

# Evaluación de la actividad antipolimerizante de 4 aldehídos aromáticos en hemoglobinas usando relajación magnética protónica

José E. Falcón Dieguez,\* Griselda Del Toro García,\* Yamirka Alonso Geli\*

## RESUMEN

La formación de una base de Schiff hemoglobina-aldehído aromático, ha sido reportada como inhibidor de la polimerización de la hemoglobina S. A través de la relajación magnética protónica (RMP- $H^1$ ) se realizó un seguimiento de la cinética de polimerización de la hemoglobina S y se determinó el tiempo de demora. Los estudios realizados *in vitro* demostraron el efecto inhibidor de la isovanillina, o-vainillina, m-hidroxibenzaldehído y p-hidroxibenzaldehído, utilizando relaciones molares (hemoglobina S/compuesto) 1:1, 1:4 y 1:8. Incrementaron el tiempo de demora (expresado como porcentaje de variación) para cada una de las relaciones molares, isovanillina:  $34 \pm 6\%$  (1:1),  $68 \pm 16\%$  (1:4), o-vainillina:  $26 \pm 10\%$  (1:1),  $63 \pm 20\%$  (1:4), m-hidroxibenzaldehído:  $16 \pm 4\%$  (1:1),  $44 \pm 12\%$  (1:4), y p-hidroxibenzaldehído:  $10 \pm 3\%$  (1:1),  $32 \pm 8\%$  (1:4). En el tiempo obtenido para la relación molar 1:8 no se obtuvo la curva característica de la cinética estudiada. De este modo, incrementando la concentración del compuesto aumentó su efecto en el retardo de la polimerización. No se encontró actividad hemolítica sobre los eritrocitos a las concentraciones empleadas. Los resultados confirman la actividad antipolimerizante de aldehídos aromáticos empleando una técnica diferente a otras reportadas en la literatura, que además cuantifica el efecto de la concentración. Estos resultados permiten estudiar la utilidad terapéutica de estos compuestos en el tratamiento de la anemia drepanocítica.

**Palabras clave:** Polimerización, hemoglobina S, relajación, antipolimerizante, isovanillina, o-vainillina, m-hidroxibenzaldehído y p-hidroxibenzaldehído, RMP- $H^1$ .

## ABSTRACT

The formation of a Schiff base adduct hemoglobin-aromatic aldehyde, it has been reported as inhibitor of the hemoglobin S polymerization. Using the Proton Magnetic Resonance methodology, it can be studied the polymerization kinetics and determine the delay time. Our studies *in vitro* demonstrate the inhibitor effect of the isovanillin, o-vanillin, m-hydroxybenzaldehyde and the p-hydroxybenzaldehyde, using molar relationships (hemoglobin S/compound) 1:1, 1:4 and 1:8. The delay time increment (expressed as percent) obtained for each one of the molar relationships was, isovanillin:  $34 \pm 6\%$  (1:1),  $68 \pm 16\%$  (1:4), o-vanillin:  $26 \pm 10\%$  (1:1),  $63 \pm 20\%$  (1:4), m-hydroxybenzaldehyde:  $16 \pm 4\%$  (1:1),  $44 \pm 12\%$  (1:4) and the p-hydroxybenzaldehyde:  $10 \pm 3\%$  (1:1),  $32 \pm 8\%$  (1:4). In the case of 1:8, the characteristic kinetics curve was not obtained. To the employed concentrations, we not found hemolytic activity on the erythrocytes. These results confirm the antisickling activity of these aromatic aldehydes, for a technique different to the reported in literature that also allows quantify the concentration effect. The same ones will facilitate the study of the therapeutic utility of these compounds in the sickle cell anemia treatment.

**Key words:** Polymerization, hemoglobin S, relaxation, antisickling, isovanillin, o-vanillin, m-hydroxybenzaldehyde, p-hydroxybenzaldehyde.

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

Departamento e Institución a los que se le 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. José Ernesto Falcón Dieguez. Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n, 90500, Santiago de Cuba, Cuba. e-mail: falcon@cbm.uo.edu.cu, jfalcond05@yahoo.com. 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: 23-06-2006

Aceptado: 04-10-2006

## INTRODUCCIÓN

La causa primaria de la anemia drepanocítica (AD) o hemoglobinopatía SS, es un cambio de base en el ADN que trae como consecuencia la sustitución de ácido glutámico por valina en la posición 6 de la cadena  $\beta$  de la hemoglobina (Hb), dando origen a la hemoglobina S (HbS). Esta sustitución causa una fuerte interacción entre la Val-6( $\beta$ ) de un tetrámero de desoxihemoglobina S con una bolsa hidrofóbica de un segundo tetrámero en la región Phe-85( $\beta$ )/Leu-88( $\beta$ ),<sup>1,2</sup> que junto a subsiguientes interacciones que involucran contactos intertetraméricos laterales y axiales provocan la agregación de la HbS en su estado desoxigenado, con la consecuente falciformación y disminución de la flexibilidad de los eritrocitos. La polimerización de la HbS es el principal proceso molecular responsable de las manifestaciones clínicas de los pacientes que padecen esta enfermedad.<sup>3</sup> En la búsqueda de un tratamiento, ha sido reportada una gran variedad de compuestos que inhiben la polimerización de la HbS por interacción directa con la Hb (agentes antipolimerizantes). Es bien conocida la formación de la base de Schiff de aldehídos aromáticos con grupos aminos libres de la Hb,<sup>4,5</sup> mecanismo que puede estabilizar la oxihemoglobina y desplazar la curva de disociación de oxígeno hacia la izquierda, así como inhibir contactos intermoleculares Hb-Hb que se producen en el polímero, trayendo consigo un potente efecto. Dentro de éstos el 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) ha sido el más estudiado<sup>6,7</sup> por sus propiedades y amplio uso en la industria alimenticia. Para el estudio de la cinética de polimerización de la HbS se han desarrollado diversos métodos,<sup>8-13</sup> destacando la “resonancia magnética nuclear protónica” (RMN- $H^1$ ). En nuestro laboratorio se ha desarrollado una metodología para el estudio de la polimerización por relajación de RMN- $H^1$ , que a diferencia de lo reportado en la literatura parte de la desoxigenación espontánea. Las moléculas de agua que se encuentran asociadas a la Hb experimentan variaciones en la movilidad debido a la formación de polímeros en el medio, provocando un acortamiento del tiempo de relajación spin - spin (T2).<sup>14-17</sup> Con las variaciones que experimenta T2 en el tiempo se estudia la cinética de polimerización de la HbS en el interior de los eritrocitos o en solución. A través del estudio cinético se puede determinar el tiempo de demora (td), tiempo a partir del cual la polimerización se hace crítica e irreversible. A partir de la variación del td es posible evaluar la acción de un agente químico sobre la polimerización de la HbS y su relación

con la concentración del mismo.<sup>7,15</sup> En el presente trabajo se investiga *in vitro*, a través de la relajación de RMN- $H^1$ , el efecto inhibitorio de la polimerización de cuatro aldehídos aromáticos (isovainillina, o-vainillina, m-hidroxibenzaldehído, p-hidroxibenzaldehído) a diferentes relaciones molares. En estudios anteriores se informa que los compuestos en estudio manifiestan una baja actividad hemolítica sobre los eritrocitos; por lo que se realiza un estudio comparativo de la vainillina<sup>7</sup> con sus isómeros (iso y orto),<sup>18</sup> y con los del benzaldehído (meta y para).<sup>19</sup>

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Reactivos

Los reactivos fueron obtenidos de suministradores comerciales y de calidad analítica: etanol (Alfa Aesar, Alemania); heparina sódica (Sigma, Alemania); NaCl,  $Na_2HPO_4$ , y  $KH_2PO_4$  (Panreac, España), isovainillina (Fluka, Suiza), o-vainillina, m-hidroxibenzaldehído, y p-hidroxibenzaldehído (Aldrich, Alemania).

### Preparación de las muestras de hemoglobina y soluciones

Las muestras de HbS fueron obtenidas a partir de la sangre total venosa de enfermos homocigóticos SS colectada en el laboratorio clínico del Hospital General Clínico Quirúrgico “Juan Bruno Zayas”, de Santiago de Cuba. La sangre total heparinizada se centrifugó (3,500 rpm, 10 min), se eliminó el plasma, se lavaron los eritrocitos con amortiguador fosfato salino (PBS) (pH = 7.4) tres veces y se preparó un *pool*.<sup>20</sup> La masa eritrocítica se hemolizó por congelación, se centrifugó (3,500 rpm, 10 min), se descartaron los restos de membrana por decantación y se determinó la concentración de Hb por el método de la cianometahemoglobina<sup>21</sup> en un espectrofotómetro Ultrospec III (Pharmacia, Alemania). Finalmente la solución de Hb se conservó a 4 °C hasta el día de la medición. Las muestras de hemoglobina A (HbA) fueron obtenidas a partir de sangre total venosa de donantes voluntarios en el Banco de Sangre Provincial “Renato Guitart Rosell” de Santiago de Cuba. Todas las muestras de sangre utilizadas fueron obtenidas con el consentimiento informado de los involucrados.

A partir de la concentración de Hb en la muestra se calculó la masa de los compuestos necesaria para establecer las relaciones molares (rm) Hb:compuesto (1:1, 1:4, y 1:8), las cuales se prepararon en soluciones hidroalcohólicas (la masa del compuesto se disol-

vió en 500  $\mu\text{L}$  de etanol y se añadió PBS hasta alcanzar un volumen de 1 mL).<sup>7</sup> Se utilizó una muestra control a la que se le añadió la solución vehículo, es decir la solución hidroalcohólica sin el compuesto.

### Medición por RMN- $^1\text{H}$

Para realizar las mediciones de RMN- $^1\text{H}$  se depositaron 400  $\mu\text{L}$  de solución de Hb en ampulas de vidrio (1 cm de diámetro) y se le añadió 20  $\mu\text{L}$  de la solución hidroalcohólica del compuesto con la correspondiente concentración para establecer las rm estudiadas, a la muestra control se le añadió 20  $\mu\text{L}$  de la solución vehículo sin compuesto. Todo el experimento se realizó a 36 °C.<sup>7,14,15</sup>

Se midió el T2 en el Relaxómetro Universal Cubano *Giromag 01*<sup>®</sup> (diseñado y construido en el Centro de Biofísica Médica de la Universidad de Oriente, Santiago de Cuba), con la serie de impulsos 90°- $\tau$ -180° (Hahn) a la frecuencia de 4 MHz.<sup>16,17</sup> Todas las curvas de la cinética de polimerización obtenidas fueron ajustadas para determinar el valor del td a partir del cual se ha reportado que se inicia el crecimiento rápido e irreversible de los polímeros. Todos los ajustes y tratamientos de las curvas fueron procesados con el Microcal Origin 5 (EUA).

La influencia de los compuestos en la cinética de polimerización de la HbS y el efecto de la concentración se evaluó a partir del cálculo del porcentaje de variación del td (%Vtd) para cada relación molar (rm) con relación al patrón (pat), mediante la siguiente ecuación:<sup>7</sup>

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

Se controló el pH (7.4), la concentración de HbS y la temperatura (36 °C).

Está reportado un 5% de error sistemático para las mediciones de T2 en el *Giromag 01*.<sup>14-17</sup> En cuanto a la reproducibilidad en la determinación del td bajo nuestras condiciones experimentales, se determinó un error del 2% para la determinación del td en muestras patrones, provenientes de un mismo pool de solución de Hb y un error del 5% para la determinación del td cuando se emplean relaciones molares.

### Estudio de actividad hemolítica

Para todos los compuestos en estudio ha sido determinado el efecto hemolítico *in vitro* en concentrados

de eritrocitos,<sup>7,18,19</sup> a partir de muestras de sangre de donantes voluntarios no enfermos (eritrocitos normales) y de enfermos homocigóticos SS (eritrocitos SS). Empleando el método espectrofotométrico a partir de la medición de la absorbancia para la Hb libre ( $\lambda = 545 \text{ nm}$ ), en el sobrenadante de soluciones de eritrocitos lavados con PBS.<sup>20,22</sup> Las rm estudiadas fueron 1:1, 1:4, 1:8, y 1:10<sup>6,7</sup> y la actividad hemolítica fue reportada como porcentaje de hemólisis (%H). Se realizó un estudio comparativo del %H promedio provocado por la vainillina,<sup>7</sup> sus isómeros (isovainillina y ortovainillina)<sup>18</sup> y los del benzaldehído (metahidroxibenzaldehído y parahidroxibenzaldehído)<sup>19</sup> utilizando la comparación de medias con la prueba de rangos múltiples y el análisis de varianza simple ANOVA (Statgraphics Plus 2.1) con un nivel de significancia al 95%.

## RESULTADOS

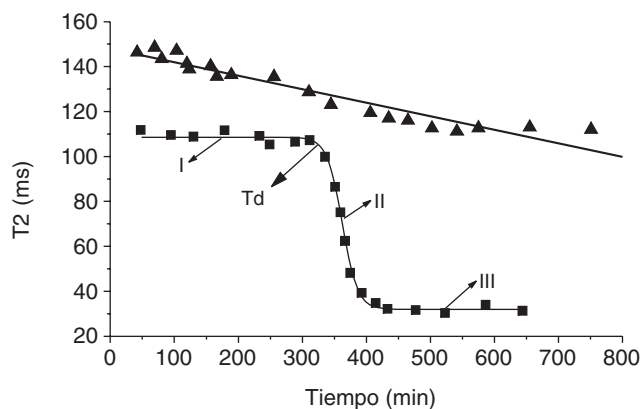
### Acción antipolimerizante

El comportamiento temporal de T2 típico en muestras de HbS y HbA se muestra en la *figura 1*. Como puede apreciarse, mediante el comportamiento temporal de T2 en las condiciones experimentales establecidas se puede seguir la cinética de polimerización de la HbS obteniendo la curva característica descrita en la literatura,<sup>10-17,23</sup> a diferencia de lo obtenido bajo las mismas condiciones con HbA. Una propiedad característica de esta cinética es la existencia de un tiempo de demora (td) previo a la polimerización de moléculas de desoxi-HbS.

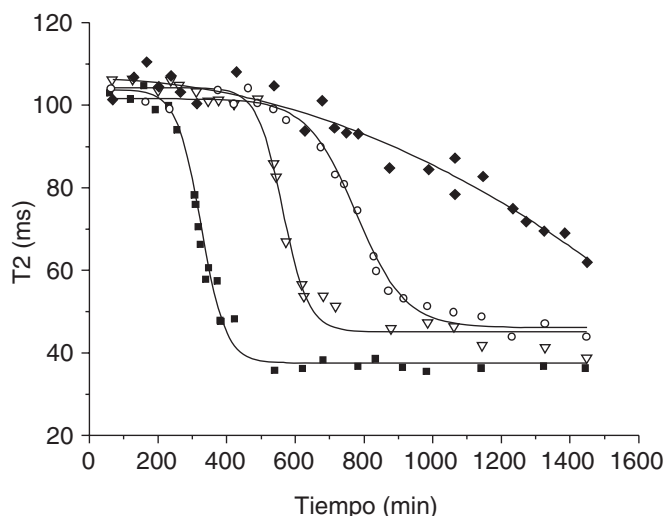
Con el objetivo de determinar si la isovainillina, la o-vainillina, el m-hidroxibenzaldehído y el p-hidroxibenzaldehído afectan el td, su efecto sobre la cinética de polimerización fue estudiado para tres rm diferentes (1:1, 1:4 y 1:8). Se realizaron 7 pruebas para cada compuesto y cada una de las relaciones. En las *figuras 2, 3, 4 y 5* se muestran las curvas obtenidas en uno de los experimentos realizados para cada compuesto. Un efecto inhibitorio de la polimerización expresado a través del incremento del td, dependiente además de la concentración, se pudo apreciar para los cuatro aldehídos.

En el *cuadro I* se muestran los resultados obtenidos del %Vtd promedio para cada compuesto a las rm de trabajo 1:1 y 1:4. El %Vtd a la rm 1:8 no se reporta debido a que, como se puede observar en las *figuras 2, 3, 4 y 5*, para la rm 1:8 de cada compuesto no se puede determinar el td.

El análisis estadístico reportó diferencias no significativas ( $p \geq 0.05$ ) del efecto inhibitorio entre isóme-

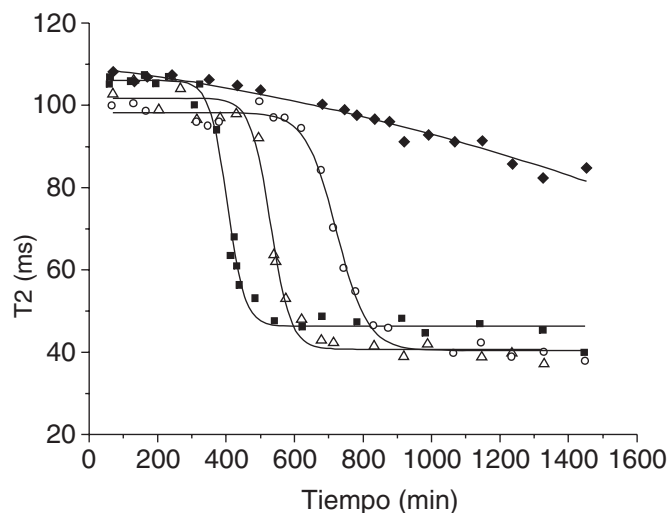


**Figura 1.** Comportamiento temporal típico del tiempo de relajación spin-spin ( $T_2$ ) ( $90^\circ$ - $\tau$ - $180^\circ$  (Hahn), 4 MHz,  $36^\circ\text{C}$ ), medido con el Relaxómetro Giromag 01®, en solución de HbA ( $\blacktriangle$ ) y HbS ( $\blacksquare$ ). Los trazos continuos representan los ajustes lineal y sigmoide 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 microdominios.

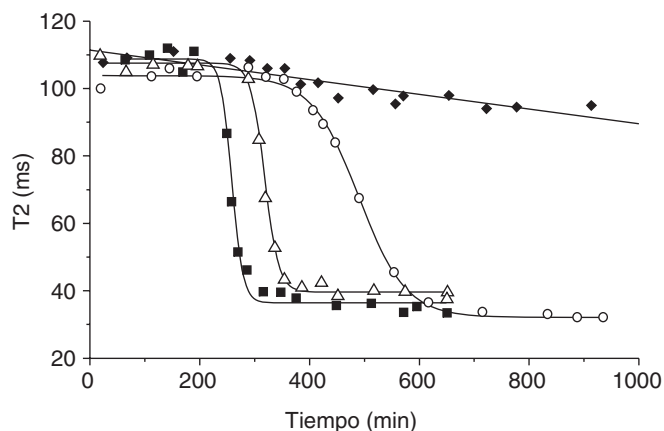


**Figura 2.** Cinética de polimerización de soluciones de HbS para las muestras patrón y tratadas con diferentes concentraciones de isovainillina. Curvas de la variación temporal del tiempo de relajación spin-spin  $T_2$  medidas en el Relaxómetro Giromag 01® ( $90^\circ$ - $\tau$ - $180^\circ$  (Hahn), 4 MHz,  $36^\circ\text{C}$ ).  $\blacksquare$  Patrón (solución de HbS más solución vehículo),  $\triangle$  Relación molar 1:1,  $\circ$  Relación molar 1:4 y  $\blacklozenge$  Relación molar 1:8.

ros, es decir entre isovainillina y o-vainillina; así como entre m-hidroxibenzaldehído y p-hidroxibenzaldehído. Mientras que al comparar los efectos de los isómeros de la vainillina (iso y orto) con los del ben-



**Figura 3.** Cinética de polimerización de soluciones de HbS para las muestras patrón y tratadas con diferentes concentraciones de o-vainillina. Curvas de la variación temporal del tiempo de relajación spin-spin  $T_2$  medidas en el Relaxómetro Giromag 01® ( $90^\circ$ - $\tau$ - $180^\circ$  (Hahn), 4 MHz,  $36^\circ\text{C}$ ).  $\blacksquare$  Patrón (solución de HbS más solución vehículo),  $\triangle$  Relación molar 1:1,  $\circ$  Relación molar 1:4 y  $\blacklozenge$  Relación molar 1:8.

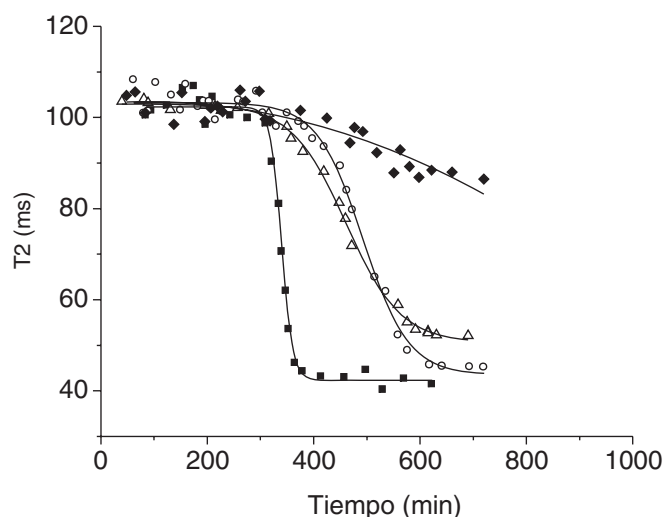


**Figura 4.** Cinética de polimerización de soluciones de HbS para las muestras patrón y tratadas con diferentes concentraciones de m-hidroxibenzaldehído. Curvas de la variación temporal del tiempo de relajación spin-spin  $T_2$  medidas en el Relaxómetro Giromag 01® ( $90^\circ$ - $\tau$ - $180^\circ$  (Hahn), 4 MHz,  $36^\circ\text{C}$ ).  $\blacksquare$  Patrón (solución de HbS más solución vehículo),  $\triangle$  Relación molar 1:1,  $\circ$  Relación molar 1:4 y  $\blacklozenge$  Relación molar 1:8.

zaldehído (m-OH y p-OH), éstos ejercieron un mayor efecto antipolimerizante ( $p < 0.05$ ).

Estudios realizados con anterioridad informaron que el efecto hemolítico de la vainillina,<sup>7</sup> la isovainilli-





**Figura 5.** Cinética de polimerización de soluciones de HbS para las muestras patrón y tratadas con diferentes concentraciones de p-hidroxibenzaldehído. Curvas de la variación temporal del tiempo de relajación spin-spin T2 medidas en el Relaxómetro Giromag 01® (90°- $\tau$ -180° (Hahn), 4 MHz, 36 °C). ■ Patrón (solución de HbS más solución vehículo),  $\Delta$  Relación molar 1:1,  $\circ$  Relación molar 1:4 y  $\blacklozenge$  Relación molar 1:8.

**Cuadro I.** Efecto de los aldehídos aromáticos sobre el td de la polimerización de la HbS, expresado a través del porcentaje de variación del td (%Vtd) para las relaciones molares 1:1 y 1:4.

| Compuesto             | %Vtd (1:1)  | %Vtd (1:4)  | n |
|-----------------------|-------------|-------------|---|
| Isovainillina         | 34 $\pm$ 6  | 68 $\pm$ 16 | 7 |
| o-Vainillina          | 26 $\pm$ 10 | 63 $\pm$ 20 | 7 |
| m-Hidroxibenzaldehído | 16 $\pm$ 4  | 44 $\pm$ 12 | 7 |
| p-Hidroxibenzaldehído | 10 $\pm$ 3  | 32 $\pm$ 8  | 7 |

na, la ortovainillina,<sup>18</sup> el 4-hidroxibenzaldehído y el 3-hidroxibenzaldehído,<sup>19</sup> sobre los eritrocitos de donantes voluntarios, fue no significativo ( $p \geq 0.05$ ) entre cada una de las rm empleadas (1:1, 1:4, 1:8 y 1:10). En el estudio sobre las células de enfermos con AD, para cada uno de los compuestos, no se reportaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre las rm.<sup>7,18,19</sup> El %H promedio osciló en un intervalo de  $0.2 \pm 0.1$  a  $0.5 \pm 0.2$  % y de  $0.1 \pm 0.1$  a  $0.8 \pm 0.7$  %, para las células de donantes voluntarios y SS, respectivamente.<sup>7,18,19</sup> Sólo la vainillina, a la relación 1:10 sobre células SS, incrementó moderada y significativamente ( $p < 0.05$ ) la hemólisis.<sup>7</sup> En la figura 6 se muestra el %H promedio provocado por los cinco aldehídos aromáticos a diferentes concentraciones sobre los eritrocitos. No se obtuvieron diferencias esta-

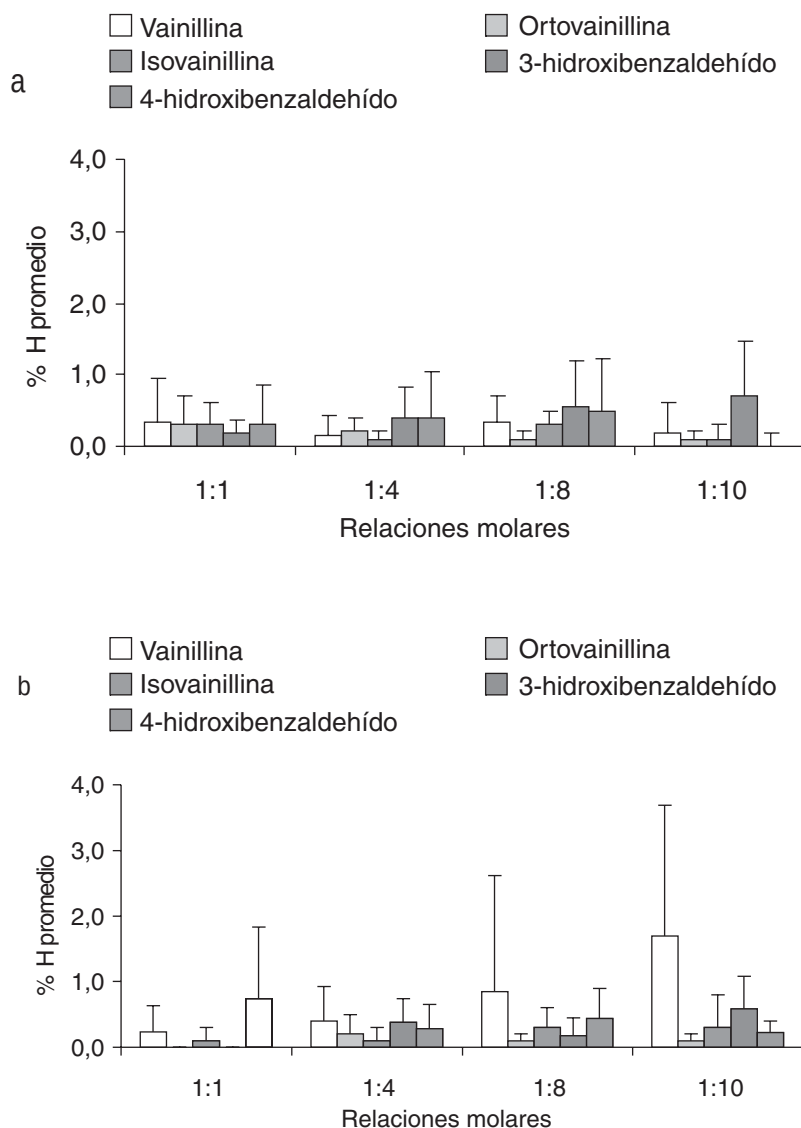
dísticamente significativas ( $p \geq 0.05$ ) en la actividad hemolítica entre los aldehídos para cada una de las relaciones molares ni entre grupos celulares. El efecto hemolítico producido a estas concentraciones no excede el 3%, existiendo mayor variabilidad en los eritrocitos SS.

## DISCUSIÓN

La cinética de polimerización de la HbS constituye una determinante de la severidad clínica de la AD.<sup>3,29</sup> El tiempo promedio durante el cual los eritrocitos humanos transitan bajo condiciones de hipoxia en el sistema sanguíneo es de alrededor de 15 segundos.<sup>30</sup> Si el td de la polimerización de la HbS fuera mayor que el tiempo de tránsito de los eritrocitos por la circulación sanguínea, los mismos podrían completar el ciclo de oxigenación/desoxigenación antes de que la polimerización intracelular se acelerara y ocurriera la falciformación intracapilar. Como consecuencia pudieran disminuir las interacciones entre los eritrocitos y las células endoteliales (adhesión endotelial),<sup>24-26</sup> la obstrucción vascular, así como la frecuencia de las crisis vasooclusivas (CVO).<sup>27,28</sup> Es por ello que unas de las principales estrategias terapéuticas, constituye la modificación química de la Hb en el interior del eritrocito, para disminuir el grado de polimerización y con ello la subsiguiente falciformación, desencadenante de la fisiopatología de la enfermedad.<sup>31,32</sup>

En estudios anteriores<sup>4,5</sup> se reportó la actividad antipolimerizante de una serie de aldehídos aromáticos en función de dos parámetros: el porcentaje de modificación de la Hb y la influencia sobre la afinidad de ésta por el oxígeno, expresada a través de la presión parcial ( $\Delta P_{50}$ ). Posteriormente otros autores reportaron nuevos estudios sobre la moderada actividad antipolimerizante de la vainillina.<sup>6,7</sup> En este trabajo se reporta el efecto *in vitro* de cuatro de estos aldehídos aromáticos sobre la cinética de polimerización de la HbS, así como su dependencia con la concentración, usando la relajación magnética protónica.

Como se muestra en este trabajo, utilizando esta técnica se pueden evaluar compuestos químicos que actúen directamente sobre la polimerización de la HbS. La literatura informa que los aldehídos aromáticos, a través de la formación de una base de Schiff con grupos amino libres en la Hb, inhiben estereoespecíficamente algunos de los contactos intermoleculares que se producen en los polímeros de desoxiHbS, lo cual se pudiera corroborar a partir de los resultados presentados.



**Figura 6.** Efecto hemolítico de cinco aldehídos aromáticos sobre eritrocitos.<sup>7,18,19</sup> Los datos representan el promedio de todas las pruebas por relaciones molares y su respectiva desviación estándar. **a)** Porcentaje de hemólisis promedio (%H) sobre los eritrocitos procedentes de donantes voluntarios no enfermos. **b)** Porcentaje de hemólisis promedio (%H) sobre los eritrocitos SS. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0.05$ ) en la actividad hemolítica entre relaciones molares, entre grupos celulares, ni entre aldehídos. El efecto hemolítico provocado a estas razones molares no excede el 3%, existiendo mayor variabilidad en los eritrocitos SS.

Los %Vtd obtenidos evidencian un efecto retardador de la polimerización por estos compuestos, dependiente de la concentración. El hecho de que el %Vtd para la rm 1:8 no se pudo determinar el td pudiera estar dado por la saturación de los sitios de enlaces intermoleculares en el polímero, además de la presencia de un exceso del agente que provocaría la inhibición de la polimerización mediante un intercambio equilibrado entre moléculas libres en la solución y las enlazadas a la Hb; lo que trae consigo que se pierda el comportamiento sigmoidal característico de la cinética de polimerización de la Hbs, seguida por los T2.

La efectividad de agentes antipolimerizantes que actúen por inhibición estereoquímica, va a estar dada por la especificidad de los enlaces y la competencia

por los sitios de enlaces que se establecen en el polímero de HbS. De los resultados se pudiera plantear que mayor número de sustituyentes en el anillo aromático para este tipo de compuesto, provocaría un mayor impedimento estérico y como consecuencia mayor retardo en la polimerización de la HbS. La reacción de formación de una base de Schiff hemoglobina-aldehído, va a estar directamente influenciada por la posición que ocupen los sustituyentes en el anillo aromático (efectos estéricos y electrónicos), ya que en dependencia de ésta, la nube electrónica del grupo carbonilo se verá afectada, favoreciendo o no la reacción de adición.

Los aldehídos aromáticos estudiados incrementaron el td de la polimerización. Al establecer un orden

de reactividad, incluyendo a la vainillina,<sup>7</sup> con base en el %Vtd se obtuvo que: isovainillina  $\approx$  ortovainillina > 3-hidroxibenzaldehído > 4-hidroxibenzaldehído > vainillina.

La vainillina y el p-hidroxibenzaldehído muestran el menor efecto antipolimerizante. Los sustituyentes electrodonadores débiles en la posición *para* (p-OH) del anillo aromático disminuyen la reactividad del grupo carbonilo (CO) frente a una reacción de adición nucleofílica. Estos mismos sustituyentes en la posición *meta* son neutrales (m-OH) o ligeramente electroattractores (m-OCH<sub>3</sub>). En el caso de la vainillina, en posición *meta* se encuentra el grupo metoxi (OCH<sub>3</sub>) con efecto inductivo negativo (-I) y mesomérico positivo (+M), mientras que en *para* está el hidroxilo (OH) con -I y +M predominante. Estos efectos hacen que el carbono del CO tenga la reactividad disminuida para la adición nucleofílica y la estabilidad del producto intermediario sea menor. Debido a la combinación de efectos electrónicos y estéricos la actividad se consideró moderada y de hecho menor que en el caso del resto de los compuestos estudiados en este trabajo.

La formación de una base de Schiff en la región de los NH<sub>2</sub>t de las cadenas  $\beta$  incrementaría la afinidad de la Hb por el oxígeno previendo el enlace normal con el 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), un potente efector negativo en el enlace con el oxígeno. Los aldehídos aromáticos que contienen un grupo hidroxilo en posición *orto* (o-OH) han mostrado un potente efecto en la unión de la Hb con el oxígeno.<sup>4,5</sup> Este sustituyente puede direccionar a estos compuestos hacia los sitios específicos en la Hb los cuales influyen fuertemente en el equilibrio oxi-desoxi, favoreciendo el mismo hacia la forma oxigenada. La isovainillina y la o-vainillina fueron más reactivas y produjeron un efecto similar en la inhibición de la polimerización, sin diferenciarse estadísticamente ( $p \geq 0.05$ ) al comparar el %Vtd total y su desviación estándar.

Una de las principales manifestaciones clínicas de la hemoglobinopatía SS es la anemia hemolítica crónica,<sup>33</sup> por lo que hay que tener en cuenta que compuestos que exacerben la hemólisis o modifiquen las propiedades reológicas de la sangre, tendrán un marcado efecto negativo en el curso de la enfermedad. Estos factores han sido considerados en los estudios del efecto hemolítico de compuestos con actividad antipolimerizante. Los aldehídos aromáticos presentados en este trabajo como inhibidores del td de la polimerización de la HbS fueron estudiados con anterioridad y se demostró que, tanto en eritrocitos SS como en normales, su efecto hemolítico es bajo.

Para las variaciones entre ensayos obtenidos, se debe tener en cuenta que el cuadro clínico y hematológico varía de un individuo a otro, por lo cual los cambios morfológicos celulares y la resistencia a factores externos también serán variables y dependientes de las características individuales, teniendo mayor incidencia en el caso de los eritrocitos SS. Al comparar las medias utilizando una prueba de rangos múltiples no existió diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre ellos, ni al compararlos con la vainillina.<sup>7</sup> Se puede plantear que no existe un efecto dependiente de la concentración a estas relaciones molares, en ninguno de los grupos celulares estudiados. En las condiciones experimentales del estudio el %H promedio sobre los eritrocitos SS y normales fue menor del 3% para todos los compuestos; menor que el valor de referencia (10%) reportado para esta técnica.<sup>22</sup> En enfermos con AD la polimerización intracelular de la desoxi-HbS daña la membrana y ocasiona la liberación de la Hb con valores de hasta 40% de hemólisis.<sup>1,2</sup>

Teniendo en cuenta estos factores, así como la metodología experimental; pudiera pensarse que el bajo porcentaje de hemólisis se corresponde con la acción farmacológica de estos compuestos al inhibir la cinética de polimerización de la HbS (a través del incremento del td), lo cual potencia la actividad antipolimerizante reportada para estos aldehídos aromáticos.

## AGRADECIMIENTOS

Al *International Centre for Theoretical Physics* (ICTP) de Trieste, por su programa de *Junior Associate*. Al personal técnico del Laboratorio Clínico y a los Médicos de la sala de Hematología Especial del Hospital General Santiago.

## REFERENCIAS

1. Serjeant GR. *Sickle Cell Disease*. 2nd. ed. Oxford: University Press; 1992.
2. Stuart MJ, Nagel RL. Sick-cell disease. *Lancet* 2004; 364: 1343-1360.
3. Eaton WA, Hofrichter J. Sick cell hemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem* 1990; 40: 63-279.
4. Zaug RH, Walder JA, Klotz I M. Schiff base adducts of hemoglobin. *J Biol Chem* 1977; 252: 8542-8.
5. Beddel CR, Kneen G, White RD. The antisickling activity of a series of aromatic aldehydes. *Br J Pharmacol* 1979; 66: 70.
6. 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: 1334-41.
7. Del Toro G, Falcón JE, Alonso Y, Valdés YC, Cabal CA. Vainillina: agente inhibidor de la polimerización de la hemoglobina S. *Bioquímica* 2003; 28: 4-10.

8. Harris JW, Bensusan HB. The kinetics of the sol-gel transformation of deoxyhemoglobin S by continuous monitoring of viscosity. *J Lab Clin Med* 1975; 86: 564-75.
9. Kowalczykowski S, Steinhardt J. Kinetics of hemoglobin S gelation followed by continuously sensitive low-shear viscosity: changes in viscosity and volume on aggregation. *J Mol Biol* 1977; 115: 201-13.
10. Moffat K, Gibson QH. The rates of polymerization and depolymerization of sickle cell hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 61: 237-43.
11. Bridges KR, Barabino GD, Brugnara C, Cho MR, Christoph GW, Dover G, et al. A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing hydroxyurea therapy. *Blood* 1996; 88: 4701-10.
12. Adachi K, Asakura T. Kinetics of the polymerization of hemoglobin in high and low phosphate buffers. *Blood Cells* 1982; 8: 213-224.
13. Ivanova M, Jasuja R, Kwong S, Briehl RW, Ferrone FA. Nonideality and the nucleation of sickle hemoglobin. *Biophys J* 2000; 79: 1016-1022.
14. Losada J, Guilart F, Cabal CA. *NMR relaxation study of sickle cell disease*. Proceedings of the XXIV AMPERE Congress Magnetic Resonance and Related Phenomena 1988; Poznan, Polonia: 1027-30.
15. Cabal CA, Fernández AA, Lores MA, Álvarez ED, Losada J, Soler C, et al. Magnetic relaxation in the kinetics of the polymerization of hemoglobin S. Clinical diagnosis and treatment with vanillin. *Proc Inter Soc Mag Res Med* (Boesch Ch., Heshiki A., Grist T. M., eds.), pp. 1705, Sixth Scientific Meeting and Exhibition, Sidney, Australia 1998. Berkeley: ISMRM 1998.
16. Lores MA. Estudios de los procesos de interacción magnética y movilidad molecular durante la polimerización de la HbS por métodos de resonancia magnética. *Tesis Doctoral*; 2005. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.
17. Lores M, Cabal C. Proton magnetic relaxation process during the polymerization of hemoglobin S. *Appl Magn Reson* 2005; 28: 79-80.
18. Alonso Y, Del Toro G, Falcón JE, Valdés YC. Actividad hemolítica de la ortovainillina y la isovainillina sobre eritrocitos humanos. *Rev Cubana Farm* 2005; 39: 20-25.
19. Falcón JE, Del Toro G, Alonso Y. Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del 3-hidroxibenzaldehído y el 4-hidroxibenzaldehído en eritrocitos. *Rev Cubana Quím* 2003; 15: 63-66.
20. 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 Cubana Quím* 2001; 13: 87-96.
21. Ciscar F, Farreras P. *Diagnóstico hematológico*. 3a. ed. Barcelona: Jims; 1972: 1345-1347.
22. Stanley HR. *Toxicity testing of dental materials*. Florida: CRC Press Inc; 1985: 7-22.
23. Malfa K, Steinhardt JA. Temperature-dependent latent-period in the aggregation of sickle-cell deoxyhemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 59: 887-893.
24. Lubin BH. Sickle cell disease and the endothelium. *N Engl J Med* 2004; 124: 391-402.
25. Wagner M, Eckman J, Wick T. Sickle cell disease: what makes the red cells stay in the microvasculature long enough to sickle? *J Lab Clin Med* 2004; 144: 227-28.
26. Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest* 1997; 99: 2561-64.
27. Hofrichter J, Ross PD, Eaton WA. Kinetics and mechanism of deoxyhemoglobin S gelation. A new approach to understanding sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci* 1974; 71: 4864-4868.
28. Eaton WA, Hofrichter J, Ross PD. Delay time of gelation. A possible determinant of clinical severity in sickle cell disease. *Blood* 1976; 47: 115-120.
29. Poillon WN, Kim BC, Castro O. Intracellular hemoglobin S polymerization and the clinical severity of sickle cell anemia. *Blood* 1998; 91: 1777-83.
30. Altman PL, Dittmer DS. *Respiration and circulation*. FASED: Bethesda, Md; 1971: 417-422.
31. Hebbel RP. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood* 1991; 77: 214-37.
32. Mohandas N, Evans E. Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cell: requirement for both cell membranes change and plasma factors. *Blood* 1984; 64: 282-7.
33. Iyamu EW, Turner EA, Asakura T. *In vitro* effects of NI-PRISAN (Nix-0699): a naturally occurring, potent antisludging agent. *Br J Haematol* 2002; 118: 337-43.

