

## Bioquimia

Volumen **29**  
Volume

Número **1**  
Number

Enero-Marzo **2004**  
January-March

*Artículo:*

Actividad antidrepanocítica de la  
vainillina sobre hematíes de un paciente  
con drepanocitemia por microscopía  
electrónica de transmisión

Derechos reservados, Copyright © 2004:  
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](#)



[www.Medigraphic.com](http://www.Medigraphic.com)

# Actividad antidrepanocítica de la vainillina sobre hematíes de un paciente con drepanocitemia por microscopía electrónica de transmisión

Grisel del Toro García,\* Yolanda C Valdés Rodríguez,\*\* María C de la Rosa Graell,\*\*\*  
Viviana Falcón Cama,\*\*\* Carlos A Cabal Mirabal\*

## RESUMEN

La polimerización de las moléculas de desoxihemoglobina S es el evento fisiopatológico primario en la anemia drepanocítica. Los hematíes distorsionados obstruyen los vasos de menor calibre de la microcirculación, provocando una oxigenación tisular deficiente. En la búsqueda de un potencial agente terapéutico se han realizado estudios por cromatografía, electroforesis y resonancia magnética que mostraron la moderada actividad de la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) en la inhibición de la polimerización de la desoxihemoglobina S. En este trabajo se presenta una evaluación *in vitro* de la acción de la vainillina sobre los hematíes de un paciente con drepanocitemia utilizando la microscopía electrónica de transmisión. Los hematíes con hemoglobina S fueron incubados por períodos de 5 y 24 h con una solución hidroalcohólica de vainillina, estableciendo una razón molar (hemoglobina S: vainillina) de 1:4. Se utilizaron muestras controles de hematíes con hemoglobina SS para los tiempos 0, 5 y 24 h y una muestra de hematíes con hemoglobina normal AA. Las microfotografías obtenidas mostraron la formación de las fibras de los polímeros de desoxihemoglobina S en las muestras controles SS (tiempos 0, 5 y 24 h). En las muestras tratadas con la vainillina no se observaron fibras en numerosos hematíes y sí una tendencia al incremen-

## ABSTRACT

*The polymerization of the S deoxyhemoglobin molecules is the primary physiopathologic event in the sickle cell disease. The distorted red cells obstruct the vases of smaller caliber of the microcirculation, causing a faulty oxygenation of the tissues. In the search of a potential therapeutic agent they have been carried out studies by chromatography, electrophoresis and magnetic resonance that showed the moderate antisickling activity of vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde). In this work is presented an in vitro evaluation of the vanillin action on the red blood cells of patient with sickle cell disease using the transmission electron microscopy. The sickle cells were incubated by periods of 5 h and 24 h with a vanillin hydroalcoholic solution, establishing a 1:4 molar ratio (S hemoglobin:vanillin). Were used sickle cells controls for the times 0, 5 h and 24 h and a sample with normal AA red cells. The obtained microphotographs showed the formation of the fibers of the S deoxyhemoglobin polymers in the sickle controls samples (times 0, 5 and 24 h). In the samples tried with the vanillin fibers they were not observed in numerous cells and were observed a tendency to the increment of the cells number in helical biconcave state. The inhibition in the formation of the fibers of S deoxyhemoglobin polymers observed in this study corroborates the reports*

\* Departamento de Biofísica, Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente.

\*\* Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana.

\*\*\* Departamento de Microscopía Electrónica. División Química Física. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Departamento e Institución a los que se atribuye el trabajo: Departamento de Biofísica, Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n, 90500, Santiago de Cuba, Cuba. Fax: (53) (22) 686214, 632545.

### Correspondencia:

Lic. Grisel del Toro García

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

Apoyo material y financiero para el desarrollo de las investigaciones suministrado por: Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Proyecto Territorial del Ministerio de Ciencias, Tecnología y Medio Ambiente.

Recibido: 05-08-2003

Aceptado: 19-02-2004

to del número de hematíes en estado bicóncavo helicoidal. La inhibición de la formación de las fibras de los polímeros de desoxihemoglobina S observada en este estudio corrobora los reportes sobre la moderada actividad antidrepanocítica de la vainillina sugiriendo un posible modo de acción a través de la inhibición de los sitios de contacto en el polímero.

**Palabras clave:** Hematíe S, drepanocitemia, microscopía electrónica, polimerización de la hemoglobina S, vainillina.

## INTRODUCCIÓN

El empleo del microscopio electrónico ha posibilitado el estudio de la ultra estructura del hematíe empleando diversas técnicas como la de sombreado, réplica, tinción negativa, fijación y corte. Por difracción de rayos X y microscopía electrónica se han estudiado los polímeros de desoxihemoglobina S (dHbS), observando un ensamblamiento helicoidal complejo de 14 trenzas de moléculas de dHbS (con un núcleo central de 4 trenzas y 10 externas rodeándolas) donde cada fibra está compuesta de 7 pares de moléculas en un empaquetamiento aproximadamente hexagonal.<sup>1-4</sup> Durante la interacción proteína-proteína de las moléculas de dHbS ocurren fuertes interacciones hidrofóbicas entre la *Valβ6*, la *Pheβ85* y la *Leuβ88* de moléculas adyacentes, las cuales distorsionan la estructura ordenada formada por moléculas de agua circundantes; así como interacciones con otros contactos donde interviene el puente de hidrógeno entre la *Thrβ4* de la subunidad donante y la *Aspβ73* del sitio aceptor del polímero, formando un complejo con una estructura ordenada.<sup>5-7</sup> Los hematíes disminuyen su flexibilidad y se distorsionan formando los drepanocitos, cuya presencia en sangre periférica es la causa de todas las manifestaciones clínicas y hematológicas de la anemia drepanocítica o drepanocitemia, como consecuencia de la excesiva destrucción eritrocitaria e hiperplasia del sistema eritropoyético.<sup>8-10</sup>

Una de las principales vías de acción para un tratamiento efectivo contra esta anemia hemolítica congénita es inhibir los sitios de contacto intermoleculares para frenar la polimerización.<sup>11-14</sup> La electroforesis y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) han demostrado la actividad inhibidora del aldehído aromático 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) a través de una reacción de adición nucleofílica con la hemoglobina (Hb) intracelular.<sup>15-18</sup> Los estudios previos por resonancia magnética nuclear (RMN) reportaron que la vainillina incrementa de forma lineal el tiempo de demora (td) de la polimerización de la dHbS en dependencia de su concentración y que a mayores concentraciones ocurre la saturación de los sitios de enlace con la Hb, no existiendo diferencias

on the moderate antisickling activity of vanillin suggesting a possible mode of action through the inhibition of the polymer contact sites.

**Key words:** Electron microscopy, sickle cell disease, S hemoglobin polymerization, red blood cell, vanillin.

significativas en el porciento de variación del td.<sup>17-20</sup> La vainillina, aldehído aromático de olor agradable, es un saborizante presente en los alimentos.<sup>21-23</sup>

Considerando que la gravedad de expresión de las manifestaciones hematológicas varía entre individuos y que el número de células irreversiblemente falciformes circulantes determina el componente hemolítico, en el presente trabajo se estudia la actividad antidrepanocítica de la vainillina (razón Hb:vainillina 1:4) sobre los hematíes de un paciente con drepanocitemia utilizando la microscopía electrónica de transmisión (MET).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Preparación de las muestras

Las pruebas se realizaron en concentrados de hematíes obtenidos a partir de 20 mL de sangre total heparinizada de un paciente con drepanocitemia, suministrada por el Laboratorio Clínico del Instituto Nacional de Hematología e Inmunología. La sangre total se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min, se separó el plasma, el paquete celular fue sometido a tres lavados consecutivos con una solución amortiguadora (PBS) a pH = 7.4 y se determinó la concentración de Hb por el método de la cianometahemoglobina (Ultraspec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB).<sup>24,25</sup> Se preparó 1 mL de solución hidroalcohólica (Etanol/PBS) de vainillina, 0.15M (Panreac) (C1).<sup>20</sup>

### Acción antidrepanocítica

Se añadieron 50  $\mu$ L de C1 a 1 mL del paquete celular con HbS (2 mM), para una razón molar 1:4, y se incubó por períodos de 5 y 24 h. La vainillina reaccionó con la HbS a 8 mM. Se tomaron muestras con HbS como controles para los tiempos  $t_0$ ,  $t_{5h}$  y  $t_{24h}$  y una muestra de hematíes con Hb normal AA.

### Microscopía electrónica de transmisión

Una vez tratadas con el compuesto, las muestras se fijaron con glutaraldehído al 3.2% durante 1 h, se la-

varon con amortiguador cacodilato tres veces durante 20 min, se posfixaron con tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 2% durante 1 h y se lavaron con amortiguador cacodilato dos veces durante 5 min, todos estos procedimientos se llevaron a cabo a 4°C. Se procedió a la deshidratación en alcohol absoluto de concentraciones crecientes (30, 50, 70, 80, 90 y 100%), infiltración e inclusión en la resina Spurr. Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo Nova (L.K.B.), se montaron en rejillas de 400 mesh y se contrastaron con sales de acetato de uranilo y citrato de plomo. La observación y toma fotográfica se realizaron en un microscopio electrónico (Jeem 2000 EX, Jeol), con un voltaje de aceleración de 80.0 kV.

## RESULTADOS

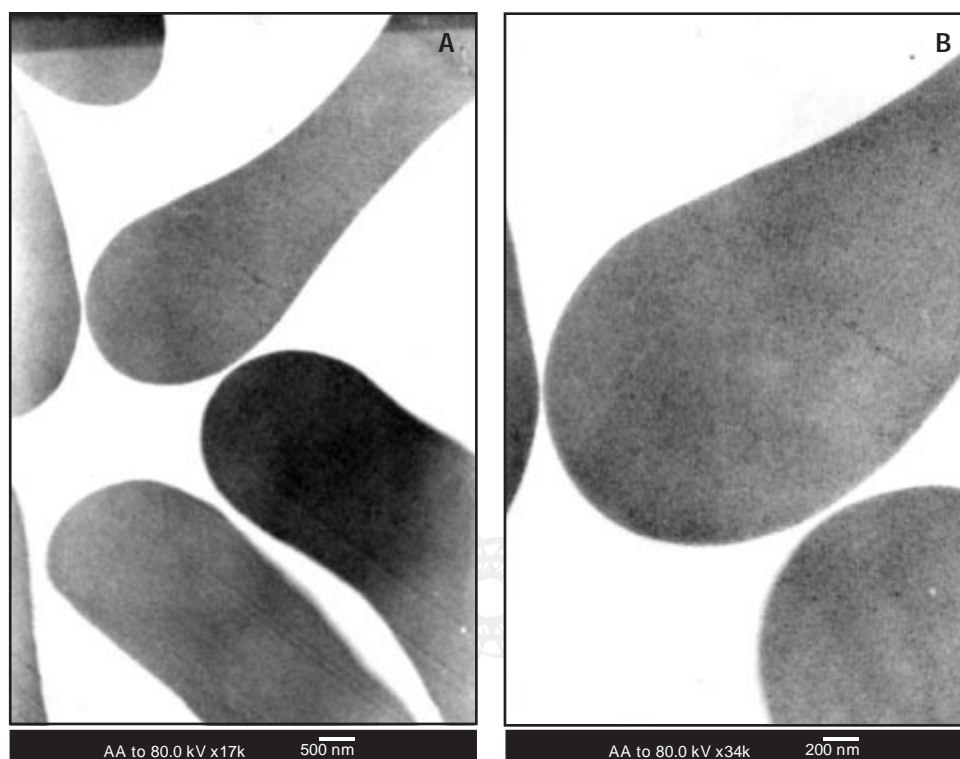
Las microfotografías realizadas a las muestras con Hb normal AA fijadas en el tiempo inicial ( $t_0$ ) se presentan en la *figura 1* (A y B). Se observó en todas las muestras la forma de disco bicóncavo característica de los hematíes con una estructura interior homogénea compuesta en su mayoría por los tetrámeros de hemoglobina en solución. En las microfotografías realizadas a las muestras controles con HbS, para los tiempos  $t_0$ ,  $t_{5h}$  y  $t_{24h}$  (*Figura 2*, A, B, C y D) se obser-

varon hematíes morfológicamente diferentes a los normales, completamente falciformes y mostrando una diversa variedad en sus formas. La mayoría de las células contenía en su interior unas estructuras largas en forma de “pelos” o fibras, distribuidas irregularmente, predominando una orientación en forma de dominios hacia los extremos de la célula deforme. Según ha sido descrito en la literatura estas fibras constituyen una organización compleja de los polímeros de dHbS,<sup>3</sup> diferenciándose de la estructura homogénea observada en los hematíes normales.

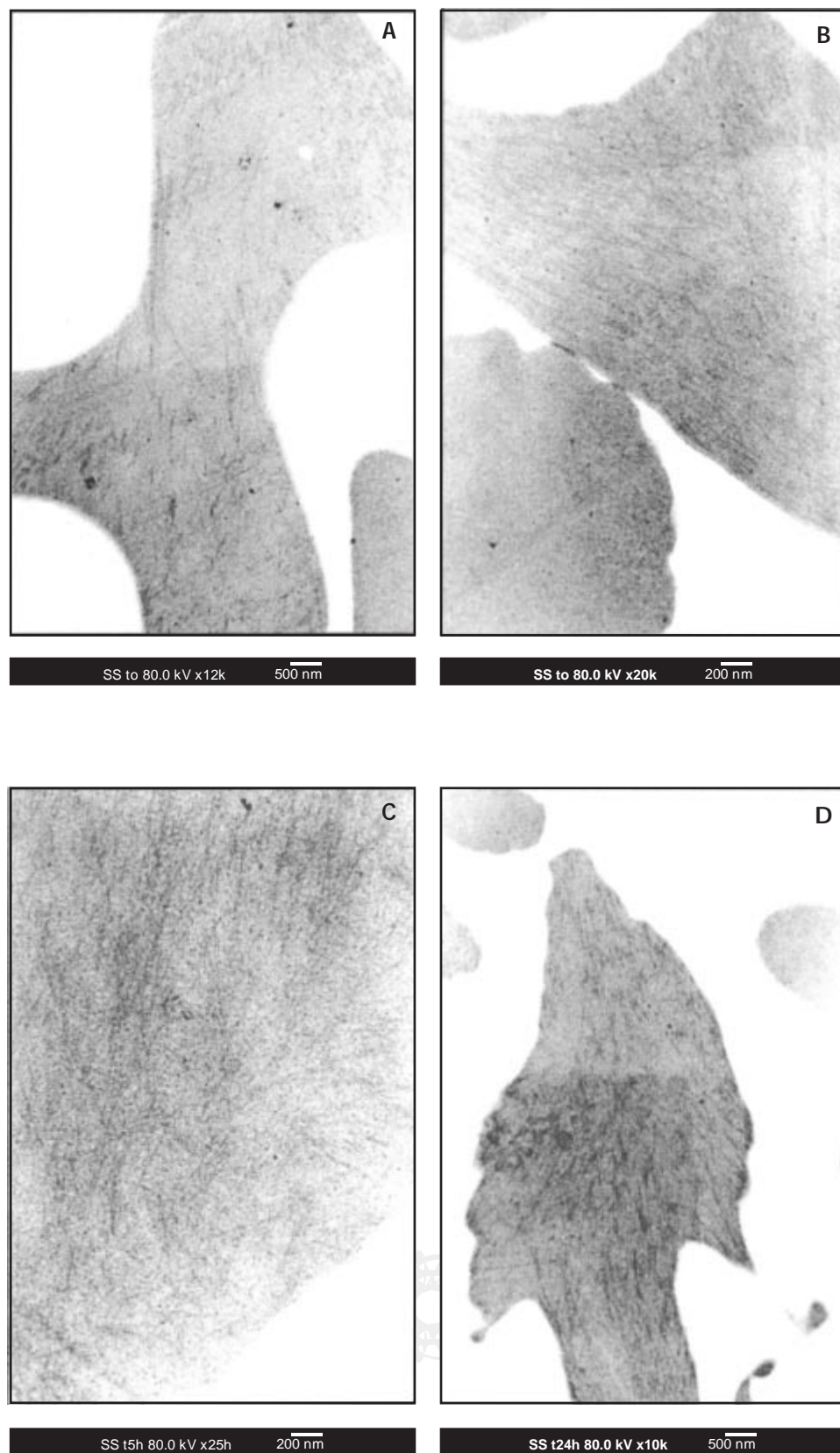
En las muestras tratadas con vainillina (*Figura 3*, A, B y C) no se observaron, en un número elevado de los hematíes, las fibras de los polímeros de dHbS, y sí una tendencia al incremento del número de hematíes en estado bicóncavo helicoidal. Al observar detenidamente las células se pudo apreciar que no había fibras en zonas específicas, encontrando sólo en algunas, pequeños fragmentos que indicaban la interrupción del crecimiento y la alineación de los polímeros de dHbS.

## DISCUSIÓN

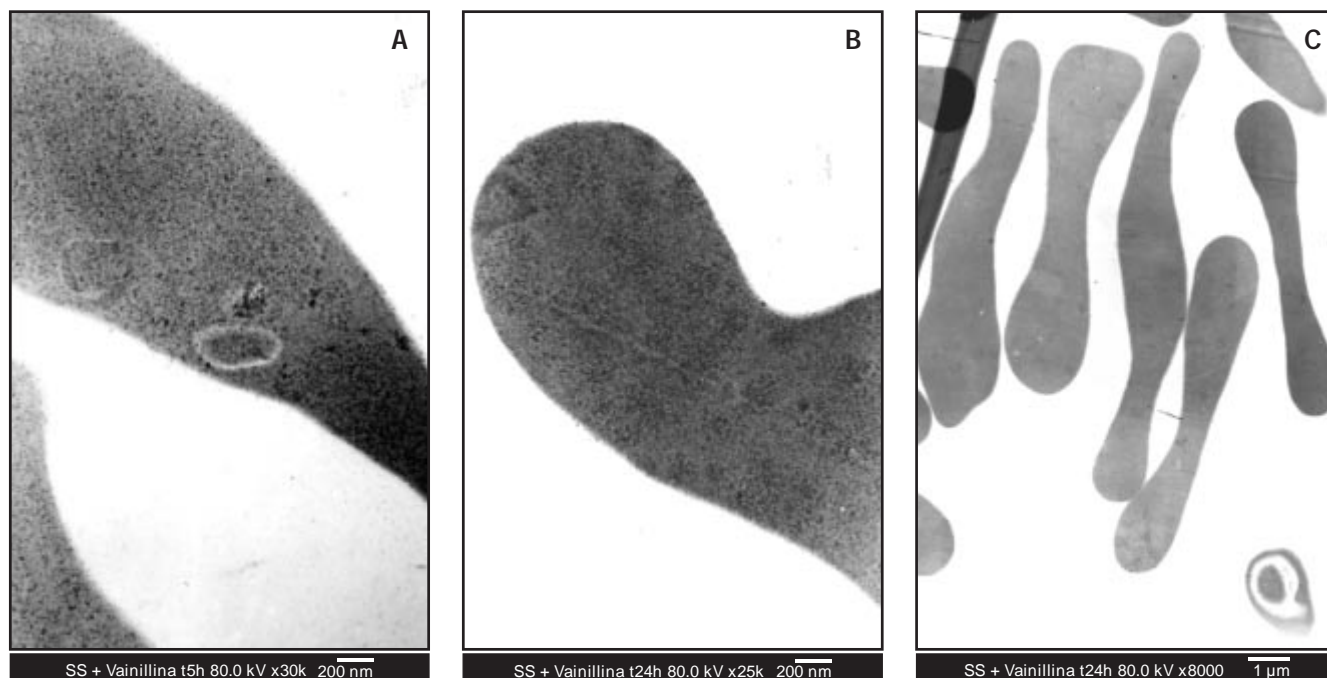
Estos resultados, conjuntamente con los estudios por RMN, HPLC y focalización isoelectrica realizados previamente por nuestro grupo, corroboran los re-



**Figura 1.** Microfotografías electrónicas realizadas a las muestras de hematíes con Hb normal (AA) en el tiempo inicial ( $t_0$ ), durante la observación en el microscopio electrónico Jeem 2000 EX Jeol con un voltaje de aceleración 80.0 kV. **A:** hematíes con HbA fijados en  $t_0$ , amplificación x17k 500 nm, **B:** hematíes (HbA) (zoom) fijados en  $t_0$ , amplificación x34k 200 nm.



**Figura 2.** Microfotografías electrónicas realizadas a las muestras de hematíes falciformes (con HbS) utilizadas como control para los tiempos inicial  $t_0$ ,  $t_{5h}$  y  $t_{24h}$  durante la observación en el microscopio electrónico Jeem 2000 EX Jeol con un voltaje de aceleración 80.0 kV. **A:** hematíes (HbS) control fijados en el tiempo  $t_0$  (zoom), amplificación x20.4k 500 nm, **B:** hematíes (HbS) control fijados en  $t_0$  (zoom), amplificación x34k 200 nm, **C:** hematíes SS control fijados a las 5 h ( $t_{5h}$ ) (zoom), amplificación x50k 200 nm, **D:** hematíes (HbS) control fijados a las 24 h ( $t_{24h}$ ) (zoom), amplificación x20k 500 nm.



**Figura 3.** Microfotografías electrónicas realizadas a las muestras de hematíes falciformes (HbS) tratadas con la solución de vainillina (razón molar 1:4), por 5 h ( $t_{5h}$ ) y 24 h ( $t_{24h}$ ), durante la observación en el microscopio electrónico Jeem 2000 EX Jeol con un voltaje de aceleración 80.0 kV.

**A:** hematíes (HbS) tratados con vainillina (1:4) durante 5 h ( $t_{5h}$ ) (zoom), amplificación x30k 200 nm. **B:** hematíes (HbS) tratados con vainillina (1:4) durante 24 h ( $t_{24h}$ ) (zoom), amplificación x25k 200 nm. **C:** hematíes (HbS) tratados con vainillina durante 24 h ( $t_{24h}$ ), amplificación x8000 1  $\mu$ m.

portes de Zaugg (1977) y Abraham (1991) al proponer el enlazamiento de la vainillina a la Hb, a través de una reacción de adición nucleofílica en la región de los grupos amino terminales ( $NH_2$ ) de las cadenas  $\beta$ .<sup>15-20</sup> La cristalografía de rayos X indicó que un par de moléculas de vainillina se enlaza cerca de un par de anillos imidazólicos de la *His103 $\alpha$*  en la cavidad central de agua, moviéndose los residuos *Cys104 $\alpha$* , *His103 $\alpha$* , y *Gln131 $\beta$* , para acomodar el enlazamiento; y por otro sitio, su enlace entre la *His116 $\beta$*  y la *Cys117 $\beta$* .<sup>16</sup> La *His116 $\beta$*  se ha reportado como un sitio de contacto en el polímero de dHbS, lo cual pudiera explicar la inhibición en la formación de las fibras observadas en nuestro estudio con MET.<sup>4</sup>

La observación, análisis y comparación de las microfotografías electrónicas de las muestras tratadas y los controles nos permite demostrar, cualitativamente, que ocurre la reacción y al final de cada tiempo de incubación ( $t_{5h}$  y  $t_{24h}$ ) se forma un aducto vainillina-Hb estable, el cual pudiera incidir directa o indirectamente en la inhibición de otros sitios de contacto intermoleculares reportados en la literatura. De esta forma contribuye a la desestabilización de los políme-

ros e impide su crecimiento y alineación; es decir, interrumpe la distribución de las fibras en forma de dominios hacia los extremos de los hematíes, lo cual hace que disminuyan los daños a la membrana celular. Considerando que el estado desoxigenado de la Hb es el idóneo para desencadenar la polimerización y aún cuando ocurren múltiples ciclos de oxigenación-desoxigenación, sugerimos que la inhibición de la polimerización es lo que provoca una tendencia a la conservación de la forma bicóncava helicoidal, siendo una moderada contribución a la restauración de algunas de las células anteriormente deformadas. Aunque se pudo apreciar, minoritariamente, que algunas células estaban irreversiblemente deformadas en algunos de los planos observados.

Si la gravedad de expresión de las crisis dolorosas recurrentes y la hemólisis crónica varían entre individuos y el número de células irreversiblemente falciformes circulantes determina el componente hemolítico, una tendencia a la restauración morfológica celular significa la recuperación de la elasticidad y la disminución de la fragilidad mecánica de los hematíes, extendiendo su tiempo de vida medio más allá de



los 60 días reportados, lo cual se refleja en el mejoramiento de la calidad de vida.<sup>26-28</sup>

Los resultados del trabajo muestran que la vainillina se enlaza covalentemente con la Hb como fue propuesto por Zaugg (1977)<sup>15</sup> y Abraham (1991).<sup>16</sup> Se une a un sitio de contacto intermolecular e interfiere este-reoquímicamente con el proceso de polimerización.

La inhibición en la formación de las fibras de los polímeros de dHbS observada por MET, en las muestras tratadas con vainillina ( $t_{5h}$ ,  $t_{24h}$ ) para una razón molar Hb: vainillina 1:4, así como la tendencia al incremento del número de hematíes en estado bicóncavo helicoidal, corroboran los reportes sobre la moderada actividad antidrepanocítica de la vainillina sugiriendo un posible modo de acción a través de la inhibición de los sitios de contacto intermoleculares. Se propone evaluar su utilidad terapéutica en el tratamiento de la drepanocitemia.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los técnicos del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Hematología e Inmunología; al Departamento de Biofísica del Centro de Biofísica Médica; al Centro de Estudios para las Investigaciones y las Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos. A las técnicas Tania Valdés Prieto y Yahima Harvey Pedroso, y a la Dra. Odelsa Ancheta Niebla del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Al Departamento de Neurofísica del Centro de Neurociencias de Cuba y al diseñador gráfico Hubert Delestre Carmell.

### REFERENCIAS

- Wellems TE, Josephs R. Crystallization of deoxyhemoglobin S by fiber alignment and fusion. *J Mol Biol* 1979; 135: 651-674.
- Kaperonis AA, Handley DA, Chien S. Crystals and other forms of HbS polymers in deoxygenated sickle erythrocytes. *Am J Hematol* 1986; 21: 269-275.
- Eaton WA, Hofrichter J. Sickle cell hemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem* 1990; 40: 67-68.
- Schechter AN, Noguchi CT. *Sickle hemoglobin polymer: structure-function correlates. Sickle cell disease: basic principles and clinical practice*. New York: Raven Press, Ltd; 1994. p. 844-850.
- Abraham DJ, Gazze DM, Kennedy PE, Mokotoff M. Design, synthesis, and testing of potential antisickling agents. 5. Disubstituted benzoic acids designed for the donor site and proline salicylates for the acceptor site. *J Med Chem* 1984; 27: 1549-1559.
- Rodgers DW, Crepeau RH, Edelstein SJ. Pairings and polarities of the 14 strands in sickle cell hemoglobin fibers. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 6157-6161.
- Harrington DJ, Adachi K, Royer WE. The high resolution crystal structure of deoxyhemoglobin S. *J Mol Biol* 1997; 272: 398-407.
- Dean J, Schechter AN. Sickle cell anemia: molecular and cellular bases of therapeutic approaches. *N Engl J Med* 1978; 299: 752-763.
- Sangre. Composición de la sangre. *Enciclopedia de Consulta Microsoft® Encarta® 2003*. © 1993-2000 Microsoft Corporation.
- Del Toro G. La anemia drepanocítica: orígenes, distribución geográfica y fisiopatología. Inhibición de la polimerización de la hemoglobina S y la falciformación de los glóbulos rojos. En CD: *Monografías de Excelencia 2001*. Santiago de Cuba, Cuba. ISBN: 959-207-012-1.
- Adachi K, Kim J, Ballas SK, Surrey S, Asakura T. Facilitation of HbS polymerization by the substitution of Glu for Gln at  $\beta$ 121. *J Biol Chem* 1988; 263: 5607-5610.
- Serjeant GR. *Sickle cell disease*. 2<sup>nd</sup> Ed. Great Britain: Oxford Medical Publications; 1992. p. 56, 61, 71-77.
- Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 762-769.
- 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.
- Zaugg RM, Walder JA, Klotz IM. Schiff base adducts of hemoglobin. *J Biol Chem* 1977; 252: 8542-8548.
- Abraham DJ, Mehanna AS, Wireko FC, Whitney J, Thomas RP, Orringer EP. Vanillin, a potential agent for the treatment of sickle cell anemia. *Blood* 1991; 77: 1334-1341.
- Abdala JC, Soler C, Fernández AA, Álvarez ED, Del Toro G. Estudio de la interacción de compuestos carbonilos con hemoglobinas *in vitro*. Valoración de su efecto antisickling. *Rev Cub Quím* 1996; 8: 3-10.
- Álvarez ED, Cabal CA, Fernández AA, Soler C, Lores MA, Del Toro G. IE-HPLC and NMR relaxometry demonstrate a potential role for vanillin in sickle cell disease. *Avan Biotech Mod* 1997; 4: E6.
- Cabal CA, Fernández AA, Lores MA, Álvarez ED, Losada J, Soler C, Pérez E. *Magnetic relaxation in the kinetics of the polymerization of hemoglobin S. Clinical diagnosis and treatment with vanillin*. Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Australia; 1998.
- 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 Quím* 2002; 14: 59-64.
- USP XVIII. *The United States Pharmacopoeia*. 18<sup>th</sup> ed. Easton PA: The US Pharmacopoeia Convention, Mack Printing Company Inc.; 1970.
- AVI Sourcebook and Handbook Series (Source book of flavors). London: A Division of Albright and Wilson, the AVI Publishing Company Inc.; 1981.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Monografía de Fármacos*. 5<sup>a</sup> ed. México: Secretaría de Salud; 1988. p. 943-945.
- Císcar F, Farreras P. *Diagnóstico Hematológico*. Tomo II. Barcelona: Editorial JIMS; 1972. p. 1387-1388, 1390, 1422-1426.
- Fernández AA, Falcón JE, Del Toro G, Pozo AR. Caracterización de los buffer fosfatos utilizados en la preparación de solución de hemoglobina (Hb) a pH controlado. *Rev Cub Quím* 2001; 13: 87-96.
- Mohandas N, Evans E. Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cell: requirement for both cell membrane changes and plasma factors. *Blood* 1984; 64: 282-287.
- Ballas S, Smith ED. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. *Blood* 1992; 79: 2154-2163.
- Brittenham GM, Schechter AN, Noguchi CT. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood* 1985; 65:183-189.