

Bioquímia

Volumen 28
Volume 28

Número 4
Number 4

Diciembre 2003
December 2003

Artículo:

Vainillina: agente inhibidor de la polimerización de la hemoglobina S

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

HEMATOLOGÍA

Vainillina: agente inhibidor de la polimerización de la hemoglobina S

Grisel del Toro García^{1*}, José E. Falcón Dieguez¹, Yamirka Alonso Geli¹,
Yolanda C. Valdés Rodríguez², Carlos A. Cabal Mirabal¹

¹ Departamento de Biofísica, Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n, 90500, Santiago de Cuba, Cuba. Fax: (53) (22) 686214, 632545. E. mail: grisel@cbm.uo.edu.cu, griseldeltoro@yahoo.ca

² Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana. Calle 222 y 23 No.250, La Coronela, La Lisa, La Habana, Cuba.

*Sobretiros: Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n, 90500, Santiago de Cuba, Cuba. E. mail: grisel@cbm.uo.edu.cu, griseldeltoro@yahoo.ca

Recibido: 05/08/03 Aceptado: 27/11/03

Resumen

La polimerización de la desoxihemoglobina S, caracterizada por el tiempo de demora o nucleación, constituye el evento fisiopatológico primario de la hemoglobinopatía SS o drepanocitemia. Aún no existe un tratamiento efectivo y se estudian compuestos que inhiban la polimerización de la hemoglobina S y la falciformación de los hematíes. La actividad inhibidora moderada del aditivo alimenticio 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) se evaluó *in vitro* a las razones molares (hemoglobina:vainillina) 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 y 1:8, mediante su efecto sobre el tiempo de demora utilizando la Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H). Para precisar la ausencia de actividad citotóxica de la vainillina sobre los hematíes SS se evaluó el efecto de las razones molares 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:8 y 1:10 sobre la liberación de hemoglobina comparando contra hematíes normales. La vainillina incrementó el tiempo de demora con un porcentaje de variación de 17±8% (1:4), 21±15% (1:5), 28±14% (1:6), 23±10% (1:7) y 35±26% (1:8), observándose un efecto dosis dependiente sobre el retardo de la polimerización. La prueba de comparación múltiple reportó diferencias no significativas entre las concentraciones de trabajo ($p>0.05$). Se obtuvo un porcentaje de hemólisis bajo con un pequeño aumento para la razón molar 1:10 al comparar con el resto ($p<0.05$), aunque no se obtuvo una tendencia de forma general en todo el estudio; demostrándose la ausencia de efectos citotóxicos para hematíes, su blanco de acción farmacológica.

Palabras clave: actividad hemolítica, antipolimerizante, hemoglobina S, polimerización, tiempo de demora, resonancia magnética, vainillina.

Introducción

La drepanocitemia o anemia drepanocítica es una enfermedad hereditaria de carácter homocigótico autosómico determinada por la sustitución del ácido glutámico (Glu) de posición 6 en las cadenas-*b* ($b^6_{\text{glu}} \rightarrow \text{val}$) por la valina (Val), dando lugar a la hemo-

Abstract

The desoxyhemoglobin S polymerization, characterized by the delay time or nucleation, constitutes the primary physiopathologic event of the sickle cell disease. An effective treatment doesn't still exist and they are studied compound that inhibit the hemoglobin S polymerization and the red cell sickling. The moderate antisickling activity of a food additive 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin), at 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 and 1:8 molar ratio (hemoglobin:vanillin), it was evaluated *in vitro* by means of their effect on the delay time using the Proton Nuclear Magnetic Resonance (RMN-¹H). To specify the absence of cytotoxic activity of the vanillin on sickle red blood cells it was evaluated the effect of the molar ratios (1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:8 and 1:10) on the hemoglobin liberation and it was compared with normal red blood cells. The vanillin increased the delay time and its variation percentage was 17±8% (1:4), 21±15% (1:5), 28±14% (1:6), 23±10% (1:7) and 35±26% (1:8), being observed a dose dependent effect on the retard of the polymerization. The test of multiple comparison reported non significant differences among the work concentrations ($p>0.05$). A low percentage of hemolysis was obtained with a small increase for the molar ratio 1:10 when compared with the rest ($p<0.05$). Although a tendency was not obtained in the whole study; being demonstrated the absence of cytotoxic effects for red blood cells, their target of pharmacological action.

Key words: antisickling, delay time, hemolytic activity, S hemoglobin, polymerization, magnetic resonance, sickle cell disease, vanillin.

globina S (HbS).¹ El tetramero de HbS resultante tiene menor afinidad por el O₂. Cuando se produce una disminución en la presión parcial de oxígeno (PO₂), es decir, estados de hipoxia, las moléculas de hemoglobina desoxigenadas (dHbS) se polimerizan formando estructuras microtubulares elongadas que rigidizan, distorsionan y disminuyen la flexibilidad de los

hematíes; provocando obstrucción en la microcirculación e hipoxia tisular.² Entre las manifestaciones clínicas de la drepanocitemia se destacan la anemia hemolítica crónica y las crisis vaso oclusivas (CVO) que cursan con dolor severo y daño multiorgánico.³⁻⁷

En la polimerización existe un tiempo de demora (td) o proceso de nucleación durante el cual las unidades de dHbS se asocian unas con otras para formar un núcleo crítico con la posterior adición de otras unidades.^{2,8,9} Estudios realizados por difracción de rayos X y microscopía electrónica sugieren que, en el polímero, los tetrámeros de dHbS se unen alrededor de un eje vertical formando anillos helicoidales espirales dando lugar a la formación de largas fibras.¹⁰⁻¹²

La cinética de polimerización de la HbS ha sido estudiada por nuestro grupo de investigación utilizando la Resonancia Magnética Nuclear de Relajación (RMN-¹H).¹³ Se observó una curva sigmoidal donde se representan tres etapas. La primera se corresponde con las moléculas de HbS en estado de disolución predominantemente; la segunda caracteriza el equilibrio existente entre las moléculas en solución y las que están formando el polímero (proceso de nucleación), los valores del tiempo de relajación spin-spin (T_2) comienzan a disminuir debido al rápido crecimiento y la posterior alineación de los polímeros de HbS, que provoca una disminución en la movilidad de las moléculas de agua con un consecuente aumento del tiempo de correlación. Y por último una tercera etapa donde predominan las formas poliméricas.¹³

La actividad inhibidora de la polimerización (antipolimerizante) mostrada por aldehídos aromáticos y otros compuestos ha sido informada por otros autores.¹⁴⁻²⁰ La vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) tiene una actividad antipolimerizante moderada; su grupo carbonilo (CO) reacciona con los grupos amino (NH_2) libres de la Hb intracelular a través de una adición nucleofílica para formar una base Schiff (Hb-N=CH-R).^{14,16} Los estudios realizados por cromatografía líquida de alta presión, enfoque isoelectrónico y RMN sugieren que estos efectos se deben a una modificación covalente de la Hb.^{16,21-23}

Los efectos tóxicos de la vainillina han sido estudiados mediante pruebas de mutagénesis y de carcinogénesis,²⁴ sin embargo, hasta la fecha no se había evaluado su probable efecto citotóxico sobre los hematíes, aspecto de suma importancia por cuanto estas células constituyen su blanco de acción farmacológica.

Atendiendo a estos criterios y a la anemia hemolítica crónica que caracteriza a la hemoglobinopatía SS se determinó, mediante estudios *in vitro*, el efecto no citotóxico de la vainillina

para diferentes razones molares, y su actividad como inhibidor de la polimerización utilizando razones molares superiores a las estudiadas anteriormente.

Material y Métodos

Preparación de las muestras y soluciones

Las muestras de sangre procedentes de pacientes con drepanocitemia y de donantes de sangre voluntarios fueron tomadas en el Laboratorio Clínico del Hospital General Santiago, en Santiago de Cuba, previo consentimiento informado. Para el lavado de las células y la preparación de las soluciones se utilizó una solución amortiguadora (PBS) pH 7.4.

La sangre total heparinizada se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min, el precipitado celular fue sometido a tres lavados consecutivos con PBS pH=7.4 y se midió el pH. Para determinar la concentración de Hb se utilizó el método de la cianometahemoglobina en un espectrofotómetro Ultrospec III (Pharmacia). Conociendo la concentración de Hb en la muestra se calculó la cantidad de vainillina necesaria para establecer razones molares entre la Hb y la vainillina, cumpliéndose que moles Hb: moles vainillina [n·(moles hemoglobina)], donde n = 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 10, es decir 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 y 1:10. Una vez pesada la vainillina fueron preparadas soluciones hidroalcohólicas diluyendo en 100 μ L de etanol (Alfa Aesar) y añadiendo PBS hasta alcanzar un volumen de 1 mL.

El estudio por RMN se realizó en hemolisado de hematíes HbS. Para la obtención del hemolisado, las células fueron sometidas a -4°C durante 15 min., seguida de una centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Este proceso se repitió una vez más y posteriormente se determinó la concentración de Hb. En el hemolisado se controló el pH y se tomaron alícuotas de 1.5 mL las que se almacenaron a 4°C hasta el momento del ensayo.²³

Para evaluar la actividad hemolítica se partió del paquete celular lavado y se estudiaron las razones molares 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:8, 1:10 (hematíes con HbSS) y 1:1, 1:4, 1:8, 1:10 (hematíes con Hb AA). Se preparó un control positivo de actividad hemolítica (0.1 % de Na_2CO_3), un control negativo (PBS pH 7.4) y un control negativo (0) al que se le añadió la solución vehículo.²⁵

Medición por RMN

Para determinar el efecto de la vainillina sobre la polimerización de la HbS, se añadieron 20 μ L de solución hidroalcohólica de vainillina (Panreac) a cada una de las muestras previamente almacenadas según la razón molar de trabajo; para el control, negativo(0), se utilizaron 20 μ L de la solución hidroalcohólica

$V_f = 10 \text{ mL}$	(mL)	PBS pH=7.4 (mL)	Concentrado celular diluido (mL)	Solución de vainillina (mL)	Solución vehículo (mL)
Control positivo	9.8	—	0.2	—	—
Control negativo	—	9.8	0.2	—	—
Control negativo (*)	—	9.79	0.2	—	0.01
Razón molar	—	9.79	0.2	0.01	—

Cuadro 1. Soluciones utilizadas en la determinación de la actividad hemolítica. Control positivo Na_2CO_3 , control negativo PBS pH=7.4, control negativo (*) correspondiente a la solución vehículo. Los hematíes SS fueron tratados con soluciones de vainillina para las razones molares 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:8, 1:10 y los normales para 1:1, 1:4, 1:8, 1:10.

(vehículo). De cada uno de estos preparados se tomaron 400 μL y se depositaron en ámpulas de RMN (tres réplicas por razón molar) las cuales se mantuvieron en un baño de agua a 36°C durante el tiempo de medición. Se midió un patrón de HbS en cada ensayo.^{21,23}

Se midió el tiempo de relajación spin-spin (T_2), en el Relaxómetro Giromag 01® (diseñado y construido en el Centro de Biofísica Médica de la Universidad de Oriente, Santiago de Cuba), con la serie de impulsos 90°- τ -180° (Hahn) a la frecuencia 4 MHz.¹³ Se reporta un 5% de error sistemático y un rango de 3-9% de error aleatorio en la medición de T_2 y determinación del td.²¹

Los datos obtenidos se graficaron utilizando el *Microcal Origin*. La curva sigmoidal de la variación temporal de T_2 que describe la cinética del proceso de polimerización fue ajustada y normalizada en un rango de 0 a 1 para facilitar la diferenciación del td entre las muestras. Se realizó un ajuste por regresión lineal y se determinó el valor del td, a partir del cual se ha reportado que se inicia el crecimiento rápido e irreversible de los polímeros. La influencia de la concentración del compuesto en la polimerización se evaluó a partir del cálculo del porcentaje de variación de td (%Vtd) para cada razón molar (rm) con relación al patrón (pat). (1)

$$\% Vtd = \frac{td(rm) - td(pat)}{td(pat)} \times 100 \quad (1)$$

Determinación de la actividad hemolítica

Se tomó 1 mL del paquete celular y se diluyó con PBS (pH=7.4) hasta un volumen final (V_f) de 10 mL, de aquí se tomaron 0.2 mL que se añadieron a cada uno de los preparados como se muestra en el Cuadro 1.²⁵

Se agitaron las muestras, se dejaron reposar 30 min, posteriormente se centrifugaron, se tomó el sobrenadante y se midió la absorción a $\lambda=545 \text{ nm}$ (espectrofotómetro Ultrospec III, Pharmacia), detectando así la liberación de Hb. Se calculó el

porcentaje de hemólisis provocado (%H) utilizando los valores de absorción:²⁵

$$\% H = \frac{A_m - A_{cn}}{A_{cp} - A_{cn}} \times 100 \quad (2)$$

Donde: A_m (absorción de la muestra), A_{cn} (absorción del control negativo), A_{cp} (absorción del control positivo).

Los valores obtenidos por ensayo fueron promediados para cada razón molar y se graficaron en Microsoft Excel 97, obteniendo las curvas de actividad hemolítica por razón molar y la curva promedio para cada prueba. Se compararon las medias (Statgraphics Plus 2.1) con la prueba de rangos múltiples, el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba Kruskal-Wallis con un nivel de significancia al 95%.

Resultados

Acción antipolimerizante

Todas las muestras, patrones (HbS) y tratadas (HbS+vainillina), reprodujeron la curva de variación temporal de T_2 . En todos los casos tratados con vainillina se obtuvo un efecto inhibitorio sobre la polimerización a través del aumento del td de la nucleación vs los controles. Este aumento estuvo relacionado con el aumento de la concentración de la vainillina. En la Figura 1a se muestran los resultados de un ensayo, donde el td del patrón fue de 370 minutos; para las razones molares 1:4 y 1:6 se obtuvo un aumento de 1.08 y 1.24, respectivamente. El aumento del td para 1:5, 1:7 y 1:8 fue de 1.14, 1.29 y 1.41, respectivamente; donde el patrón tuvo un td igual a 414 minutos (Figura 1b).

El td tanto en los patrones como en las muestras tratadas con vainillina mostró un comportamiento diferencial entre las repeticiones de un mismo ensayo. Se realizaron curvas comparativas entre los valores del td para 1:5 y 1:8 con sus respectivos patrones de HbS (Figuras 2a, b), observándose un aumento de td en 1.49 y 1.18 para 1:5; y en 1.82 y 1.52 para 1:8. La

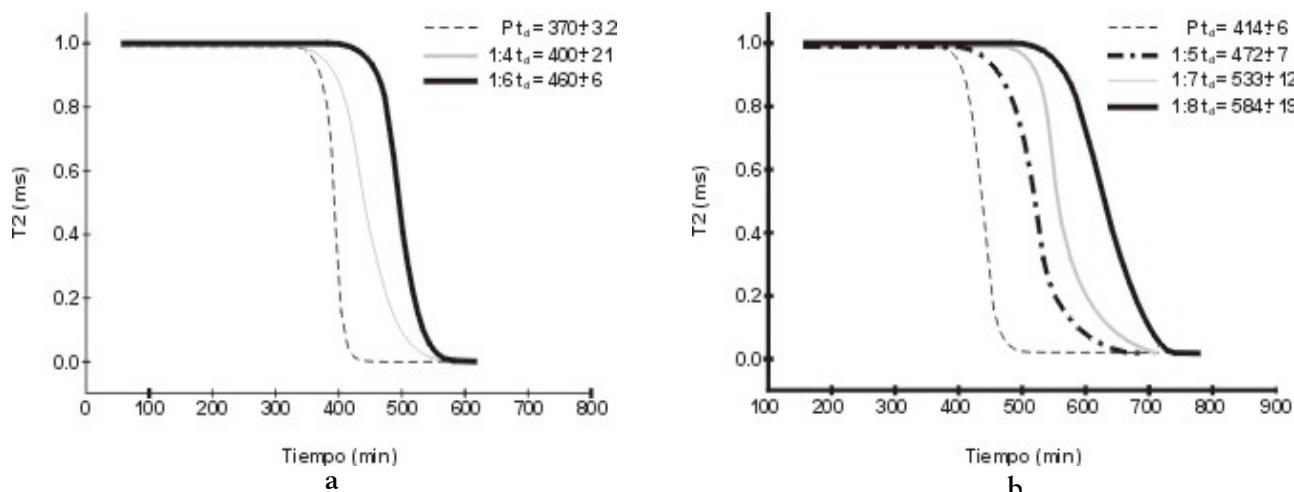


Figura 1. Polimerización de la HbS para los patrones (P) y las muestras tratadas con vainillina. Curvas normalizadas y promediadas a partir de la variación temporal del tiempo de relajación spin-spin (T_2) medida en el Relaxómetro Giromag 01®. Los valores de T_2 se expresan en milisegundos (ms) y el tiempo de medición en minutos (min). Se muestra el valor medio del tiempo de demora (td) en minutos y su desviación estándar.

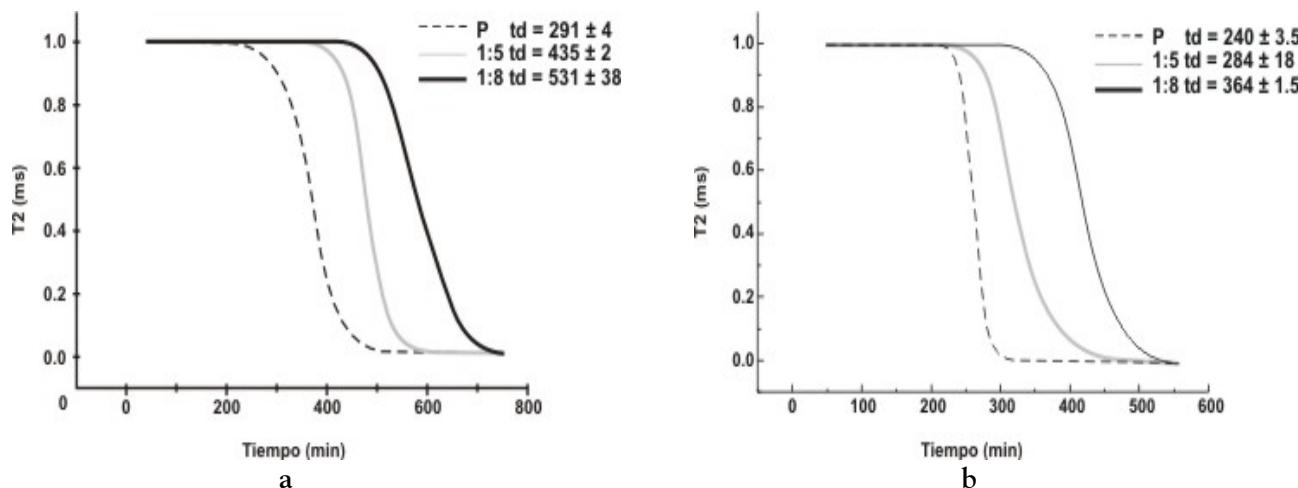


Figura 2. Comparación de los promedios del td para los patrones (P) y las muestras tratadas con vainillina a 1:5 y 1:8. El procesamiento de las curvas similar al descrito en la Figura 1.

a: Con relación al td del patrón se obtuvo en este ensayo un incremento del td en 1.49 y 1.82 para 1:5 y 1:8, respectivamente.
b: El td aumentó en 1.18 para 1:5 y 1.52 para 1:8.

relación entre el td de las muestras tratadas con vainillina y el de los patrones (td muestra/td P) aumentó progresivamente desde la razón molar 1:4 hasta 1:8.

Se calculó el %Vtd (1) para cada una de las muestras medidas con relación a su patrón de HbS, se calculó el valor promedio por razón molar entre todos los experimentos realizados y se obtuvo: 1:4 17±8%, 1:5 21±15%, 1:6 28±14%, 1:7 23±10% y 1:8 35±26%. La prueba de comparación multiple reportó diferencias no significativas entre las medias para las razones molares estudiadas ($p>0.05$) (Figura 3). Se realizó un análisis comparativo entre los resultados obtenidos en este trabajo y los datos para las razones molares

1:1 (3.5±1.5%), 1:2 (8±2.4%) y 1:10 (21±6.5%) estudiadas anteriormente,²³ obteniendo diferencias significativas con relación a 1:1 y 1:2 ($p<0.05$). Al comparar estas con 1:10 y con los datos obtenidos para las concentraciones 1:11, 1:13, 1:15 (datos no presentados) se obtuvieron diferencias no significativas ($p>0.05$).

Actividad hemolítica

En el estudio realizado no se encontró actividad hemolítica de la vainillina sobre los hematíes. En las pruebas efectuadas sobre los hematíes con HbSS los mayores valores del porcentaje de hemólisis promedio %H calculado, 5.46 y 5.94%, se obtuvieron

en una sola prueba, correspondientes a 1:8 y 1:10, respectivamente. El %H por concentración se movió en un rango de $0.23 \pm 0.4\%$ – $1.69 \pm 2.0\%$ (Figura 4a). Al comparar las razones molares estudiadas según el %H promedio no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre 1:1, 1:2, 1:4, 1:5 y 1:8; así como entre 1:8 y 1:10 ($p > 0.05$). Se realizó una prueba de rangos múltiples obteniéndose para la razón molar 1:10 un pequeño aumento de la hemólisis en comparación con el resto ($p < 0.05$).

En la Figura 4b se muestra una comparación del %H promedio entre los hematíes SS y los de donantes voluntarios (normales AA), para 1:1, 1:4, 1:8 y 1:10. Sólo se encontró un moderado aumento en la liberación de Hb en 1:10 para los hematíes SS. La hemólisis observada en ambos ensayos, con hematíes procedentes de donantes voluntarios y de pacientes con drepanocitemia, se corresponde con una actividad hemolítica basal que pudiera ser inherente a la preparación de las muestras. Al comparar los valores promedios $0.64 \pm 0.7\%$ y $0.24 \pm 0.3\%$, para los hematíes SS y AA respectivamente, se infiere que la actividad hemolítica de la vainillina fue baja para ambos grupos celulares.

Discusión

Los resultados mostrados complementan los primeros estudios realizados por Zaugg¹⁴ (1977) y Abraham¹⁶ (1991), que informaron la moderada actividad inhibidora o antipolimerizante de la vainillina a través de su doble modo de acción: desplaza hacia

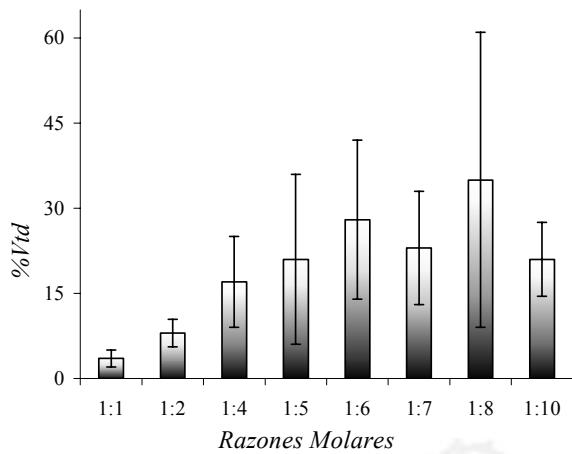
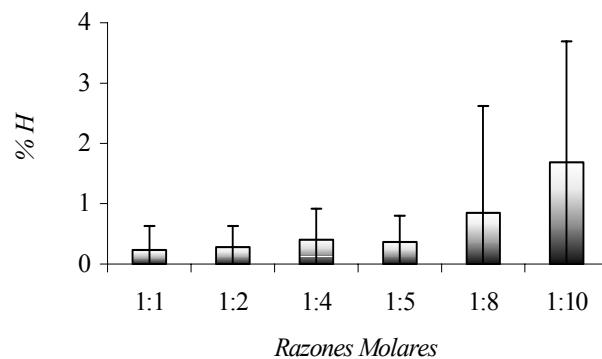


Figura 3. Comparación entre el porcentaje de variación del td (%Vtd) de las muestras de HbS tratadas con vainillina para las razones molares de trabajo (1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8) y las estudiadas anteriormente (1:1, 1:2 y 1:10).²⁶ Se obtuvieron diferencias significativas de las concentraciones de trabajo con relación a 1:1 y 1:2 ($p < 0.05$), y no significativas con relación a 1:10 ($p > 0.05$). Los valores del %Vtd comparados fueron 1:1 (3.5 ± 1.5%), 1:2 (8 ± 2.4%), 1:10 (21 ± 6.5%), 1:4 (17 ± 8%), 1:5 (21 ± 15%), 1:6 (28 ± 14%), 1:7 (23 ± 10%) y 1:8 (35 ± 26%).

la izquierda la curva de disociación del oxígeno aumentando el número de moléculas de HbS en estado soluble (R) y como producto HbS-vainillina actúa estereoespecíficamente.^{14,16} El incremento del td pudiera estar relacionado con la inhibición de los sitios de contacto intermoleculares al ocurrir el enlace covalente entre la vainillina y la Hb. Al inhibirse los sitios de contacto, la polimerización se interrumpe y el proceso se hace más lento; las moléculas de HbS permanecen por un tiempo mayor en estado soluble, es decir aumenta la solubilidad de la Hb y su afinidad por el oxígeno. No obstante la reacción entre la vainillina y la HbS es reversible, y a partir de un tiempo de demora mayor comienza la polimerización y se manifiestan las próximas etapas del proceso.^{21,23}

Las diferencias observadas entre triplicados y entre experimentos pudieran estar relacionadas con el procedimiento técnico empleado para las determinaciones y/o con las diferencias intraindividuales de cada paciente con respecto a la fisiopatología de la enfermedad y a los parámetros

a



b

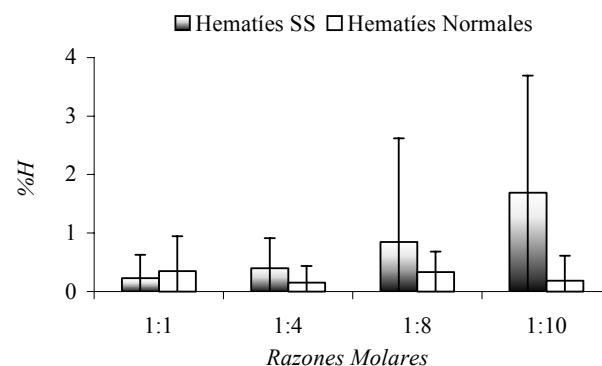


Figura 4. Efecto hemolítico de la vainillina sobre hematíes SS y normales.

Los datos representan el promedio de todas las pruebas por razón molar con sus barras de desviación estándar.

a: Porcentaje de hemólisis promedio (%H) sobre los hematíes SS obtenido para cada razón molar.

b: Comparación entre el %H obtenido para los hematíes SS y los normales para 1:1, 1:4, 1:8 y 1:10. No se observó diferencia estadísticamente significativa en la actividad hemolítica entre ambos grupos celulares ($p > 0.05$), excepto para la razón 1:10.

hematológicos, como la concentración efectiva de HbS:HbF.²⁶ La polimerización es dependiente de la concentración de HbS, a una temperatura constante al aumentar la concentración de dHbS, se llega a un punto de saturación por encima del cual la Hb deja de encontrarse disuelta y forma el polímero. Existen evidencias sobre la inhibición de la polimerización por la HbF e interfiere con la copolimerización de los tetrameros $\alpha_2\gamma_2$, tendiendo a formar tetrameros híbridos asimétricos $\alpha_2\beta^*\gamma_2$.^{27,28} La baja probabilidad de copolimerización puede ser interpretada como efecto desestabilizador en los puntos de contacto intermoleculares de la doble hélice, pudiendo ser una de las causas de la diferencia en la concentración de Hb de las muestras basales empleadas en cada ensayo y las diferencias en el td de la muestra patrón.^{28,29}

No obstante, a pesar de las variaciones encontradas, resulta indiscutible el efecto antipolimerizante de la vainillina. En las Figuras 1 y 2 puede observarse como la vainillina interactúa con la HbS y aumenta el td de la polimerización, existiendo una relación directa entre el aumento y la concentración. Considerando los sitios de enlace de la HbS con la vainillina es probable que a las concentraciones estudiadas ocurra una saturación, corroborando lo informado por Abraham¹⁶ (1991) quien planteó que la razón molar 1:2 sería necesaria para lograr un 100% de modificación de la HbS debido al eje de simetría doble que corta el tetramero, lográndose un 50% de modificación con la razón 1:1.¹⁶ Sin embargo, al aumentar la concentración hasta 1:6 se incrementa linealmente el %Vtd, disminuye en 1:7 y se aumenta nuevamente para 1:8. Puede suceder que los sitios de contactos entre la Hb y el compuesto se saturen, no ocurran cambios en el td y al aumentar la concentración se establezca un equilibrio entre las moléculas en solución y las enlazadas. Esta puede ser una de las razones por la cual a las concentraciones estudiadas se aprecia un efecto retardador del td sin mostrar una diferencia estadísticamente significativa al compararlas, aunque sí hay diferencia con relación a las concentraciones 1:1 y 1:2 informadas anteriormente.²³

En la drepanocitemia los cambios morfológicos celulares, la resistencia a factores externos, así como la gravedad de expresión de las crisis dolorosas recurrentes y la hemólisis crónica, varían entre individuos y parece ser que el número de células irreversiblemente falciformes circulantes determina el componente hemolítico.³⁰ Los hematíes con HbSS o drepanocitos, debido a la polimerización, son más rígidos y frágiles que los normales, por estar sometidos a cambios intracorpúsculares que causan pérdida de su elasticidad. Su destrucción consiste en la lisis intravascular debida a la fragilidad mecánica aumentada; y la extracción por retención y fagocitosis en el sistema reticuloendotelial, con un tiempo de vida medio de aproximadamente 60 días.³¹ Considerando estos factores los efectos hemolíticos de la vainillina sobre los hematíes SS se

corresponden con una actividad hemolítica basal, pues el porcentaje de hemólisis fue =1-2%; teniendo en cuenta que la hemólisis en los pacientes drepanocíticos puede alcanzar valores de hasta el 40% por las características propias de la enfermedad. Si la vainillina retarda la polimerización de la HbS inhibe a su vez la transformación de los hematíes hacia la forma de hoz o drepanocito, disminuyendo su fragilidad y el componente hemolítico. Esto nos lleva a sugerir la ausencia de efectos citotóxicos de la vainillina para hematíes, su blanco de acción farmacológica, y su beneficio clínico.

Aunque se produce un aumento del tiempo de demora hasta la relación molar 1:6 indicando un efecto concentración-dependiente de la vainillina no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar con razones molares mayores, lo cual pudiera deberse a la saturación de los sitios de enlace. Considerando la ausencia de efectos hemolíticos y la moderada actividad antipolimerizante de la vainillina, sugerimos la introducción de concentraciones =1:4 para la evaluación de sus propiedades terapéuticas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los médicos, técnicos y enfermeras del Hospital General Santiago y a los investigadores del Departamento de Biofísica del Centro de Biofísica Médica, en Santiago de Cuba; al Centro de Estudios para las Investigaciones y las Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos, al Departamento de Neurofísica del Centro de Neurociencias de Cuba y al diseñador gráfico Hubert Delestre, en Ciudad de la Habana.

Referencias

1. Lehninger AL Bioquímica. Tomo I. Ciudad de la Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1981. p. 150.
2. Eaton WA, Hofrichter J, Ross PD. Delay time of gelation: a possible determinant of clinical severity in sickle cell disease. *Blood* 1976; 47: 621-627.
3. Císcar F, Farreras P. Diagnóstico Hematológico. Tomo II Barcelona: Editorial JIMS; 1972. p. 1387-1388, 1390, 1422-1426.
4. Dean J and Schechter AN. Sickle cell anemia: molecular and cellular bases of therapeutic approaches. *N Engl J Med* 1978; 299: 752-763, 804-811, 863-870.
5. Serjeant GR. Sickle Cell Disease. 2nd ed. Great Britain: Oxford Medical Publications; 1992. p. 56, 61, 71-77, 120-366.
6. Colombo B, Guerchicoff E, Martínez G. Genética y clínica de las hemoglobinas humanas. 1a ed. Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1993. p. 146-195.
7. Espinosa E. La anemia drepanocítica en Cuba. Experiencia de 30 años. *Rev Cub Hematol Inmunol Hematol* 1996; 12: 97-105.
8. Eaton WA and Hofrichter J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood* 1987; 70: 1245-1266.

9. Eaton WA and Hofrichter J. Sickle cell hemoglobin polymerization *Adv Protein Chem* 1990; 40: 67-68, 80-110, 157-175.
10. Kaperonis AA, Handley DA, Chien S. Fibers, Crystals and other forms of HbS polymers in deoxygenated sickle erythrocytes. *Am J Hematol* 1986; 21: 269-275.
11. Rodgers DW, Crepeau RH and Edelstein SJ. Pairings and polarities of the 14 strands in sickle cell hemoglobin fibers. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 6157-6161.
12. Xianfeng Li. Mutational analysis of sickle haemoglobin (Hb) gelation. *Biotechnol Appl Biochem* 1999; 29: 165-184.
13. Losada J, Guilart F, Cabal CA. NMR relaxation study of sickle cell disease. *Proceedings of the XXIV AMPERE Congress Magnetic Resonance and Related Phenomena*: Poznañ; 1988.p. 1027-1030.
14. Zaugg RM, Walder JA and Klotz IM. Schiff base adducts of hemoglobin. *J Biol Chem* 1977; 252: 8542-8548.
15. Bedell CR, Kneen G, White RD. The antisickling activity of a series of aromatic aldehydes. *Br J Pharmacol* 1979; 66: 70.
16. Abraham DJ, Mehanna AS, Wireko FC, Whitney J, Thomas RP and Orringer EP. Vanillin, a potential agent for the treatment of sickle cell anemia. *Blood* 1991; 77: 1334-1341.
17. Abraham DJ. Design, synthesis and testing of potential antisickling agents. 1. Halogenated benzylxy and phenoxy acids. *J Med Chem* 1982; 25: 1015-1017.
18. Abraham DJ. Design, synthesis and testing of potential antisickling agents. 4. Structure-activity relationships of benzylxy and phenoxy acids. *J Med Chem* 1984; 27: 967-978.
19. Merret ME, Stammers DK, White RD, Wootton R, Kneen G. Characterization of the binding of the antisickling compound, BW12C, to haemoglobin. *Biochem J* 1986; 239: 387-392.
20. Orringer EP, Blythe DS, Whitney JA, Brockenbrough S, Abraham DJ. Physiologic and rheologic effects of the antisickling agent ethacrynic acid and its N-butylated derivative on normal and sickle erythrocytes. *Am J Hematol* 1992; 30: 39-44.
21. Alvarez ED, Cabal CA, Fernández AA, Soler C, Lores M, Del Toro G. IE-HPLC and NMR relaxometry demonstrate a potential roll for vanillin in sickle cell disease. *Avan Biotec Mod* 1997; 4: E6.
22. Abdala JC, Soler C, Fernández AA, Alvarez ED, Del Toro G. Estudio de la interacción de compuestos carbonilos con hemoglobinas *in vitro*. Valoración de su efecto antisickling. *Rev Cub Quim* 1996; 8:3-10.
23. Del Toro G, Pozo AR, Rodríguez JC, Fernández AA, Soler C. Influencia del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) en la polimerización de la hemoglobina S (HbS). *Rev Cub Quim* 2002; 14: 59-64.
24. Ohta T. Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives. *Critical Rev Toxicol* 1993; 23: 127-146.
25. Stanley HR. Toxicity testing of dental materials. 1st ed. Florida: CRC Press Inc; 1985. p.17-22.
26. Bailey K, Morris JS, Thomas P, Serjeant GR. Fetal haemoglobin and early manifestations of homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child* 1992; 67: 517-520.
27. Nagel RL, Bookchin RM, Johnson J, Labie D, Wajcman H, Isaac-Sodeye WA, et al. Structural bases of the inhibitory effects of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 76: 670-672.
28. Rodgers GP. Pharmacologic modulation of fetal hemoglobin. Sickle cell disease: basic principles and clinical practice. 1st ed. New York: Raven Press, Ltd; 1994. p. 829-843.
29. Bun HF. Induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease. *Blood* 1999; 93:1787-1789.
30. Mohandas N and Evans E. Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cell: Requirement for both cell membrane changes and plasma factors. *Blood* 1984; 64:282-287.
31. Ballas S and Smith ED. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. *Blood* 1992; 79:2154-2163.