuencia el efecto de la inexactitud del pulso de 180° sobre M_y no es acumulativo, manifestándose en los ECOS impares y siendo corregido en los pares (ver figura 3.11). Además, todos los ECOS van a tener la misma fase (figura 3.12), lo cual puede utilizarse como elemento de control para verificar si los pulsos de 90° y 180° están debidamente defasados en $\pi/2$.



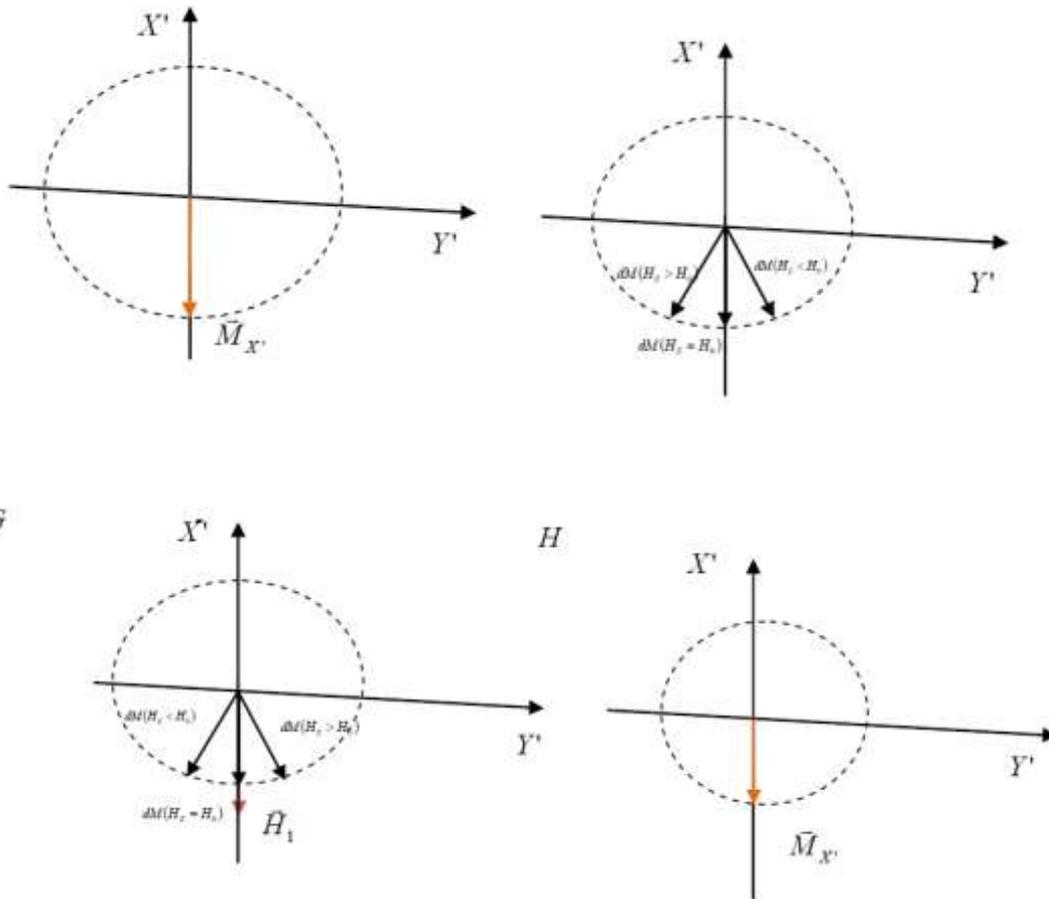


Figura 3.11. Modelo de vectores para la evolución de la magnetización en el sistema de coordenadas rotativo durante la secuencia de pulsos de RF de Carr y Purcell para la determinación experimental de T_2 corregida por Meiboon y Gill
 Leyenda: A, La magnetización se encuentra en su estado de equilibrio termodinámico y es colinial con Z' . B, Se aplica un pulso de 90° por $-Y'$ y la magnetización se ubica en X' . C, Producto de los diferentes sentidos de rotación de las fracciones de magnetización inducidas en fracciones de volumen donde $H_z \neq H_0$ se abre el “abanico” generando la formación de un SIL (figura 3.12). D, Se aplica un pulso de 180° por X' , lo cual conduce a la inversión de las posiciones de las fracciones de magnetización inducidas en fracciones de volumen donde $H_z \neq H_0$ y se cierra el “abanico”. E, Producto del cierre del “abanico” las fracciones de magnetización se superponen para generar $M_{X'}$ y la formación del primer ECO. F, Producto de los diferentes sentidos de rotación de las fracciones de magnetización inducidas en fracciones de volumen donde $H_z \neq H_0$ se vuelve a abrir el “abanico”. G, Se aplica nuevamente un pulso de 180° por X' , lo cual conduce a la inversión de las posiciones de las fracciones de magnetización inducidas en fracciones de volumen donde $H_z \neq H_0$ y se cierra nuevamente el “abanico”. H, Producto del cierre del “abanico” las fracciones de magnetización se superponen para generar $M_{X'}$ y la formación del segundo ECO. A continuación se repite todo, como en los pasos de la F a la H, $n-2$ veces para obtener los ecos deseados. Se ha asumido que $\gamma > 0$, por lo cual las magnetizaciones rotan en el sentido de las manecillas del reloj

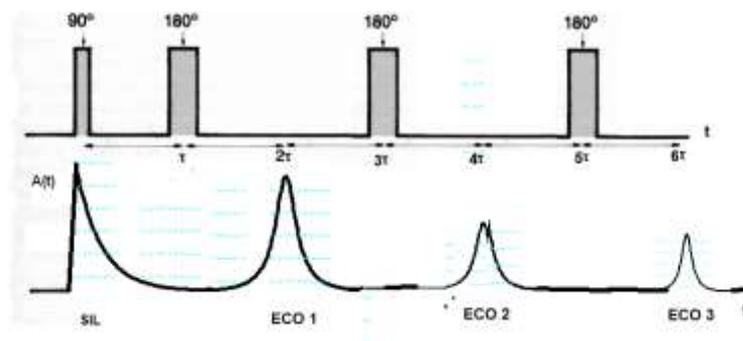


Figura 3.12. Caída de la amplitud de los ECOS durante la secuencia de pulsos de Carr y Purcell para la determinación experimental de T_2 corregida por Meiboon y Gill. La disminución de la amplitud de los ECOS se rige por la ecuación 3.18

Método de Carr y Purcell para la determinación experimental del coeficiente de difusión (D)

Este método parte de aplicar un gradiente de campo magnético conocido (G_a) y de la evaluación experimental de T_2 (Carr y Purcell, 1954; Abragam, 1961). Este valor experimental de T_2 va a estar afectado por la difusión en un gradiente de campo y por ende se toma como un valor aparente o efectivo: $T_{2\text{eff}}$. Se emplea la secuencia de pulsos de 90° - τ - 180° -TR para un número suficiente de diferentes valores de τ . A continuación se construye un gráfico del valor de $\ln(A(2\tau)/A_0)+2\tau/T_{2\text{eff}}$ en función de τ^3 para obtener un comportamiento lineal con pendiente $2\gamma^2 G_a^2 D/3$. Con el valor de esta pendiente se obtiene D según (Carr y Purcell, 1954):

$$D = \frac{3 * \text{Pendiente}}{2\gamma^2 G_a^2} \quad (3.19)$$

G_a puede coincidir o no con el gradiente de campo magnético propio del sistema magnético generador de H_0 (G). Un método utilizado para generar G_a , independiente de G, es emplear 2 conductores largos o 2 espiras circulares, por los cuales circula corriente eléctrica, y que se ubican simétricamente en el interior de la zona útil del sistema magnético generador de H_0 y a ambos lados de la muestra en estudio (Carr y Purcell, 1954). La circulación de la corriente eléctrica en ambos elementos conductores debe realizarse en sentidos contrarios para garantizar que los campos magnéticos generados sean opuestos. En este caso el valor de G_a se puede calcular a partir de la geometría de los elementos conductores empleados para generarlo y el valor de la corriente que circula por ellos como en el caso del experimento original de Carr y Purcell (Carr y Purcell, 1954), pero también pudiera ser determinado experimentalmente.

Para emplear este método deben cumplirse las siguientes condiciones (Carr y Purcell, 1954):

- $T_2^3 \geq 12/\gamma^2 G_a^2 D$, lo cual garantiza que el efecto de la difusión en un gradiente de campo magnético sea lo suficientemente pronunciado.

- G_a debe ser grande, pero, a la vez debe ser tal que se cumpla la condición $H_1 \gg \sigma$. Es decir, debe garantizar que todas las fracciones de magnetización giren alrededor de H_1 durante la aplicación del pulso de RF.

- $G_a > G$ en el caso de que G_a y G sean independientes. Para ello se trata de emplear, en este experimento, un sistema magnético generador de H_0 lo más homogéneo posible.

Las dos fuentes de error principales de este método radican en la evaluación de la pendiente y la determinación del valor de G_a (Carr y Purcell, 1954). En el trabajo

original de Carr y Purcell (Carr y Purcell, 1954) se obtuvo para el agua, a 25°C, un valor de $D = (2.5 \pm 0.3) 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, lo cual concuerda con el valor reportado en la literatura de $D = 2 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$. Para aplicar este método, como en cualquier otro método para determinar difusión, es deseable asegurarse de que el fenómeno de convección molecular no está presente (Carr y Purcell, 1954).

También es posible emplear con estos fines el tren de pulsos creado por Carr y Purcell ($90^\circ - [\tau - 180^\circ]_n$) con un adecuado valor de n que permita considerar el aporte del segundo exponente en la ecuación 3.18. Para ello se realiza el experimento aplicando un valor conocido de G_a y determinando el valor del $T_{2\text{eff}}$ para diferentes valores de τ . Entonces, se grafica $1/T_{2\text{eff}}$ en función de τ^2 para obtener un comportamiento lineal con pendiente $\gamma^2 G_a^2 D/3$. Con el valor de esta pendiente se obtiene D según (Guevara et al, 2014):

$$D = \frac{3 * \text{Pendiente}}{\gamma^2 G_a^2} \quad (3.20)$$

Si se desea emplear el tren de pulsos desarrollado por Carr y Purcell lo más adecuado es introducir la corrección de Meiboon y Gill para evitar pérdidas artificiales de la magnetización transversal motivadas por inexactitudes de los pulsos de 180° .

Métodos experimentales para la determinación de T_1

Las 2 secuencias de pulsos de RF más populares para la determinación experimental de T_1 son la de Saturación-recuperación ($90^\circ - \tau - 90^\circ - \text{TR}$) y la de inversión-recuperación ($180^\circ - \tau - 90^\circ - \text{TR}$) (Fukushima y Roeder, 1981). En ambas secuencias el primer pulso prepara al sistema de spines y el segundo permite seguir la evolución de la magnetización longitudinal (M_Z) después de transcurrido un período de tiempo τ entre ambos pulsos.

En la secuencia de pulsos de inversión-recuperación (Fukushima y Roeder, 1981), con la magnetización en estado de equilibrio termodinámico y ubicada en el eje Z' del sistema de coordenadas rotativo, se aplica a la muestra un pulso de RF de 180° ($\gamma H_1 \tau_w = \pi$, $H_I = H_1 i'$, $H_1 \gg \sigma$, $\tau_w \ll 1/\gamma \sigma$, $\omega_{RF} = -\gamma H_0$); lo cual conduce a ubicar dicha magnetización en un plano perpendicular al plano donde se encuentra la bobina receptora (XY) y, por ende, a la ausencia de señal en la misma (figura 3.13) (Carr y Purcell, 1954; Fukushima y Roeder, 1981; Lores-Guevara, 2005). A continuación se espera un intervalo de tiempo (τ), que debe ser menor que T_1 y durante el cual la magnetización tiende a recuperarse o regresar hacia su posición inicial en el estado de equilibrio termodinámico, para aplicar un pulso de 90° ($\gamma H_1 \tau_w = \pi/2$, $H_I = H_1 i'$, $H_1 \gg \sigma$, $\tau_w \ll 1/\gamma \sigma$, $\omega_{RF} = -\gamma H_0$); lo cual coloca la magnetización en el plano $X'Y'$ del sistema de coordenadas rotativo provocando la aparición de un SIL (ver figura 3.4). Seguidamente se espera un tiempo igual a TR para garantizar que la magnetización se

ubique en Z' como al inicio del experimento. Si repetimos esta secuencia (180° - τ - 90° -TR) un número suficiente de veces, incrementando el valor de τ en cada ocasión, la amplitud máxima del SIL obtenido después del pulso de 90° (figura 3.13) obedecerá la siguiente ley (Fukushima y Roeder, 1981):

$$A(\tau) = A_0 \left(1 - 2 \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \right) \quad (3.21)$$

Donde A_0 es el valor inicial de la amplitud máxima del SIL.

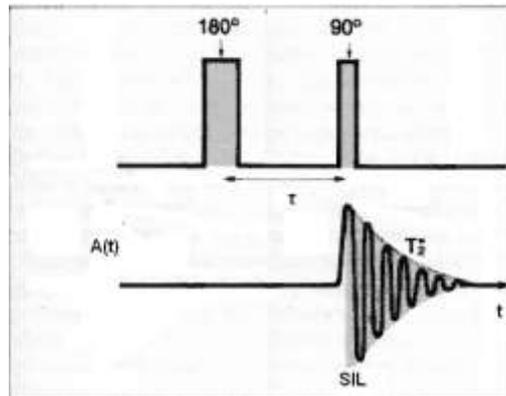


Figura 3.13. Representación esquemática de la secuencia de pulsos de RF de Inversión-recuperación. Puede observarse ausencia de señal después del pulso de 180° y la aparición del SIL después del pulso de 90° . La amplitud del SIL varía con τ según la ecuación 3.21

En la secuencia de pulsos de saturación-recuperación (Fukushima y Roeder, 1981), con la magnetización en estado de equilibrio termodinámico y ubicada en el eje Z' del sistema de coordenadas rotativo, se aplica a la muestra un pulso de RF de 90° ($\gamma H_1 \tau_w = \pi/2$, $H_1 = H_1 i'$, $H_1 \gg \sigma$, $\tau_w \ll 1/\gamma \sigma$, $\omega_{RF} = -\gamma H_0$); lo cual conduce a ubicar dicha magnetización en el plano $X'Y'$ del sistema de coordenadas rotativo provocando la aparición de un SIL (ver figura 3.14) (Hahn, 1950; Carr y Purcell, 1954; Fukushima y Roeder, 1981; Lores-Guevara, 2005). A continuación se espera un intervalo de tiempo (τ), que debe ser menor que T_1 y durante el cual la magnetización tiende a recuperarse o regresar hacia su posición inicial en el estado de equilibrio termodinámico, para aplicar un pulso de RF de 90° ($\gamma H_1 \tau_w = \pi/2$, $H_1 = H_1 i'$, $H_1 \gg \sigma$, $\tau_w \ll 1/\gamma \sigma$, $\omega_{RF} = -\gamma H_0$); lo cual coloca nuevamente la magnetización en el plano $X'Y'$ del sistema de coordenadas rotativo provocando la aparición de un segundo SIL (ver Figura 3.14). Seguidamente se espera un tiempo igual a TR para garantizar que la magnetización se ubique en Z' como al inicio del experimento. Si repetimos esta secuencia (90° - τ - 90° -TR) un número suficiente de veces, incrementando el valor de τ en cada ocasión, la amplitud máxima del segundo SIL (figura 3.14) obedecerá la siguiente ley (Fukushima y Roeder, 1981):

$$A(\tau) = A_0 \left(1 - \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \right) \quad (3.22)$$

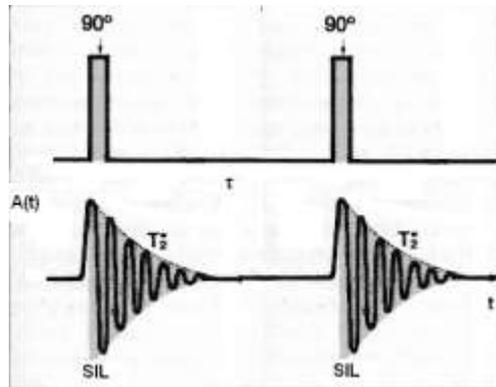


Figura 3.14. Representación esquemática de la secuencia de pulsos de RF de Saturación-recuperación. Puede observarse la aparición de un SIL después de cada pulso de 90°. La amplitud del segundo SIL varía con τ según la ecuación 3.22

La determinación de T_1 puede realizarse, a partir de las ecuaciones 3.21 y 3.22, mediante 3 opciones (Fukushima y Roeder, 1981):

1- Determinar, para cada valor de τ , los valores de $A(\tau)$ y A_0 para después graficar, en un gráfico semilogarítmico, la cantidad $1 - A(\tau)/A_0$ en función de τ de acuerdo a las ecuaciones 3.23 (inversión-recuperación) y 3.24 (saturación-recuperación):

$$1 - \frac{A(\tau)}{A_0} = 2 \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \quad (3.23)$$

$$1 - \frac{A(\tau)}{A_0} = \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \quad (3.24)$$

2- Determinar, para cada valor de τ , los valores de $A(\tau)$ y A_0 y graficar, en un gráfico semilogarítmico, la cantidad $A_0 - A(\tau)$ en función de τ de acuerdo a las ecuaciones 3.25 (inversión-recuperación) y 3.26 (saturación-recuperación):

$$A_0 - A(\tau) = 2A_0 \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \quad (3.25)$$

$$A_0 - A(\tau) = A_0 \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \quad (3.26)$$

La diferencia práctica entre las opciones 1 y 2 es que cualquier subestimación de la línea base en la señal se cancela para la opción 2 (ecuaciones 3.25 y 3.26) y así estos

errores no conducen a una aparente no exponencialidad de los datos experimentales (Fukushima y Roeder, 1981). Por el contrario, en la opción 1 este efecto si está presente.

En ambas opciones es muy importante, como puede apreciarse, la determinación de A_0 ya que los errores en la determinación de A_0 influyen tanto como aquellos que se cometen en la determinación de $A(\tau)$. Por ende, A_0 debe ser medido tantas veces como $A(\tau)$ (Fukushima y Roeder, 1981). En la secuencia de pulsos de RF de Saturación-recuperación un esquema de trabajo común es $90^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ\text{-TR}$, donde $TR=7T_1$ (Fukushima y Roeder, 1981). En este esquema se deben visualizar ambas señales de inducción libre, tomando A_0 y $A(\tau)$ como las amplitudes máximas del primer y segundo SIL respectivamente. Esto permite determinar A_0 tantas veces como $A(\tau)$ y, además, anula o reduce cualquier deriva de la electrónica durante la medición. No podemos emplear un esquema similar, para determinar A_0 , en la secuencia de pulsos de inversión-recuperación ya que carecemos de señal después del pulso de preparación. Sin embargo, podemos emplear un esquema de 3 pulsos de RF en el cual empleamos inicialmente un pulso de 90° que nos permita determinar A_0 ; para después esperar un intervalo de tiempo igual a TR y, a continuación, utilizar la conocida secuencia $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ para determinar T_1 (Fukushima y Roeder, 1981). La determinación experimental simultánea de A_0 y $A(\tau)$, a través de estos esquemas, conduce a un incremento en el tiempo de experimento.

Una tercera opción es no determinar el valor de A_0 previamente a la determinación de T_1 (Fukushima y Roeder, 1981). Esto es, para cada valor de τ , determinar $A(\tau)$ mediante la amplitud máxima del SIL después del segundo pulso y graficarlo en función de τ para después ajustar este comportamiento a las ecuaciones 3.21 o 3.22 (según corresponda) mediante un medio de cómputo. Esta opción permite reducir el tiempo de experimento, sin embargo, como la primera también estará afectada por los errores en la estimación de la línea base y/o de la presencia de derivas en la electrónica.

En el caso de la secuencia de pulsos de RF de inversión-recuperación el valor de T_1 puede ser determinado mediante la evaluación del valor de τ (τ_0) para el cual la amplitud del SIL se anula (método del paso por cero):

$$T_1 = \frac{\tau_0}{\ln 2} \quad (3.27)$$

En el método de inversión-recuperación los procesos de difusión y convección molecular pueden ser ignorados, sin embargo, el valor de TR debe ser estrictamente respetado en la secuencia (Carr y Purcell, 1954). En el caso de ambas secuencias de

pulso una ligera variación del ángulo de nutación (θ) no afecta la determinación de T_1 (Fukushima y Roeder, 1981).

La secuencia de pulsos de RF de 180° - τ - 90° es muy popular por tener el doble del rango dinámico de la secuencia 90° - τ - 90° (Fukushima y Roeder, 1981). Sin embargo, esta última tiene 2 ventajas fundamentales sobre la primera:

-Para la misma geometría de la bobina receptora y el mismo amplificador de RF el ancho de banda frecuencial del pulso de preparación (primer pulso) es el doble. Lo cual permite, para una línea de RMN ancha, una descripción más exacta y adecuada de la forma y la intensidad de la línea; especialmente si la magnitud de H_1 está limitada debido a la presencia de una muestra de grandes dimensiones y/o un amplificador de RF de baja potencia de salida.

-Es posible emplear pequeños valores de τ , mientras que en la secuencia 180° - τ - 90° se requiere que τ tome valores iguales a varias veces T_1 . Lo anterior la convierte en más eficiente, especialmente si $T_1 > T_2$.

Ambas secuencias de pulsos se caracterizan, en cualquiera de sus variantes, por tener un tiempo total de ejecución elevado. Con el objetivo de reducir el tiempo total de ejecución se han diseñado esquemas multipulso para la determinación de T_1 (Fukushima y Roeder, 1981). Por ejemplo, es posible utilizar una secuencia consistente en N pulsos de RF de 90° separados, cada uno, por un intervalo de tiempo τ (Fukushima y Roeder, 1981; Freeman y Hill, 1971). Si se parte inicialmente de una magnetización en estado de equilibrio termodinámico la amplitud máxima del SIL que se obtiene después de cada pulso puede ser descrita por la ecuación 3.22.

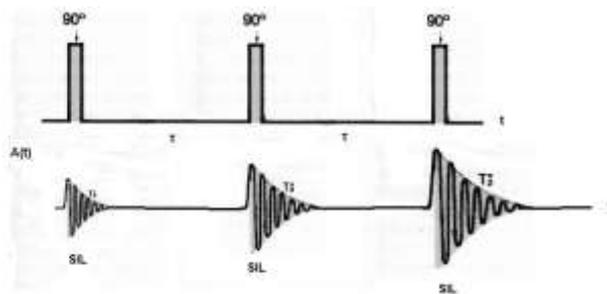


Figura 3.15. Representación esquemática de un tren de pulsos de RF ($N=3$) de 90° empleado para reducir el tiempo total de ejecución durante la determinación experimental de T_1 . Puede observarse la aparición de un SIL después de cada pulso de 90° cuya amplitud varía con τ según la ecuación 3.22

Esta secuencia de pulsos demanda alta potencia de salida del amplificador de RF en muestras con pequeños valores de T_1 como es el caso de los sólidos. En general es posible emplear un tren de N pulsos iguales, que inducen ángulos de nutación arbitrarios θ , separados por intervalos de tiempo τ , y se obtendrá un SIL después de

cada pulso cuya amplitud máxima evolucionará temporalmente según la ecuación (Fukushima y Roeder, 1981):

$$A(t) = A_0 \left[\frac{\left(1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)\right) \operatorname{sen} \theta}{1 - \cos \theta \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)} \right] \quad (3.28)$$

Como puede verse, si $\theta=90^\circ$, estamos en el caso del tren de pulsos esquematizado en la figura 3.15 y la ecuación 3.28 se reduce a la 3.22. Con este tren de pulsos con valor arbitrario de θ es posible determinar experimentalmente, de forma simultánea, los valores de T_1 y θ en el mismo experimento (Fukushima y Roeder, 1981). Otras secuencias multipulso pueden ser implementadas a partir de las secuencias de inversión-recuperación y saturación-recuperación (Canet et al, 1975, Fukushima y Roeder, 1981).

Consejos prácticos a tener en cuenta durante el experimento de Relajación Magnética Nuclear

Este epígrafe pretende remarcar un conjunto de elementos que deben considerarse y comprobarse de forma previa y durante el experimento de relajación magnética nuclear, entre ellos los siguientes:

Debemos asegurarnos de que realmente estamos empleando pulsos de RF de 90° y 180° . Para ello seleccionamos una secuencia de pulsos de RF contentiva de un solo pulso ($\omega_{RF} = \gamma H_0$) y ajustamos los valores de A_p y τ_w (figura 3.2) de forma tal que la amplitud del SIL obtenido sea máxima. Hay equipos que permiten ajustar simultáneamente A_p y τ_w , otros solamente τ_w . En todo caso un esquema puede ser fijar A_p y variar τ_w como se muestra en la figura 3.16 para una muestra de agua a 20°C en un sistema magnético con $H_0 = 0.095\text{ T}$ y sintonizando los protones como núcleos en estudio. A partir de los resultados de este experimento es claro que el máximo del SIL se obtiene para $\tau_w = 5\ \mu\text{s}$. De esta manera este sería el valor de τ_w para el pulso de 90° y para el de 180° $\tau_w = 10\ \mu\text{s}$.

Con el valor de $\tau_w = 5\ \mu\text{s}$, para un pulso de RF de 90° , podemos calcular el módulo de H_1 empleando la ecuación:

$$\begin{aligned} \theta &= \gamma H_1 \tau_w \\ H_1 &= \frac{\theta}{\gamma \tau_w} = \frac{\frac{\pi}{2}}{2.678 \cdot 10^8 \frac{\text{rad}}{\text{sT}} \times 5 \cdot 10^{-6} \text{s}} = \frac{\pi}{13.39} \cdot 10^{-2} \text{T} \\ H_1 &= 0.12 \cdot 10^{-2} \text{T} = 0.0012 \text{T} \end{aligned} \quad (3.29)$$

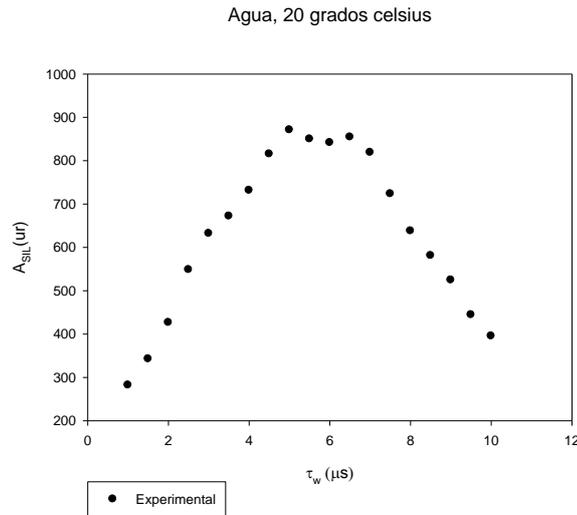


Figura 3.16. Amplitud del SIL en función del ancho del pulso de RF en una muestra de agua a 20°C con $H_0 = 0.095$ T y sintonizando los protones como núcleos en estudio

El valor de $H_1 = 0.0012$ T obtenido en la ecuación 3.29 es mucho menor que el módulo del campo magnético externo y constante aplicado ($H_0 = 0.095$ T, $H_1 \ll H_0$). Esta es una premisa fundamental que debe cumplirse y en la cual se basa el hecho de que la ecuación que refleja la evolución temporal de la magnetización en el sistema de coordenadas del laboratorio tenga una solución concreta (Bloch, 1946).

Por otro lado, debe determinarse el ancho de la distribución que caracteriza las inhomogeneidades de H_0 : σ , lo cual puede ser hecho realizando una transformada de Fourier al SIL y determinando el ancho frecuencial de la línea ($\Delta f = \Delta\omega_0/2\pi$) para posteriormente calcular $\sigma = 2\pi\Delta f/\gamma$. En este caso $\sigma = 7 \cdot 10^{-5}$ T, con lo cual se cumple que $H_1 \gg \sigma$, es decir, todas las fracciones de magnetización en el interior de la muestra rotan alrededor de H_1 con $\omega_1 = \gamma H_1$ durante la aplicación del pulso de RF. Además, también se cumple que el ancho frecuencial de excitación del pulso de RF abarca todas las fracciones de magnetización presentes en la muestra: $\tau_w \ll 1/\gamma\sigma$.

También es necesario evaluar la existencia de un gradiente de H_0 que pueda afectar las mediciones de T_2 . Para ello podemos aplicar los métodos descritos anteriormente (Determinación de D por el método de Carr y Purcell) en el estudio de una muestra de agua a 20°C ($D = 2.022 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$). La figura 3.17 muestra el resultado de un estudio como este en un sistema magnético permanente de 0.095 T utilizando la secuencia de pulsos de RF de Carr y Purcell modificada por Meiboom y Gill. A partir de los resultados mostrados en esta figura $G = 0.060$ T/m, lo cual significa que los valores de T_2 determinados empleando este sistema magnético para muestras como el agua, o con

un valor similar de D , van a estar afectados por la difusión en este gradiente de campo magnético resultando en un $T_{2\text{eff}}$ y no en el valor de T_2 .

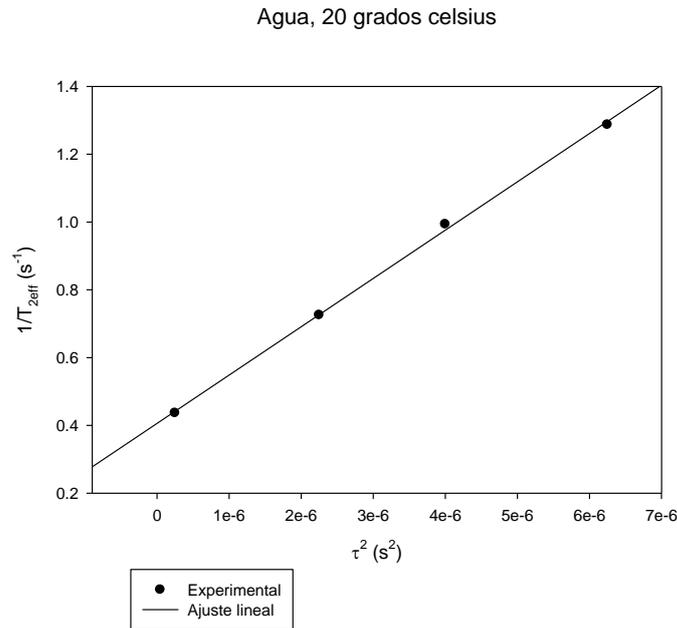


Figura 3.17. Valores de $1/T_{2\text{eff}}$ en función de τ^2 en una muestra de agua a 20°C ($D= 2.022 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) para $H_0= 0.095 \text{ T}$ y sintonizando los protones como núcleos en estudio

Para proceder a realizar las determinaciones de T_1 y T_2 es necesario seleccionar la secuencia de pulsos de RF a emplear de acuerdo a las características de la muestra en estudio, el tipo de experimento a realizar y las potencialidades tecnológicas del equipamiento disponible.

Es muy bueno disponer de una muestra de referencia para la cual, en determinadas condiciones experimentales, se conozcan los valores de los parámetros a determinar: usualmente T_1 y T_2 y en ocasiones D . El agua es una buena opción, pues conocemos que $T_1=T_2$ y que ambos tiempos de relajación son independientes de la frecuencia de resonancia, esto último permite comparar determinaciones realizadas en equipos con diferente H_0 . Además, en el agua, $T_1= 2.3\pm 0.5 \text{ s}$ y $D= 2.022 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ a 20°C.

En el caso del agua; si se emplean protones como núcleos en estudio, en una instalación experimental como la utilizada de ejemplo ($H_0= 0.095 \text{ T}$, $G= 0.060 \text{ T/m}$, $H_1= 0.0012 \text{ T}$, $\tau_w(\pi/2)= 5 \mu\text{s}$, $\tau_w(\pi)= 10 \mu\text{s}$) y en un experimento para la determinación del valor de T_2 ; es recomendable emplear la secuencia de pulsos de RF de Carr y Purcell modificada por Meiboon y Gill. Aunque, contrario a lo expresado por Carr y Purcell (Carr y Purcell, 1954), no es posible eliminar completamente el aporte de la difusión en un gradiente de campo magnético, si se consigue reducir significativamente el mismo y obtener valores de T_2 cuyo valor promedio es 2.4 s, lo cual coincide con lo reportado por Bloembergen, Purcell y Pound en similares condiciones experimentales

(Bloembergen et al, 1948). Para estas determinaciones experimentales $\tau = 800 \mu\text{s}$, $TR = 12 \text{ s}$, el número de ECOS fue de 15000 y se realizaron 32 promediaciones por determinación.

Para el caso de las determinaciones de T_1 la secuencia de pulsos de RF más adecuada sería la de saturación-recuperación ya que es más eficiente que la de inversión-recuperación. Esto es importante dado el valor de $TR = 12 \text{ s}$ que es necesario utilizar, y el valor de $T_1 = 2.3 \pm 0.5 \text{ s}$ (20°C) propio del agua, lo que provoca que la recuperación de la magnetización longitudinal (ecuaciones 3.21 y 3.22), y la propia descripción de la misma, sea muy lenta incrementando considerablemente el tiempo de experimento. Adicionalmente, pudiera ser útil, para reducir este tiempo de experimento, emplear el tren de pulsos presentado en la figura 3.15.

De forma similar debe procederse en otro experimento, con otra muestra y otra instalación experimental.

Capítulo 4: Aplicaciones médicas de la Relajación Magnética Protónica en disoluciones acuosas de proteínas, células y tejidos



Giromag 04. Segunda generación de equipos de Relajación Magnética Nuclear construida en el Centro de Biofísica Médica de la Universidad de Oriente. Primera década del siglo XXI.

Relajación Magnética Protónica durante la polimerización de la Hemoglobina S

Anemia Drepanocítica y polimerización de la Hemoglobina S

La Anemia Drepanocítica (AD), también conocida como Anemia de Hematíes Falciformes (AHF) o Sicklemlia, es un serio desorden sanguíneo que causa dolor agudo, anemia severa, infecciones y oclusiones vasculares y que puede provocar daño orgánico generalizado y la muerte (Gravitz y Pincock, 2014; Lores et al, 2019; Serjeant et al, 2018; Piel et al, 2017; Parise y Berliner, 2016; Ayala et al, 2016; Obeagu et al, 2015). La AD es una enfermedad genética que existe prácticamente en todos los países como una consecuencia de los procesos históricos de migración. Estimados sugieren que cada año aproximadamente 300 000 niños nacen con AHF, lo cual se incrementará hasta 400 000 para el 2050 principalmente en países como: Nigeria, República Democrática del Congo y la India (Piel et al, 2017). La prevalencia de esta enfermedad es alta a través de grandes áreas en África subsahariana, el mediterráneo, el medio oriente y la India.

La AD es una enfermedad de origen genético en la cual el ácido glutámico ha sido sustituido por valina en la posición 6 de las 2 cadenas β de la estructura de la hemoglobina (Hb) (Lores et al, 2019; Ajjack et al, 2014). Esto causa la aparición de una Hb estructuralmente anormal, conocida como hemoglobina S (HbS), la cual representa el mayor porcentaje de proteínas en el interior de los glóbulos rojos (RBC) de pacientes con AD. Bajo condiciones de desoxigenación la HbS polimeriza formando largas fibras y micro dominios estructurales inhomogéneos, gracias a lo cual los RBC cambian su forma y se tornan rígidos (Lores et al, 2019; Lores y Cabal, 2005). Estos cambios en las propiedades físicas de los eritrocitos provocan oclusiones en los vasos capilares, causando daño celular y tisular y dando origen a crisis de dolor intensas que constituyen la principal causa de hospitalización en estos pacientes (Fernández et al, 2009). Desde su descubrimiento hasta la actualidad esta enfermedad ha tenido 2 retos básicos: la insuficiente cantidad de opciones terapéuticas disponibles para su tratamiento (Piel et al, 2017; Eaton y Bunn, 2017; Archer et al, 2015) y la necesidad de contar con parámetros cuantitativos que permitan complementar la evaluación clínica del paciente, en especial durante la crisis vasooclusiva (Fernández et al, 2009). En ambos casos la solución está necesariamente vinculada al desarrollo de métodos experimentales que puedan caracterizar y cuantificar apropiadamente los procesos moleculares, celulares y tisulares que gobiernan la fisiopatología de la enfermedad.

Diferentes procesos como: la adhesividad celular anormal de los eritrocitos y la contribución de otras células sanguíneas han sido considerados para explicar la fisiopatología de la AD o para encontrar opciones de tratamiento (Parise y Berliner,

2016), sin embargo, la polimerización de la HbS sigue siendo considerada el proceso molecular fundamental causante de la enfermedad y el blanco fundamental de los esfuerzos para el desarrollo de una cura o paliativo (Eaton y Bunn, 2017).

La cinética de polimerización de la HbS se ha explicado a partir del modelo de doble nucleación (Ivanova et al, 2000; Eaton y Hofrichter, 1990; Ferrone et al, 1985), ver figura 4.1, según el cual son dos los caminos para la formación de los polímeros de HbS:

-La Nucleación homogénea: que consiste en la agregación de monómeros de HbS entre si hasta la formación de un polímero.

-La Nucleación heterogénea: que consiste en la asociación de nuevos monómeros de HbS a la superficie de núcleos moleculares mayores, incluyendo los polímeros ya formados.

Ambos caminos coexisten y su efectividad relativa cambia a medida que transcurre el proceso. La polimerización consta de tres etapas: un Inicio caracterizado por agregaciones moleculares reversibles, la Polimerización irreversible de las moléculas de HbS a partir de la formación del núcleo crítico y la Terminación que incluye el crecimiento y alineación de los polímeros ya formados.

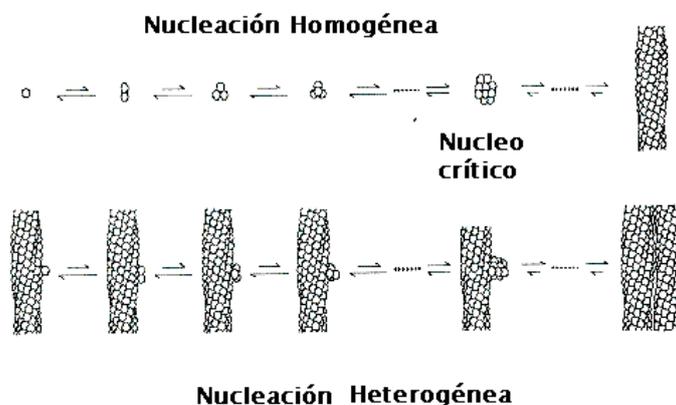


Figura 4.1. Modelo de nucleación Homogénea y heterogénea que describe el proceso de polimerización de la HbS

Según el modelo de doble nucleación la variación temporal de las concentraciones de polímeros (C_p) y monómeros de deoxiHbS en solución (C) pueden ser descritas de la siguiente forma (Ferrone et al, 1985):

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{k_+ \gamma \gamma_i}{\gamma_{i+1}} C C_i + k_+ \gamma C C_j \quad (4.1)$$

$$-\frac{dC}{dt} = (k_+ \gamma C - k_-) C_p \quad (4.2)$$

Donde K_+ es la velocidad de adición de monómeros de deoxiHbS (HbS desoxigenada) a los núcleos críticos o a los polímeros, y K_- es la velocidad de disociación de monómeros de los polímeros. Ambas velocidades son independientes de la concentración y γ , γ_{i^*} y γ_{i^*+1} son los coeficientes de actividad química que representan las interacciones monómero-monómero, núcleo crítico-núcleo crítico y monómero-núcleo crítico respectivamente. C_{i^*} y C_{j^*} son las concentraciones de núcleos críticos homogéneos (i) y heterogéneos (j). La ecuación 4.2 evalúa la velocidad de tránsito de monómeros de deoxiHbS de la solución a los polímeros, y parte del hecho de que la polimerización es mayor que la despolimerización (Ferrone et al, 1985).

En la ecuación 4.1 el primer término de la suma representa el proceso de nucleación homogénea y el segundo la nucleación heterogénea. En la ecuación 4.2 el primer término representa el ingreso de monómeros a los polímeros y el segundo el proceso de la despolimerización.

Este modelo explica la mayoría de las observaciones experimentales sobre la cinética de polimerización de la HbS (Ferrone et al, 1985), entre ellas, la existencia de un tiempo de demora (td), conocido como el tiempo al cabo del cual se desencadena irreversiblemente la agregación molecular.

Como resultado de interacciones entre los polímeros ya formados, o entre éstos y los monómeros en solución, tiene lugar un proceso de cristalización que origina la formación de dominios (micro dominios estructurales inhomogéneos) con concentraciones diferentes de polímeros y monómeros de HbS; donde, además, las orientaciones de las fibras son diferentes de una zona a otra (Lores y Cabal, 2005; Archer et al, 2015; Eaton y Hofrichter, 1990; Ferrone et al, 1985; Ivanova et al, 2000).

Relajación Magnética Protónica en disoluciones acuosas de hemoglobina durante la polimerización de la HbS

Métodos experimentales empleados

Las muestras de Hb fueron obtenidas a partir de sangre total venosa empleando centrifugación, decantación y ciclos de congelación-descongelación (Lores et al, 2019; Lores y Cabal, 2005; Fernández et al, 2009; Somoano et al, 2022; Cabrales et al. 2008; Fernández et al, 2005; Lores et al, 2014; Lores et al, 2006; Lores et al, 2022). En el caso específico de la Hb deuterada, los RBC utilizados fueron incubados previamente con Buffer Fosfato Salino (PBS) deuterado (PBS preparado con agua deuterada) durante 2 h y después lavados 3 veces también con PBS deuterado (Cabrales et al, 2008). En los experimentos realizados

para evaluar el efecto del Glutati3n Reducido (GSH) y el Dalcetrapib (dal) sobre la polimerizaci3n de la HbS (Somoano et al, 2022) la Hb fue mezclada con estos compuestos para obtener concentraciones finales de 4 mM/l y 102.7 μ M/l respectivamente. En los estudios dise1ados para evaluar el efecto terap3utico de la Vainillina (Fern3ndez et al, 2005) los pacientes consumieron 1 g diario del compuesto y las muestras de Hb fueron obtenidas como fue descrito arriba.

Las determinaciones de T_1 y T_2 durante la cin3tica de polimerizaci3n de la HbS (Lores y Cabal, 2005) fueron realizadas utilizando la primera instalaci3n cubana de relajaci3n magn3tica nuclear: el Giromag 02 (4.42 MHz para protones) y con el empleo de las secuencias de pulsos de radiofrecuencia de $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ y $90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$ respectivamente. En el caso del estudio de la HbS deuterada se realizaron, en el mismo experimento, determinaciones de T_2 del prot3n y el deuterio variando el campo magn3tico externo y constante aplicado a la muestra (Cabrales et al, 2008).

Los estudios de dispersi3n de T_1 fueron realizados, utilizando la secuencia de pulsos de $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ en un relax3metro de campo ciclado (Stelar FFC 2000 Spinmaster) trabajando en el rango entre 20 KHz y 10 MHz (Lores et al, 2022). Mediciones adicionales fueron realizadas a 20 MHz y 60 MHz empleando las instalaciones Mq20 y Mq60 (Minispec, BRUKER), donde tambi3n se determin3 T_2 empleando la secuencia de pulsos de Carr-Purcell-Meiboon-Gill (CPMG).

Resultados

Los estudios de T_1 y T_2 (Lores et al, 2019; Lores y Cabal, 2005; Cabal et al, 2018) permitieron monitorear la cin3tica de polimerizaci3n de la HbS en muestras de Hb de concentraci3n intraeritrocitaria (figura 4.2, tabla 4.1). En el caso de la Hb mayoritaria del adulto sano (HbA) se observ3 una disminuci3n ligera, por encima del error experimental, de ambos tiempos de relajaci3n. Sin embargo, en la HbS, se present3 un comportamiento temporal sigmoidal con tres regiones: la (I) y la (III) donde la efectividad de la relajaci3n es pr3cticamente constante; y la (II) en la cual T_1 y T_2 disminuyen 1.29 ± 0.09 y 2.38 ± 0.48 veces respectivamente. Ambos tiempos de relajaci3n comienzan a variar significativamente a partir del t_d (Lores et al, 2019; Lores y Cabal, 2005; Fern3ndez et al, 2009; Fern3ndez et al, 2005; Cabal et al, 2018).

Tabla 4.1. Valores de T_1/T_2 , τ_R y η_u en muestras de HbA y durante la polimerizaci3n de la HbS

Par3metro	HbA	HbS Regi3n I	HbS Regi3n II	HbS Regi3n III
T_1/T_2	2.3 ± 0.2	2.54 ± 0.4	$2.54 \pm 0.4 \leq$ $T_1/T_2 \leq 6.0 \pm 2.5$	6.0 ± 2.5

$\tau_R \times 10^{-8}$ (s)	5.1 ± 0.13	5.0 ± 0.11	$5.0 \pm 0.11 \leq \tau_R \leq 9.8 \pm 0.22$	9.8 ± 0.22
η_μ (mPa s)	2.06 ± 0.1	2.06 ± 0.1	$2.06 \pm 0.1 \leq \eta_\mu \leq 3.79 \pm 0.19$	3.79 ± 0.19

Las 3 regiones observadas en los comportamientos de T_1 y T_2 durante la cinética de polimerización de la HbS (figura 4.2) se corresponden con las 3 etapas de este proceso. La región I se corresponde con la nucleación, donde las agregaciones moleculares son reversibles, la II con el desarrollo irreversible de la polimerización, y la III con la alineación y crecimiento de los polímeros (formación de micro dominios estructurales inhomogéneos) (Lores et al, 2019; Lores y Cabal, 2005; Cabal et al, 2018). El comportamiento de T_2 coincide con lo obtenido previamente por otros investigadores (Waterman y Cottam, 1976; Shibata et al, 1977; Zipp et al, 1976), pero, el comportamiento de T_1 es totalmente novedoso. Por primera vez se logra describir el comportamiento de este parámetro durante la cinética de aglutinación de la HbS, previamente solo se habían realizado reportes puntuales de valores de T_1 antes y después de la desoxigenación de la Hb (Zipp et al, 1976; Cottam et al 1974). Aún así, la magnitud de la variación de T_1 (1.29 ± 0.09) durante la etapa de gelificación (II) es inferior a la de T_2 (2.38 ± 0.48); sin embargo, el comportamiento de T_1 permite observar las 3 etapas y, sobre todo, determinar el td.

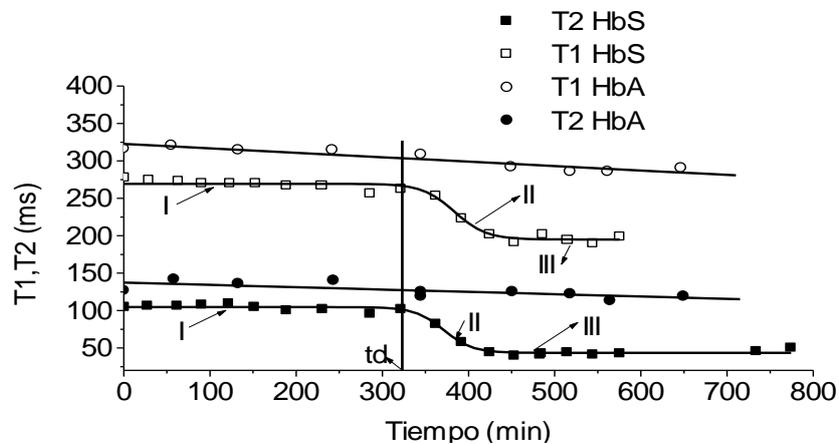


Figura 4.2. Comportamiento temporal típico de T_1 (T_1) y T_2 (T_2) en muestras de HbA y HbS con concentración intraeritrocitaria y a 36°C

Leyenda: Los trazos continuos representan los ajustes lineal y sigmoidal correspondientes a las muestras de HbA y HbS respectivamente. En la HbS la región I se corresponde con la nucleación, donde las agregaciones moleculares son reversibles, la II con el desarrollo irreversible de la polimerización, y la III con la formación de micro dominios estructurales inhomogéneos. En el caso de la HbS T_1 y T_2 varían 1.37 y 2.4 veces respectivamente desde la región I a la III

Los experimentos de dispersión de T_1 (figura 4.3) mostraron que un modelo de intercambio de agua entre 3 sitios; con 2 poblaciones diferentes de agua en el término de dispersión e intercambio de protones lábiles con el solvente; es la mejor opción para

describir la relajación magnética protónica en disoluciones acuosas de Hb (Lores et al, 2022; Somoano et al, 2022):

$$\frac{1}{T_1}(\omega_0) = R_{1w}^{bulk} + \alpha + \sum_{i=1}^2 \left(\beta_i \tau_{ci}^b \left[\frac{0.2}{1 + (\omega_0 \tau_{ci}^b)^2} + \frac{0.8}{1 + 4(\omega_0 \tau_{ci}^b)^2} \right] \right) \quad (4.3)$$

$$\frac{1}{T_2}(\omega_0) = R_{2w}^{bulk} + \alpha' + \sum_{i=1}^2 \left(\beta_i' \left[\frac{3}{5} \tau_{ci}^b + \frac{\tau_{ci}^b}{1 + (\omega_0 \tau_{ci}^b)^2} + \frac{0.4 \tau_{ci}^b}{1 + 4(\omega_0 \tau_{ci}^b)^2} \right] \right) \quad (4.4)$$

Aquí R_{1w}^{bulk} y R_{2w}^{bulk} son las velocidades de relajación magnética de los protones del solvente. α y α' están relacionadas con la relajación magnética de los protones de las moléculas de agua enlazadas a la superficie de la Hb (agua hidratada). β y β' están relacionadas con la relajación magnética de los protones de las moléculas de agua fuertemente enlazadas a la Hb en cavidades internas y orificios profundos ubicados en la estructura macromolecular (agua interna), así como con la relajación magnética de los protones lábiles. El subíndice i toma valores 1 y 2 para representar las 2 poblaciones de agua interna. Los protones lábiles son aquellos, ubicados en la estructura macromolecular, con un tiempo de vida medio en este estado que les permite intercambiarse rápidamente con el solvente (Lores et al, 2022).

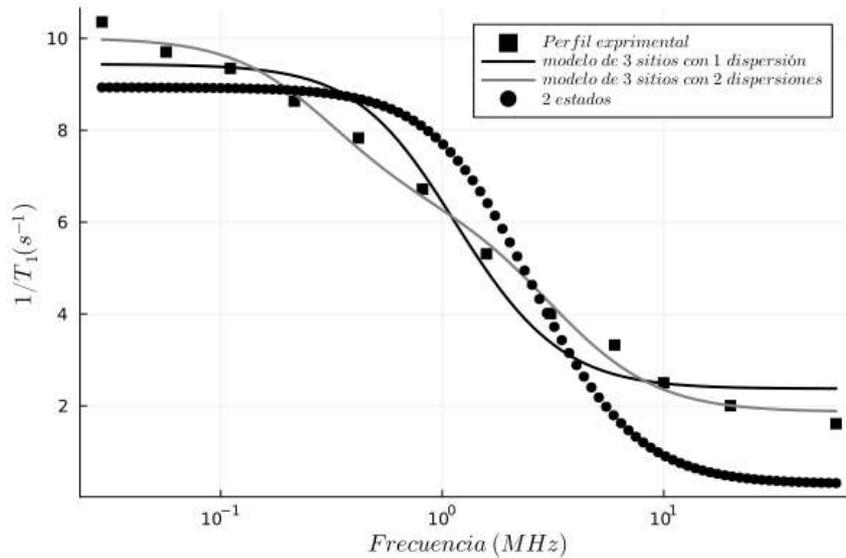


Figura 4.3. Perfil de dispersión de T_1 típico en muestras de HbA y HbS de concentración intraeritrocitaria. El perfil ha sido ajustado empleando un modelo de intercambio de agua entre 2 sitios y un modelo de intercambio de agua entre 3 sitios con 1 y 2 dispersiones

Los estudios de dispersión de T_1 confirman la propuesta de un modelo de intercambio de moléculas de agua entre 3 sitios utilizada previamente (Lores et al, 2019; Zipp et al, 1976; Cottam et al, 1974; Eaton et al, 1976; Cottam y Waterman, 1976; Thompson et al, 1975) y también la mejoran sustancialmente al proponer 2 poblaciones diferentes de moléculas de agua interna contribuyendo a la relajación magnética protónica. Una

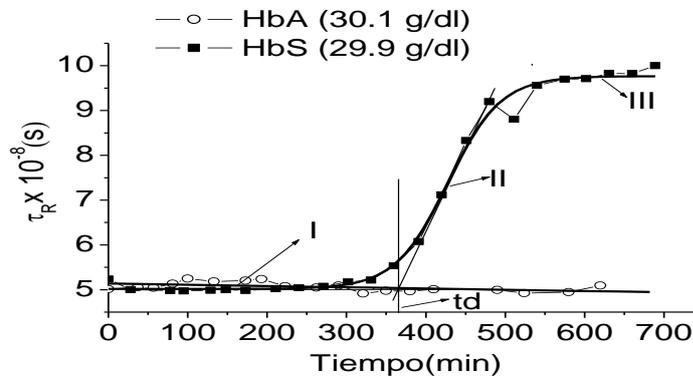
población con valores de τ_{C1}^b en el rango entre $14 \cdot 10^{-8}$ s y $32 \cdot 10^{-8}$ s y otra con valores de τ_{C2}^b en el rango entre $1 \cdot 10^{-8}$ s y $2 \cdot 10^{-8}$ s (Lores et al, 2022). τ_{C1}^b y τ_{C2}^b pueden determinarse como sigue (Lores et al, 2019; Halle, 2004):

$$\frac{1}{\tau_{ci}^b} = \frac{1}{\tau_{resi}^b} + \frac{1}{\tau_R} \quad (4.5)$$

Donde τ_{res}^b es el tiempo de residencia e i toma valores 1 y 2 para identificar a las 2 poblaciones de agua interna. τ_{C1}^b se corresponde con las predicciones teóricas del tiempo de correlación rotacional de la Hb (τ_R) de acuerdo a los modelos de Mooney y Debye, y con el caso en el cual $\tau_{res1}^b \gg \tau_R$ y $\tau_{C1}^b = \tau_R$. Por su parte τ_{C2}^b se corresponde con los casos en los cuales τ_{res2}^b es mucho menor o comparable con τ_R (Lores et al, 2022).

El comportamiento de τ_R durante la polimerización de la HbS (tabla 4.1, figura 4.4) se corresponde con un incremento desde $5 \cdot 10^{-8}$ s hasta $9.8 \cdot 10^{-8}$ s que puede explicarse, a través del modelo de Debye, por el incremento de la microviscosidad alrededor de la molécula de Hb (η_μ) desde 2 mPa s hasta 4 mPa s (tabla 4.1, figura 4.4) (Lores et al, 2006).

El incremento de τ_R obtenido conduce, de acuerdo a la ecuación 4.5, a un incremento de τ_C^b en ambas poblaciones de agua interna si se asume que τ_{res2}^b es comparable con τ_R y no se modifica con la polimerización de la HbS. Es coherente esperar que τ_{res2}^b no se modifique con la gelificación por cuanto el agua interna se encuentra en pequeños orificios y cavidades en la estructura de la Hb y, por tanto, no expuesta a los contactos Hb-Hb propios de la aglutinación macromolecular. En el caso de la población 2, si $\tau_{res2}^b \ll \tau_R$ entonces en la ecuación 4.5 $\tau_{C2}^b = \tau_{res2}^b$ siendo independiente de τ_R . No es importante un análisis similar para τ_{res1}^b porque en esta población $\tau_{C1}^b = \tau_R$.



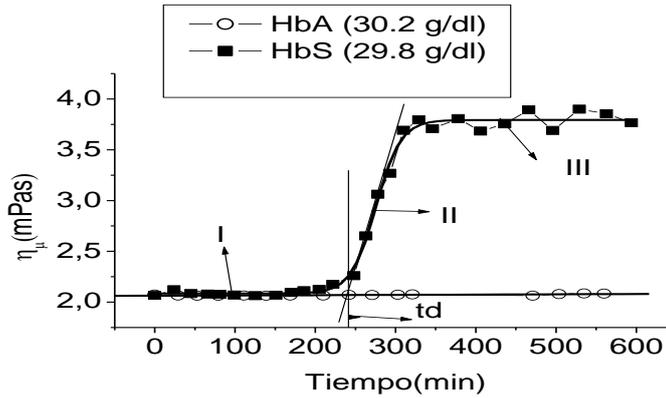


Figura 4.4. Comportamientos temporales típicos de τ_R y η_μ en muestras de HbA y HbS. En la HbA τ_R y η_μ permanecen constantes, mientras que en la HbS se incrementan 2 veces desde la región I a la región III

En la figura 4.5 mostramos la dependencia con τ_c^b de una estimación teórica de los términos entre corchetes en las ecuaciones 4.3 y 4.4, a los cuales llamaremos J_{t1} y J_{t2} por ser la suma de las contribuciones de las funciones densidades espectrales J_0 , J_1 y J_2 según corresponda al caso de T_1 o T_2 (Bloembergen et al, 1948). Al analizar estos comportamientos podemos concluir que los incrementos de τ_{c1}^b y τ_{c2}^b como resultado de la polimerización de la HbS provocan un decremento de T_2 como se obtuvo experimentalmente. Sin embargo, en el caso de T_1 , el incremento de τ_{c1}^b causará su crecimiento mientras que el aumento de τ_{c2}^b , al menos hasta $2.6 \cdot 10^{-8}s$, traerá como consecuencia su disminución. La variación de J_{t1} , en el rango de τ_{c2}^b entre $1 \cdot 10^{-8}s$ y $2.6 \cdot 10^{-8}s$, posee una mayor pendiente que su variación con el incremento de τ_{c1}^b y por ello se hace dominante permitiendo explicar la disminución experimental de T_1 obtenida. Pero, es de esperar (como se obtuvo experimentalmente) que la disminución de T_1 sea menor que la de T_2 dado el efecto competitivo del incremento de τ_{c1}^b . Entonces no se trata de que T_1 sea menos sensible a la polimerización que T_2 , sino de que su sensibilidad es “diferente”. Asumir que $\tau_{c2}^b = \tau_{res2}^b$ conduce a esperar un incremento de T_1 que no se corresponde con lo obtenido experimentalmente o a suponer un incremento de τ_{res2}^b con la polimerización que no tiene sustento teórico ni experimental.

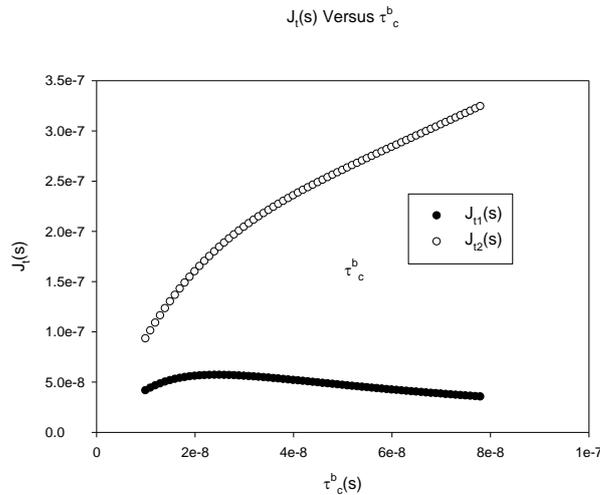


Figura 4.5. Dependencia con τ_c^b de una estimación teórica de J_{t1} y J_{t2}

Adicionalmente ha sido demostrado que, durante la nucleación y la formación de micro dominios estructurales inhomogéneos, la relajación Spin Curie puede contribuir con hasta el 25% y el 50 %, respectivamente, de la relajación magnética provocada por la interacción dipolar de los protones del agua con el electrón no apareado ubicado en el Fe^{3+} de la estructura de la HbS desoxigenada (Cabal et al, 2020). Por otro lado, a partir del estudio simultáneo de la relajación magnética de los protones y el deuterio en muestras de Hb deuteradas, se descartó el aporte a la relajación de gradientes de campo magnético internos resultantes del proceso de polimerización de la HbS (Cabrales et al, 2008).

Utilizando los comportamientos de T_2 durante la cinética de polimerización de la HbS (figura 4.2) fue posible establecer un valor de 250 min para el t_d en el paciente con AD en estado asintomático y determinar que una crisis vasooclusiva se establece cuando este valor decrece más de un 20 % (Lores et al, 2019; Cabal et al, 2018; Fernández et al, 2009), ver figura 4.6. También se demostró que la Vainillina incrementa, hasta el doble, los valores de t_d observados previo al tratamiento con este compuesto (Lores et al, 2019; Fernández et al, 2005; Cabal et al, 2018; Del Toro et al, 2003), ver figura 4.7. Por otro lado, se estableció que el t_d se incrementó en el 60 % de las muestras tratadas con GSH, mientras en el 100 % de las tratadas con dal se incrementaron los valores iniciales y finales de T_2 (Somoano et al, 2022).

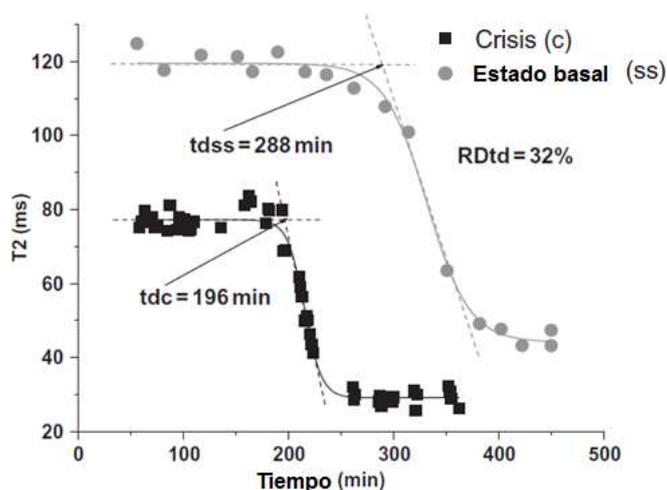


Figura 4.6. Comportamiento temporal de T_2 (T_2 en la figura) en un paciente con AD en estado asintomático o basal y durante una crisis vasooclusiva. Se observa el valor porcentual de la variación del t_d desde el estado basal al de crisis ($RDtd$)

Las variaciones del t_d , y los valores iniciales y finales de T_2 , obtenidos durante la crisis vasooclusiva del paciente, el tratamiento con Vainillina y la mezcla de la HbS con GSH y dal permiten la disponibilidad de una herramienta cuantitativa para contribuir a evaluar el estado clínico del paciente con AD y/o establecer la eficacia de acciones terapéuticas. Esto es sumamente importante también porque puede ser una

herramienta de evaluación evolutiva y para el establecimiento del criterio de alta médica.

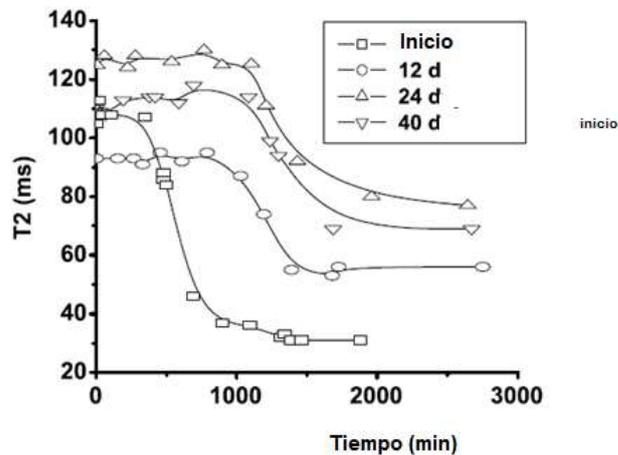


Figura 4.7. Variación temporal de T_2 (T_2 en la figura) en pacientes tratados con Vainillina en un estudio In Vivo que se prolongó durante 40 días (d). Los valores de t_d fueron duplicados

Estudios de Relajación Magnética Protónica en glóbulos rojos de pacientes con AD

Métodos experimentales empleados

Los RBC fueron obtenidos a partir de sangre total venosa empleando centrifugación y decantación, y posteriormente fueron lavados 3 veces con PBS (Guevara et al, 2016). Para la determinación del tiempo de intercambio del agua a través de la membrana (τ_e) los RBC lavados fueron resuspendidos en PBS (Hematocrito 45 %, pH 7.4, 0.5 % de Albúmina Bovina del Suero) y una porción fue centrifugada (1000 g, 30 min, 25 °C) eliminando el sobrenadante para obtener RBC empaquetados, 0.5 ml fueron depositados en un ampulla de RMN para las mediciones de T_2 (T_{2a}). Por otro lado, 0.3 ml de RBC resuspendidos fueron mezclados con 0.6 ml de una solución madre de $MnCl_2$ para obtener una concentración final de 2.5 mM en la muestra de RBC dopados, 0.5 ml fueron depositados en un ampulla de RMN para las mediciones de T_2 (T_{2d}). τ_e fue calculado como sigue:

$$\frac{1}{\tau_e} = \frac{1}{T_{2d}} - \frac{1}{T_{2a}} \quad (4.6)$$

La secuencia de pulsos de de RF de CPMG fue empleada para determinar T_{2a} y T_{2d} en RBC no dopados y dopados, respectivamente, utilizando una consola de RMN MARAN DRX (OXFORD INSTRUMENTS, 4 MHz para protones) (Guevara et al, 2016).

Resultados

Los valores de τ_e disminuyeron como consecuencia de la polimerización de la HbS (tabla 4.2) (Guevara et al, 2016).

Tabla 4.2. Valores de τ_e en RBC de pacientes con AD antes (oxigenados) y después (desoxigenados) de la polimerización de la HbS

Muestra	τ_e (ms)
RBC oxigenados	20.8±2.7
RBC desoxigenados	15.2±1.0

La disminución observada en τ_e con la gelificación macromolecular significa un aumento de la velocidad de deshidratación celular, lo cual pudiera incrementar la concentración de HbS favoreciendo su agregación. Por ende, este parámetro también pudiera ser de utilidad en la evaluación clínica del paciente con AD.

Evaluación de la viscosidad dinámica absoluta en disoluciones de proteínas empleando Relajación Magnética Protónica

Métodos experimentales empleados

Las muestras de plasma sanguíneo fueron obtenidas a partir de sangre total venosa empleando centrifugación y decantación (Mengana et al, 2019; Lores et al, 2018). Las muestras de suero sanguíneo fueron preparadas depositando la sangre total en un tubo seco sin anticoagulante, esperando 10 min a temperatura ambiente y centrifugando (2500 rpm, 10 min) para colectar el suero a partir del sobrenadante (Ernst et al, 2007). Las muestras de Hb se obtuvieron como se explicó anteriormente para la HbA y la HbS. Para determinar experimentalmente T_2 se empleó la secuencia de pulsos de RF de CPMG (Consola de RMN LApNMR de Tecmag, 4 MHz) (Mengana et al, 2019; Lores et al, 2018). Para evaluar η durante la construcción de las curvas de calibración ($1/T_2$ en función de η) se empleó un viscosímetro de Ostwald y un pignómetro (Mengana et al, 2019; Lores et al, 2018).

Resultados

En el caso del plasma sanguíneo se obtiene una dependencia lineal entre η y $1/T_2$ (Lores et al, 2018), ver figura 4.8. Esta dependencia experimental, también llamada curva de calibración, permite determinar directamente el valor de η a partir de un valor de T_2 obtenido experimentalmente y puede describirse según la ecuación:

$$\eta = 6.85 \times 10^{-4} \frac{1}{T_2} + 4.61 \times 10^{-4} \quad (4.7)$$

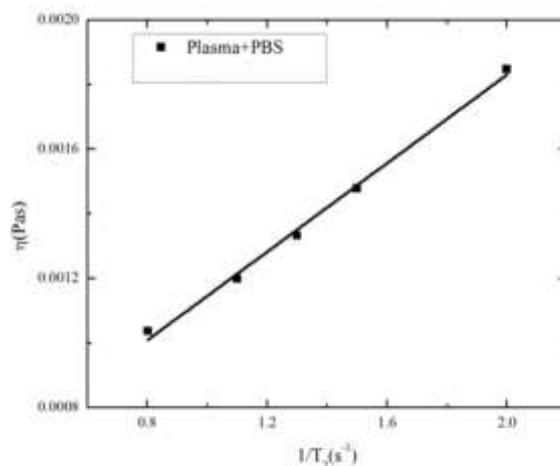


Figura 4.8. Dependencia de η en función de $1/T_2$ en muestras de Plasma Sanguíneo estudiadas a 20°C

Este método, basado en relajación magnética protónica (RMP), permite obtener valores de η del plasma sanguíneo que coinciden estadísticamente con lo determinado empleando el viscosímetro de Ostwald como método de referencia (tabla 4.3, $\alpha=0.001$, $P=0.00215782$, muestras pareadas) (Lores et al, 2018). En general este método permite reducir 10 veces y 2 veces el volumen de muestra y el tiempo de experimento necesarios para determinar η respectivamente. Adicionalmente, posibilita reportar directamente el valor de η y no requiere del lavado del viscosímetro entre determinaciones. Todo lo anterior subraya las ventajas del método de RMP sobre los métodos tradicionales de Viscosimetría, sin embargo, el método de RMP es mucho más caro. Este imponderable se atenúa si consideramos que la posibilidad de determinar η es solo una de las posibilidades de esta técnica experimental, a la cual se pueden sumar el resto de las aplicaciones descritas en este libro y otras no descritas aquí o por desarrollar.

Tabla 4.3. Valores de η en el plasma sanguíneo determinados empleando el método de RMP y el viscosímetro de Ostwald como método de referencia

Individuos controles (n=20)	η (mPa s) Viscosímetro de Ostwald	η (mPa s) RMP
Valor medio	1.61	1.68
Desviación Estándar	0.06	0.11
Rango	1.57-1.65	1.60-1.77

Durante la medición de una sola muestra con el método de RMP la desviación estándar representa el 1.57 % del valor medio o menos; mientras que cuando se toman diferentes muestras del mismo individuo este valor llega hasta 2.93 % (Lores et al, 2018). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de η obtenidos utilizando, para obtener el plasma sanguíneo, sedimentación natural y decantación o centrifugación y decantación (Lores et al, 2018). Los valores de η determinados empleando el método de RMP no se alteraron después de 15 días de

almacenamiento de la muestra a 4°C (Lores et al, 2018). Sin embargo; es necesario emplear el mismo anticoagulante en las muestras a evaluar y aquellas destinadas a proveer el valor de referencia (adultos sanos) pues fue demostrado que el cambio de anticoagulante puede alterar los valores de η del plasma sanguíneo como se muestra en la tabla 4.4 ($\alpha=0.05$).

Tabla 4.4. Comparación ($\alpha=0.05$) entre los valores de η del plasma sanguíneo, obtenidos empleando el método de RMP, en 20 sujetos “aparentemente sanos” en los cuales se empleó Citrato de Sodio como anticoagulante y 7 en los cuales se utilizó EDTA

Parámetro	Anticoagulante		Prueba de Hipótesis
	EDTA	Citrato de Sodio	
η (mPa s)	1.97±0.09	1.68±0.05	Estadísticamente Diferentes P=0.00000206896 (<0.05)

Todo anticoagulante va a inhibir la formación de Fibrina a partir del Fibrinógeno presente en el plasma sanguíneo. Sin embargo, el efecto de un anticoagulante puede ser diferente al de otro en cuanto a la magnitud de esa inhibición. Esto significa que, si tomamos sangre total de un mismo individuo y la dividimos en 2 fracciones iguales, cada una de las cuales mezclamos con un anticoagulante diferente, al final habrá en el plasma proveniente de cada fracción una diferente concentración de Fibrinógeno y Fibrina. Ello conduce a diferentes valores de η del plasma por cuanto esta viscosidad depende directamente de las concentraciones de proteínas en el interior de la muestra (Lores et al, 2018). En particular, por el gran tamaño y la asimetría de la molécula de fibrinógeno, la contribución de esta proteína a la η del plasma es determinante y se considera como el factor fundamental en individuos sanos (Blanco et al, 2020; Morie, 2018). Todo esto significa que el anticoagulante modifica la η del plasma y debe usarse el mismo anticoagulante si se quieren hacer comparaciones tanto con RMP como con cualquier otra técnica experimental.

Para evitar cambios en T_2 , no relacionados con la η del plasma sanguíneo, es necesario, al emplear el método de RMP, tener en cuenta lo siguiente (Lores et al, 2018):

-Evitar la contaminación de las muestras de plasma, durante su obtención o almacenamiento previo a la medición experimental de T_2 , con agua, disoluciones de macromoléculas, contenido celular o compuestos paramagnéticos.

-Mantener la temperatura constante en el interior de la muestra durante la medición de T_2 . De hecho, el cambio de la temperatura de medición impone la construcción de otra curva de calibración (figura 4.8) ya que T_2 y η son dependientes de la temperatura.

-Emplear en el experimento de RMP un valor de ω_0 que se encuentre en una zona de invarianza o invarianza relativa de $1/T_2$ en función de ω_0 . Lo anterior garantiza implementar el método empleando la misma curva de calibración en un rango de valores de ω_0 , de no ser así la curva de calibración debe ser actualizada para cada valor de la frecuencia de resonancia.

-Emplear un sistema magnético generador de \vec{H}_0 lo suficientemente homogéneo en la zona de estudio, o un valor de τ lo suficientemente corto en la secuencia de pulsos de RF de CPMG, para evitar la influencia de la difusión de las moléculas de agua en un gradiente de campo magnético en las determinaciones experimentales de T_2 y la aparición de un valor efectivo de este parámetro ($T_{2\text{eff}}$).

La tabla 4.5 muestra la aplicación del método de RMP para la determinación de la η del plasma sanguíneo en pacientes con diferentes patologías hematológicas como: la Policitemia Vera (PV), el Linfoma de Hodgkin (HDG), el Linfoma no Hodgkin (LNH), el Mieloma Múltiple (MM), la AD y la Hemoglobinopatía SC.

Tabla 4.5. Comparación ($\alpha=0.05$) entre los valores de η del plasma sanguíneo determinados en una muestra de pacientes con diferentes patologías hematológicas y en individuos "aparentemente sanos". Se empleó EDTA como anticoagulante

Estado Clínico	Patología	Valor de P	Resultado
Aparentemente sanos	Patológicos (todos)	0.352338	iguales
Aparentemente sanos	Pacientes con Mieloma Múltiple	0.282128	iguales
Aparentemente sanos	Pacientes con Anemia Drepanocítica (SS)	0.42397	iguales
Aparentemente sanos	Pacientes con PV	0.437086	iguales
Aparentemente sanos	Pacientes con LNH	0.531283	iguales

sanos			
Aparentemente sanos	Pacientes con HDG	0.199121	iguales
Aparentemente sanos	Pacientes con Hemoglobinopatía SC	0.14138	iguales

En la tabla 4.5 puede observarse que en todas las patologías los valores de η coinciden con los obtenidos en los individuos aparentemente sanos. En el caso de patologías como el HDG, el LNH y la PV es lógico no esperar incrementos de η del plasma sanguíneo por cuanto son patologías donde no se producen incrementos de las concentraciones de proteínas plasmáticas. En el caso de la AD y el MM está reportada la posibilidad del incremento de las concentraciones plasmáticas de Fibrinógeno y globulinas respectivamente (Lores et al, 2018; Blanco et al, 2020; Morie, 2018), sin embargo, esto no ocurre siempre y en estado asintomático los valores de las concentraciones de estas proteínas pueden ser normales aumentando solo en episodios donde el paciente tenga un Síndrome de Hiperviscosidad (SHV) o tienda hacia este síndrome (Blanco et al, 2020; Morie, 2018). Los pacientes con patologías hematológicas, cuyo reporte aparece en la tabla 4.5, fueron estudiados en estado asintomático durante la asistencia a consultas de seguimiento y por ende es lógico el resultado observado para la AD y el MM. Lo explicado anteriormente puede verse con claridad en la figura 4.9, donde se muestran 2 pacientes debutantes con MM, 1 de ellos con sintomatología de un SHV. Es posible evolucionar durante el tratamiento, empleando la determinación de la η del plasma sanguíneo, a pacientes con enfermedades que alteran la viscosidad plasmática e incluso a casos con SHV.

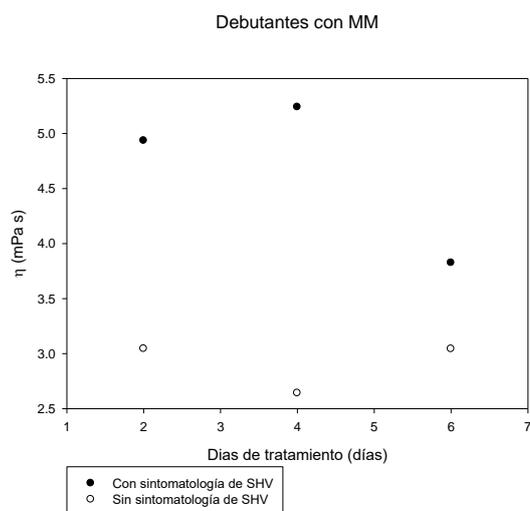


Figura 4.9. Estudio evolutivo de la η del plasma sanguíneo en 2 pacientes debutantes con MM, 1 de ellos con sintomatología propia de SHV

El método de RMP también puede emplearse, de forma similar, en muestras de suero sanguíneo y Hb como se muestra en las figuras 4.10 y 4.11, en la tabla 4.6, así como en las ecuaciones 4.8 (suero sanguíneo) y 4.9 (Hb).

$$\frac{1}{T_2} (\text{ms}^{-1}) = 0.003\eta(\text{mPas}) - 0.019 \quad (4.8)$$

$$\frac{1}{T_2} (\text{s}^{-1}) = 0.4\eta(\text{mPas}) + 0.5 \quad (4.9)$$

Tabla 4.6. Valores de η en suero sanguíneo y Hb determinados empleando el método de RMP y el viscosímetro de Ostwald como método de referencia

<i>Suero sanguíneo</i>		
Individuos controles (n=27)	η (mPa s) Viscosímetro de Ostwald	η (mPa s) RMP
Valor medio	1.32	1.28
Desviación Estándar	0.05	0.06
Rango	1.27-1.37	1.22-1.34
<i>Hb</i>		
Individuos controles (n=17)	η (mPa s) Viscosímetro de Ostwald	η (mPa s) RMP
Valor medio	12.80	11.19
Desviación Estándar	3.35	2.02
Rango	9.47-16.17	9.17-13.21

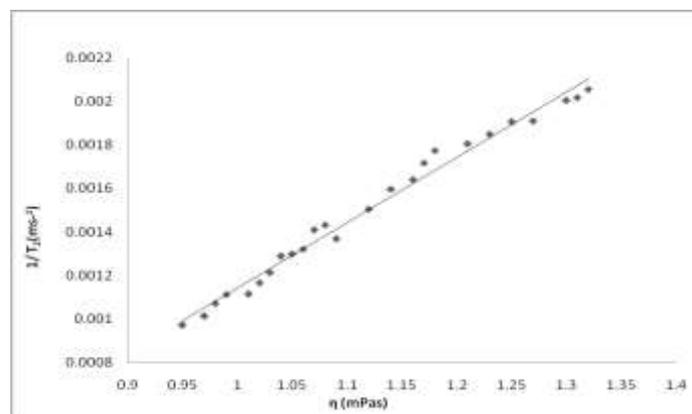


Figura 4.10. Comportamiento de $1/T_2$ en función de η obtenido en muestras de suero sanguíneo a 20°C

La posibilidad que ofrece el método de RMP de poder evaluar la η del plasma sanguíneo (η_P) y de la Hb (η_{Hb}) posibilita, con la determinación adicional del Hematocrito (H), la evaluación de la viscosidad dinámica absoluta de la sangre total (η_{ST}) (Sirs, 1981):

$$\eta_{ST} = \eta_p \left(1 - H \left[\frac{\left(\frac{\eta_{Hb} + 0.4}{\eta_p} \right)}{\left(\frac{\eta_{Hb} + 1}{\eta_p} \right)} \right] \right)^{-2.5} \quad (4.10)$$

Con la determinación de η_{ST} es posible realizar una evaluación más adecuada del SHV que cuando se emplea solamente η_p como pudimos apreciar en la figura 4.9.

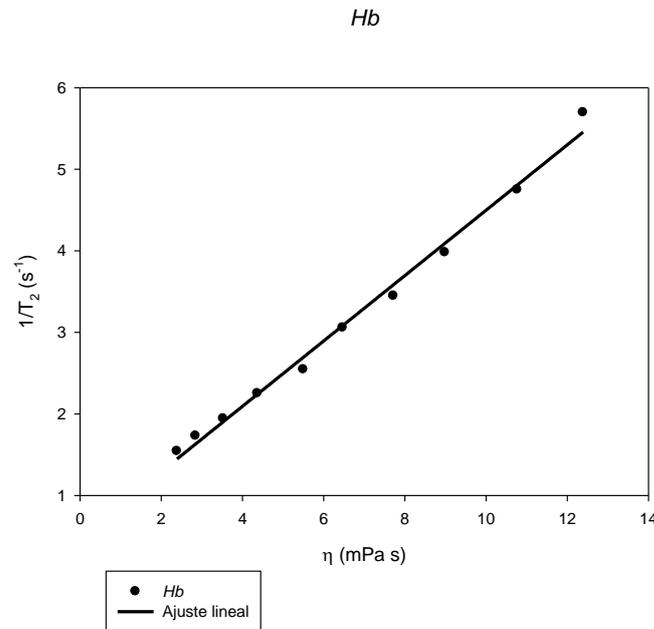


Figura 4.11. $1/T_2$ en función de η en muestras de Hb a 20°C

Otros métodos han sido propuestos para evaluar la η en plasma sanguíneo, suero sanguíneo y Hb empleando RMP (Lores et al, 2018; Peña, 2005; Hong et al, 2008; Endre y Kuchel, 1986). Se ha empleado el comportamiento de la viscosidad cinemática (ν) en función de T_1 , obtenido en muestras de Glicerol+agua, para determinar ν en una muestra de plasma sanguíneo a partir del valor de T_1 determinado experimentalmente en dicha muestra (Peña, 2005). Sin embargo, la diferente naturaleza de las muestras empleadas para hacer la curva de calibración (Glicerol+agua) y el plasma puede contribuir a que la determinación de ν sea errónea (Lores et al, 2018). Además, para determinar η en función de ν se requiere la determinación experimental de la densidad de la muestra en estudio (ρ), para lo cual es preciso un incremento del volumen de muestra y del tiempo de experimento.

En 2008, Hong y colaboradores añadieron partículas superparamagnéticas a muestras artificiales de suero sanguíneo y observaron su agregación bajo el efecto de un campo magnético externo (Hong et al, 2008). Fue medido experimentalmente el efecto de este proceso de agregación sobre el T_2 de la muestra y graficado en función del recíproco

de la η de dicha muestra (determinada empleando un método de Viscosimetría tradicional). Con esta curva de calibración es posible determinar la η de una muestra de suero sanguíneo a partir del valor de T_2 medido experimentalmente. Los problemas con este método son la posible modificación de la η de la muestra en estudio al añadir las partículas superparamagnéticas y el empleo de temperaturas (40°C) cercanas al punto de desnaturalización de las proteínas. Adicionalmente, este método no ha sido validado en muestras reales de suero sanguíneo.

Endre y Kuchel propusieron en 1986 la determinación del tiempo de correlación rotacional de moléculas fisiológicas intracelulares (Glicina y Glutación) marcadas con ^{13}C a partir del T_1 del ^{13}C , lo cual permite la determinación de la η de la Hb intracelular utilizando configuraciones esféricas o de elipsoides simétricos (Endre y Kuchel, 1986). Este es un método complejo que necesita al menos 4 h de incubación durante la preparación de la muestra.

Relajación magnética protónica en el estudio del cáncer de mama “In vitro”

Procedimientos Experimentales

Las muestras de tejido maligno, conjuntamente con la referencia (tejido sano), se obtuvieron a través de la mastectomía total o parcial (misma mama y el mismo cuadrante) en ambiente hospitalario controlado (Lores et al, 2002). La extracción de los fragmentos de tejido, 0.5 cm^3 , se efectuó a temperatura ambiente y los mismos fueron depositados en un ampulla para el experimento de RMP, el cual se llevó a cabo a 36°C . Se utilizó una baja frecuencia de resonancia (4 MHz) en aras de maximizar la RMP y como instalación experimental se empleó el Giromag 02 (Primer equipo de RMP fabricado en Cuba).

Considerando los valores de T_1 y T_2 propios de las muestras de tejido mamario, la necesidad de un menor tiempo de experimento para evitar la degradación tisular y la posibilidad de excitar el doble del ancho de banda durante el pulso de preparación (90°); las determinaciones experimentales de T_1 se realizaron empleando la secuencia de pulsos de RF de saturación recuperación con un valor inicial de τ de 60 ms, un incremento de τ de 10 ms y un TR de 2500 ms.

Las determinaciones experimentales de T_2 se realizaron utilizando la secuencia de pulsos de RF de 90° - τ - 180° -TR (Lores et al, 2002) con un valor inicial de τ de 2 ms, un incremento de τ de 2 ms y TR= 2500 ms. Considerando la necesidad de un menor tiempo de experimento para evitar la degradación tisular recomendamos, sin embargo, el empleo de la secuencia de pulsos de CPMG con $\tau= 2\text{ ms}$, 100 ecos y TR= 2500 ms.

Se realizaron, al menos, 5 determinaciones de T_1 y T_2 para obtener un error relativo inferior al 5 %.

Resultados

Las tablas 4.7 y 4.8 muestran los valores obtenidos para T_1 y T_2 en las muestras de tejido mamario maligno y su correspondiente muestra de tejido sano (Lores et al, 2002).

Tabla 4.7. Valores de T_1 (36°C, 4 MHz) en las muestras de tejido mamario maligno y su correspondiente muestra de tejido sano

Pacientes	$T_1 \pm SD$ (ms)		Diferencia (%)
	Sano	Maligno	
1	205±7	386±13	47
2	146±5	231±6	27
3	212±5	319±8	10
4	196±13	235±10	27
5	287±10	305±5	16
6	185±6	285±6	35
7	189±7	238±6	21
8	196±9	253±5	23
9	228±7	381±7	40
Promedio	200±4	290±6	27

Tabla 4.8. Valores de T_2 (36°C, 4 MHz) en las muestras de tejido mamario maligno y su correspondiente muestra de tejido sano

Pacientes	$T_2 \pm SD$ (ms)		Diferencia (%)
	Sano	Maligno	
1	44.5±1.7	55.6±3.1	20
2	46.0±2.1	56.3±1.9	18
3	37.6±1.9	56.2±1.1	23
4	27.3±0.5	46.2±0.4	41
5	35.0±9.3	47.4±0.5	26
6	45.4±0.5	43.8±0.4	4
7	35.8±1.6	40.0±1.2	10
8	38.4±1.1	45.4±1.7	15
9	53.0±0.7	65.8±0.8	20
Promedio	37.4±7.0	46.0±13.0	20

Puede observarse que en la mayoría de los pacientes analizados (89 % en el caso de T_2 y 100 % en el caso de T_1) existen diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$, test de student) entre los valores de T_1 y T_2 obtenidos para el tejido maligno y aquellos determinados en las muestras de tejido sano pertenecientes a la misma mama y el

mismo cuadrante que el carcinoma (Lores et al, 2002). Estas diferencias son, como promedio, del 27 % en el caso del T_1 y del 21 % en el caso del T_2 . Los datos obtenidos mostraron seguir una distribución normal de acuerdo al test de Kolmogorov-Smirnov realizado. No existe, sin embargo, relación entre el tipo de carcinoma mamario estudiado y la magnitud de las diferencias observadas para el caso de ambos tiempos de relajación.

La RMP en muestras de tejidos puede describirse, considerando un intercambio rápido de moléculas de agua entre los medios intracelular (intra) y extracelular (extra), de acuerdo a:

$$\begin{aligned}\frac{1}{T_1} &= \frac{P_{intra}}{T_{1intra}} + \frac{P_{extra}}{T_{1extra}} \\ \frac{1}{T_2} &= \frac{P_{intra}}{T_{2intra}} + \frac{P_{extra}}{T_{2extra}}\end{aligned}\quad (4.11)$$

Donde P representa la fracción de agua en cada medio. La RMP, tanto en el medio intracelular como extracelular, puede explicarse de acuerdo al modelo de intercambio de moléculas de agua entre 2 sitios explicado en el capítulo 2 de este libro, según el cual R_{1i} ($1/T_{1i}$) y R_{2i} ($1/T_{2i}$) pueden describirse por la ecuación 4.12. En este sistema de ecuaciones R_{1w}^{bulk} y R_{2w}^{bulk} representan las velocidades de relajación magnética protónicas del solvente, γ la razón giromagnética del protón, y $b = 1.58 \cdot 10^{-10}$ m es la distancia entre los 2 protones en el interior de la molécula de agua. τ_C es el tiempo de correlación efectivo correspondiente al agua enlazada ($1/\tau_C = 1/\tau_{res}^B + 1/\tau_R$), siendo τ_{res}^B el tiempo de residencia de la molécula de agua en su enlace a la proteína y τ_R el tiempo de correlación rotacional de la molécula de proteína. El subíndice i puede representarse como intra o extra y B representa al agua enlazada.

$$\begin{aligned}R_{1i}(\omega_0) &= R_{1wi}^{bulk} + \frac{0.4\delta_{1i}}{\omega_0^2 \tau_{Ci}} \\ \delta_{1i} &= P_{Bi} \frac{3}{2} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{b^6} \\ R_{2i}(\omega_0) &= R_{2wi}^{bulk} + \frac{3}{5} \delta_{2i} \tau_{Ci} \\ \delta_{2i} &= P_{Bi} \frac{3}{4} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{b^6}\end{aligned}\quad (4.12)$$

Aquí se ha considerado que $\omega_0^2 \tau_{Ci}^2 \gg 1$ dado que $T_1 > T_2$ como puede observarse en las tablas 4.7 y 4.8.

La formación del tejido maligno a partir del sano trae como consecuencia varios procesos a nivel celular como la disminución de la cantidad de agua extracelular, la retracción del tejido graso y la disminución de elementos paramagnéticos de Fe, Cu y Mn (Lores et al, 2002). La disminución de la cantidad de agua extracelular trae consigo un incremento de la concentración de proteínas en este medio; lo cual conduce, según los modelos de Mooney y Debye (Lores et al, 2006), a un incremento de τ_R y por consiguiente de $\tau_{C_{extra}}$. Sin embargo, esto lleva a comportamientos opuestos de T_1 y T_2 de acuerdo a las ecuaciones 4.11 y 4.12. Es por ello que, más allá del comportamiento de la movilidad molecular, consideramos dominante, al explicar los incrementos de T_1 y T_2 en el tejido maligno, las modificaciones estructurales previamente descritas y relacionadas con el tejido graso y la concentración de elementos paramagnéticos. Tanto la presencia de tejido graso como de iones paramagnéticos disminuyen los valores de los tiempos de relajación y, por ende, su disminución provoca incrementos de ambos parámetros.

Fue demostrado que es posible establecer rangos de valores de T_1 y T_2 para los cuales se puede afirmar que el tejido mamario es maligno ($T_1 > 300$ ms, $T_2 > 45$ ms) o sano ($T_1 < 200$ ms, $T_2 < 35$ ms) (Lores et al, 2002). Lo anterior posee mucha potencialidad como elemento diagnóstico porque es un resultado que puede obtenerse minutos después de obtener la muestra, mientras el estudio clásico de anatomía patológica (biopsia) demora más de 10 días. Sin embargo, es importante reconocer que no ofrece los detalles histológicos que proporciona la biopsia. No obstante, la información que ofrece este estudio tiene un valor orientador para el médico que, por su inmediatez, pudiera ser empleado incluso para tomar decisiones durante intervenciones quirúrgicas.

Referencias bibliográficas

1. Abragam, A. (1961). *The principles of nuclear magnetism*. Oxford University Press.
2. Alberteris-Campos, M., Cruz-Vadell, A., Escalona-Franco, A., Lopez-Delis, A. (2012). *Tarjeta electrónica secuenciadora de eventos para scanners de resonancia magnética* (Patente de Cuba. No. 0969). Centro de Biofísica Médica. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial (OCPI).
3. Ajjack, E. A., Awooda, H. A., Abdalla, S. E. (2014). Haemoglobin Patterns in Patients with Sickle Cell Haemoglobinopathies. *International Journal of Hematological Disorders*, 1(1), 8-11.
4. Archer, N., Galacteros, F., Brugnara, C. (2015). Clinical trials update in sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, 90 (10), 934-950.
5. Artigas, F., Fernández-García, A., Quintero, R., Portuondo, L., Grass, D. (2007). RelaXoft®: Herramienta abierta para el seguimiento de procesos dinámicos en muestras biológicas in vitro mediante RMN. En Quirós, R., Pla, F., Badía, J.M., Chover, M. (Eds.), *Métodos Informáticos Avanzados* (pp. 1-15). Universitat Jaume I (ISBN: 978-84-8021-610-4).
6. Artigas, F., Fernández, A., Cruz, A., Alberteris, M. (2004). Relaxoft. Software de control para relaxómetros GIROMAG. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 8(32).
7. Ayala, V., Alfonso, J., González, H. J., Gabriel, J., Tarud, D. (2016). Anemia de Células falciformes: una revisión. *Salud Uninorte*, 32(3), 513-527.
8. Ayant, Y., Belorizky, E., Fries, P. y Rosset, J. (1977). Effet des interactions dipolaires magnétiques intermoléculaires sur la relaxation nucléaire de molécules polyatomiques dans les liquides. *Le Journal de Physique*, 38 (3), 325-337.
9. Blanco-Santos, Y., Areces-López, A., Gámez-Pérez, A. (2020). Síndrome de Hiperviscosidad: Características fisiopatológicas y clínicas. *Revista Científico Estudiantil*, 59(278), e840.
10. Bloch, F. (1946). Nuclear induction. *Phys. Rev.*, 70(7, 8), 460-474.
11. Bloembergen, N., Purcell, E. M., Pound, R. V. (1948). Relaxation effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Physical Review*, 73(7), 679-715.
12. Cabal, C., Lores, M., Chizhik, V. I., Rabdano, S. O., García-Naranjo, J. C. (2020). Assessment of Contribution of Curie-Spin Mechanism in Proton Relaxation During Aggregation Process of Hemoglobin S. *Applied Magnetic Resonance*, 51(12), 1647-1652. <https://doi.org/10.1007/s00723-020-01241-x>.
13. Cabal, C. A., Fernández, A. A., Lores, M. A., González, E., Oramas, L. (2018). Kinetic studies of complex biomedical process by magnetic resonance: Cuban experiences. *Applied Magnetic Resonance*, 49(6), 589-598.

14. Cabrales, Y., Lores, M., Machado, Y. (2008). Deuterium magnetic relaxation process during the polymerization of the Hemoglobin S. *Applied Magnetic Resonance*, 33, 207-212.
15. Canet, D., Levy, G. C., y Peat, I. R. (1975). Time saving in ¹³C spin-lattice relaxation measurements by inversion recovery. *Journal of Magnetic Resonance*, 18, 199-204.
16. Carr, H. Y. y Purcell, E. M. (1954). Effects of diffusion on free precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Physical Review*, 94(3), 630-638.
17. Chizick, V., y Cabal, C. (1983). Relaxómetro de Resonancia Magnética Nuclear. *Revista Cubana de Física*, III(3), 33-42.
18. Cottam, G. L., Valentine, K. M., Yamaoka, K. M., Waterman, M. R. (1974). The gelation of deoxyhemoglobin S in erythrocytes as detected by transverse water proton relaxation measurements. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 162, 487-492.
19. Cottam, G. L., Waterman, M. R. (1976). Effect of oxygen concentration on transverse water proton relaxation times in erythrocytes homozygous and heterozygous for hemoglobin S. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 177, 293-298.
20. Dazkiewicz, O. K., Hennel, J. W., Lubas, B. y Szczepkowski, T.W. (1963). Proton Magnetic relaxation and protein hydration. *Nature.*, 200, 1006-1007.
21. Del Toro, G., Falcón, J.E., Alonso, Y., Valdés, Y.C., Cabal, C. (2003). Vainillina: Agente inhibidor de la polimerización de la hemoglobina S. *Bioquímica*, 28(4), 4-10.
22. Denisov, V. P. y Halle, B. (1996). Protein hydration dynamics in protein solutions. *Faraday Discuss*, 103, 227-244.
23. Denisov, V. P., Peters, J., Hörlein, H. D. y Halle, B. (1996). Using buried water molecules to explore the energy landscape of proteins. *Nature Struct. Biol.*, 3, 505-509.
24. Eaton, W. A., Bunn, H. F. (2017). Treating sickle cell disease by targeting HbS polymerization. *BLOOD*, 129(20), 2719-2726.
25. Eaton, W. A., Hofrichter, J. (1990). Sickle Cell Hemoglobin Polymerization. *Adv. Protein. Chem.*, 40, 63-279.
26. Eaton, W. A., Hofrichter, J., Ross, P. D., Tschudin, R. G., Becker, E. D. (1976). Comparison of sickle cell hemoglobin gelation kinetics measured by NMR and optical methods. *Biochemical and Biophysics research communications*, 69(2), 538-547.
27. Edelman, R. R., Hesselink J. R., Zlatkin, M. B., Crues III, J. V. (1996). *Clinical Magnetic Resonance Imaging*. Saunders Elsevier.
28. Endre, Z. H., Kuchel, P. M. (1986). Viscosity of concentrated solutions and of human erythrocyte cytoplasm determined from NMR measurement of molecular correlation times. The dependence of viscosity on cell volume. *Biophysical Chemistry*, 24, 337-356.

29. Ernst, D. J., Balance, L. O., Calam, R. R., McCall, R., Smith, S. S., Szamosi, D. I., Warunek, D. J. (2007). Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture. *Approved Standard CLSI*, 27(26).
30. Evans, J. N. S. (1996). *Biomolecular NMR spectroscopy*. OXFORD UNIVERSITY PRESS.
31. Fernández, A., Cabal, C. A., Lores, M. A., Losada, J., Pérez, E. (2009). Sick cell disease “painful crisis” and “steady state” differentiation by proton magnetic resonance. *Hemoglobin*, 33(3-4), 206-213.
32. Fernández, A., Cabal, C. A., Losada, J., Álvarez, E., Soler, C., Otero, J. (2005). In vivo action of vanillin on delay time determined by magnetic relaxation. *Hemoglobin*, 29(3), 181-187.
33. Ferrone, F. A., Hofrichter, J., Eaton, W. A., Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism. *J. Mol. Biol.*, 183(4), 611-631.
34. Freeman, R., y Hill H.D.W. (1971). Fourier transform study of NMR spin-lattice relaxation by progressive saturation. *J. Chem. Phys.*, 54, 3367-3377.
35. Fukushima, E., y Roeder S. B. W. (1981). *Experimental Pulse NMR, a nuts and bolts approach*. Westview Press.
36. García, J. C. (2006). *Caracterización de un sistema de recepción de señales para tomógrafos GiroImag*. <http://eduniv.mes.edu.cu/07-Tesis/Universidad-Oriente/Centro-Biofísica-Médica/Maestrias>
37. Gertz, M. A. (2018). Acute hyperviscosity: síndromes and management. *Blood*, 132(13), 1379-1385.
38. Gravitz, L., Pincock, S. (2014). Sick Cell Disease. *Nature*, 515(7526), S1. <https://doi.org/10.1038/515S1a>
39. Guevara, M., García-Naranjo, J., Mengana, Y., y Pereira, J. (2014). Hemoglobin S Polymerization Effect on Water Self-Diffusion Coefficient. *Advances in Biological Chemistry*, 4, 388-394. doi: 10.4236/abc.2014.46044.
40. Guevara, M.A.L., Torres, Y.M., Naranjo, J.C.G., Aguilera, A.R., Beyrio, L.C.S., Felue, M.A.M., Brada, T.S., Philippé, J. (2016). Water Efflux in Red Blood Cells of Sick Cell Patients under Spontaneous Deoxygenation. *Journal of Biosciences and Medicines*, 4, 152-161.
41. Haacke, E. M., Brown, R. W., Thompson, M. R., Venkatesan, R. (1999). *Magnetic Resonance Imaging. Physical Principles and sequence design*. John Wiley and So
42. Hahn, E. L. (1950). Spin Echoes. *Physical Review*, 80 (4), 580-601.
43. Halle, B., Denisov, V. P. y Venu, K. (1999). Multinuclear relaxation dispersion studies of protein hydration. Krishna & Berliner (Ed). *Biological magnetic resonance* (vol. 17, pp. 419–484). New York: Kluwer/Plenum.

44. Halle, B. y Denisov, V. P. (2001). Magnetic relaxation dispersion studies of biomolecular solutions. *Meth. Enzymol.*, 338, 178–201.
45. Halle, B. (2004). Protein hydration dynamics in solution: a critical survey. *Phil. Trans. R. Soc. Lond B*, 359, 1207–1224.
46. Hoult, D. I., y Richards, R. E. (1976). The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment. *Journal of Magnetic Resonance*, 24, 71-85.
47. Hong, R., Cima, M.J., Weissleder, R., Josephson, L. (2008). Magnetic microparticles aggregation for viscosity determination by MR. *Magn. Reson. Med.*, 59, 515-520.
48. Hubbard, P. S. (1961). Quantum-Mechanical and Semi classical forms of the density operator theory of relaxation. *Reviews of Modern Physics*, 13 (2), 249-264.
49. Ivanova, M., Jasuja, R., Kwong, S., Briehl, R. W., Ferrone, F. A. (2000). Nonideality and the nucleation of sickle hemoglobin. *Biophys J.*, 79 (2), 1016-1022.
50. Kiihne, S. y Bryant, R. G. (2000). Protein-Bound Water Molecule Counting by Resolution of ¹H Spin-Lattice Relaxation Mechanisms. *Biophys. J.*, 78, 2163-2169.
51. Koenig, S.H. y Schillinger W. E. (1969). Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion in Protein Solutions. Apotransferrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(12), 3283-3289.
52. Koenig, S. H. y Schillinger, W. E. (1969). Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion in Protein solutions. Transferrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(23), 6520-6526.
53. Kubo, R. y Tomita, K. (1954). A general theory of magnetic resonance absorption. *J. Phys. Soc. Jpn.*, 9(6), 888-919.
54. Kuntz, I. D. y Kauzmann, W. (1974). Hydration of protein and polypeptides. *Adv. Protein Chem.*, 28, 239–345.
55. López-Rios, N. (2014). Sonda con bajo tiempo muerto para relaxometría por resonancia magnética nuclear. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, XV(1), 83-91.
56. López, N. (2006). *Amplificadores lineales de potencia de radiofrecuencia. Diseño y Caracterización.* <http://eduniv.mes.edu.cu/07-Tesis/Universidad-Oriente/Centro-Biofísica-Médica/Maestrias>
57. Lores-Guevara, M. A. (2005). *Estudio de los procesos de interacción magnética y la movilidad molecular durante el proceso de polimerización de la hemoglobina S con métodos de Resonancia Magnética.* [Tesis de Doctorado no publicada]. Universidad de Oriente.
58. Lores, M. A., García, J. C., Cabal, C. A. (2019). MR Relaxation Studies of Hemoglobin Aggregation Process in Sickle Cell Disease: Application for Diagnostics and Therapeutics. *Applied Magnetic Resonance*, 50, 541-551.

59. Lores, M. A., Cabal, C. A. (2005). Proton magnetic relaxation process during the polymerization of hemoglobin S. *Applied Magnetic Resonance*, 28, 79-84.
60. Lores, M., García, J. C., Mengana, Y., Pereira, J. (2014). Hemoglobin S polymerization effect on water self-diffusion coefficient. *Advances in Biological Chemistry*, 4(6), 388-394. <http://www.scirp.org/journal/abc>.
61. Lores, M. A., Cabal, C. A., Nascimento, O., Gennaro, A. (2006). EPR study of the hemoglobin rotational correlation time and microviscosity during the polymerization of hemoglobin S. *Applied Magnetic Resonance*, 30, 121-128.
62. Lores, M. A., Cabal, C. A., Muller, R. N., Laurent, S., Tamayo, F., García, J. C. (2022). Proton MRD profile analysis in intracellular hemoglobin solutions: a three sites exchange model approach. *Applied Magnetic Resonance*, 53, 387-399. EMID: 92ea8f7836234ad7. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00723-021-01452-w>
63. Lores, M. A., Mengana-Torres, Y., García-Naranjo, J. C., Rodríguez-Suárez, N., Suárez-Beyries, L. C., Marichal-Feliu, M. A., Simón-Boada, T., Rodríguez-Reyes, I., Phillipé, J. (2018). Plasma Dynamic Viscosity Determined by NMR. *Applied Magnetic Resonance*, 49 (10), 1075-1083.
64. Lores, M., Rodríguez, Y., Pérez, E. (2002). Evaluación de las potencialidades de la relajación magnética nuclear para el estudio, a baja frecuencia, del cáncer de mama In vitro. *Revista Cubana de Química*, XIV(3), 3-10.
65. Meiboom, S., y Gill, D. (1958). Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Review of Scientific Instruments*, 29(8), 688-691.
66. Mengana-Torres, Y., Lores-Guevara, M. A., García-Naranjo, J. C., Ricardo-Ferro, B. T., Suárez-Beyries, L. C., Rodríguez-Reyes, I. C., Phillipé, J. (2019). Determination of the dynamic viscosity in blood plasma samples and hemoglobin solution using nuclear magnetic relaxation. *International Journal of Biochemistry, Biophysics & Molecular Biology*, 4(2), 25-30.
67. Modig, K. y Liepinsh, E., Otting G., Halle B. (2004). Dynamics of protein and peptide hydration. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 102–114.
68. Obeagu, I. E., Ochei, K. C., Nwachukwu, B. N., Nchuma, B. O. (2015). Sick Cell Anaemia: A Review. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, 3 (6B), 2244-2252.
69. Otting, G., Wuthrich, K. J. (1989). Studies of protein hydration in aqueous solution by direct NMR observation of individual protein-bound water molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 1871–1875.
70. Parise, L.V., Berliner, N. (2016). Sick cell disease: challenges and progress. *Blood*, 127(7), 789.

71. Peña-Zamora, L. (2005). Evaluación de la viscosidad del plasma sanguíneo mediante la velocidad de relajación protónica spin-retículo [Tesis de grado no publicada]. Universidad de Oriente.
72. Piel, F. B., Steinberg, M. H., Rees, D. C. (2017). Sickle Cell Disease. *The New England Journal of Medicine*, 376 (16), 1561-1573.
73. Portuondo, L., Artigas, F. (2007). Compilador e intérprete de guiones de secuencias para relaxómetros de pulsos de RMN. En Quirós, R., Pla, F., Badía, J.M., Chover, M. (Eds.), *Métodos Informáticos Avanzados* (pp.187-201). Universitat Jaume I (ISBN: 978-84-8021-610-4).
74. Rosada, J., Sónora, A., Sam, S., Simón, A. (2006). Sintetizador digital basado em FPGA empleando el método Cordic [Sesión de Conferencias]. Evento Internacional TELECOM'2006, Santiago de Cuba, Cuba.
75. Rosada, J., García, J. C. (2006). Receptor de señales definido por Software utilizando dispositivos FPGA. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 10 (38), 81-84.
76. Rosada, J., Soñora, A., García, J.C. (2008). Diseño de un detector digital empleando un sistema de rotación de coordenadas basado en FPGA [Sesión de Conferencias]. Conferencia Internacional FIE'08, Santiago de Cuba, Cuba.
77. Serjeant, G. R., Chin, N., Asnani, M. R., Serjeant, B. E., Mason, K. P., Hambleton, J. R., Knight-Madden, J. M. (2018). Causes of death and early life determinants of survival in homozygous sickle cell disease: The Jamaican cohort study from birth. *PLoS ONE*, 13 (3), e0192710.
78. Shibata, K., Waterman, M. R., Cottam, G. L. (1977). Alteration of the rate of deoxyhemoglobin S polymerization. Effect of pH and percentage of oxygenation. *Journal of Biological Chemistry*, 252 (21), 7468-7474.
79. Simón, A. V., Alberteris, M., Cruz, A., Padilla, R. (2006). Secuenciador de eventos para relaxómetro por resonancia magnética [Sesión de Conferencias]. Evento Internacional TELECOM'2006, Santiago de Cuba, Cuba.
80. Sirs, J. A. (1981). Erythrocyte flexibility and whole blood viscosity. En G. D. O. Lowe et al. (Eds.), *Clinical Aspects of Blood Viscosity and Cell Deformability*. Springer-Verlag Berling Heidelberg.
81. Solomon, I. (1955). Relaxation Processes in a system of two spins. *Phys. Rev.*, 99 (2), 559-566.
82. Somoano, L. M., Lores-Guevara, M. A., García-Naranjo, J. C., Niesor, J. E., Perez, A., Rodríguez, I., Rosales, S., Tamayo-Delgado, F. (2022). Dalcetrapib and Reduced Glutathione effect on hemoglobin S polymerisation studied by NMR. *Research on*

- Biomedical Engineering, 38 (3), 831-838. <https://doi.org/10.1007/s42600-022-00224-0>.
83. Sónora, A., Sam, S., Simón, A. (2006). Diseño de un sintetizador empleando un sistema de rotación de coordenadas basado en FPGA. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 10 (41), 281-285.
 84. Sónora, A. (2006). Diseño de un sintetizador para equipos de resonancia magnética empleando FPGA. *Bioingeniería y Física Médica Cubanas*, 7 (1), 31-34.
 85. Sónora, A. (2005). Diseño de moduladores digitales empleando FPGA para scanners de resonancia magnética. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 9 (35), 151-154.
 86. Thompson, B. C., Waterman, M. R., Cottam, G. L. (1975). Evaluation of the water environments in deoxygenated sickle cell by longitudinal and transverse water relaxation rates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 166, 193-200.
 87. Venu, K., Denisov, V. P. y Halle B. (1997). Water ¹H Magnetic Relaxation Dispersion in protein solutions. A quantitative assessment of internal hydration, proton exchange and cross relaxation. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 3122-3134.
 88. Waterman, M. R., Cottam, G. L. (1976). Kinetics of the polymerization of hemoglobin S: studies below normal erythrocyte hemoglobin concentration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 73 (3), 639-645.
 89. Woessner, D. E. (1962). Nuclear Spin relaxation in ellipsoids undergoing rotational Brownian motion. *J. Chem. Phys.*, 37 (3), 647-654.
 90. Woessner, D. E., Snowden, B. S. Jr. y Meyer G. H. (1969). Nuclear Spin-lattice relaxation in axially symmetric ellipsoids with internal motion. *J. Chem. Phys.*, 50 (2), 719-721.
 91. Zhi-Pei, L. & Lauterbur, P. C. (2000). *Principles of Magnetic Resonance Imaging*. IEEE PRESS.
 92. Zipp, A., James, T. L., Kuntz, I. D., Shohet, S. B. (1976). Water proton magnetic resonance studies of normal and sickle erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 428, 291-303.



BIOFISICA MEDICA

El Centro de Biofísica Médica es el pionero en Cuba en el desarrollo de tecnología de Relajación Magnética Nuclear. Este libro recoge las experiencias de sus profesores, investigadores y tecnólogos en la aplicación de esta tecnología a la medicina con utilidad en la práctica clínica. Sirva también de homenaje a todos aquellos que han aportado, al menos, una gota de sudor a este empeño.

“El talento es respetable cuando es productivo”.

José Julián Martí Pérez.

ISBN: 978-959-207-731-7



9 789592 077317