

**Tesis de Doctorado
2005**

**Estudio de los mecanismos implicados en la inhibición
de la drepanocitosis por acción de la vainillina y los 1-
O-alkilglicelores sintéticos**

Centro de Biofísica Médica. Universidad de Oriente

Autor: Grises del Toro García

AGRADECIMIENTOS

A los tutores; en especial a la Dra. Yolanda, por la acertada guía y colaboración científica, por la ayuda incondicional y la amistad sincera. Al Dr. Cabal, por inculcarme los principios de consagración y dedicación al trabajo, por la confianza en mí depositada.

A Falcón, Yamirka y Amarilys, quienes contribuyeron directamente a los resultados de esta tesis, por su profesionalismo y por su amistad sincera.

A la sección de Biofísica Química por la colaboración y discusión científica, por el apoyo profesional y personal.

Al colectivo de Biofísica Médica, por compartir logros, riesgos e insatisfacciones; por apoyarme.

A Tania y Odalys del Banco de Sangre del INHI, porque pusieron a mi disposición el objeto de estudio, por la amistad y ayuda desinteresada.

A Margot y Micky, por acogerme en los momentos difíciles, por llenarme de atenciones, por su cariño y amistad sinceros.

A Kenia, por la amistad que compartimos, por su apoyo y oportunos consejos.

Al colectivo del CEIEB y del IFAL; porque fui una más entre ellos, por el cariño y la confianza; en especial a todos los que colaboraron en la culminación de este trabajo.

A las Dras. Gisela y Anita del INHI, por su colaboración profesional y por la amistad que compartimos.

A mis padres y hermanos, por estar siempre de mi lado, por su apoyo, ayuda y confianza.

A mis grandes amigos, por estar cuando los necesité; porque como escribiera uno de ellos: nada, ni lo más hermoso del mundo, podrá estar primero que la amistad sincera, la mano tendida y el corazón abierto.

Muy especial a mi esposo Hubert; mi motor impulsor en la culminación de este trabajo, por su gran ayuda profesional y personal en el éxito de este documento de tesis, por su comprensión, cariño y su inmenso Amor.

A todas las personas, en Santiago de Cuba y Ciudad de La Habana, que colaboraron en el desarrollo de este proyecto y en mi formación profesional; a todos los que me brindaron cariño y amistad sincera.

Muchas Gracias

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis doctoral a mis padres, por el sacrificio de todos estos años, por la confianza y total apoyo, por la firmeza, la constancia y el cariño que me inculcaron

SÍNTESIS

La Drepanocitemia es una anemia hemolítica hereditaria de alta prevalencia y, aunque se han estudiado una serie de compuestos químicos con efectos inhibitorios sobre la formación de polímeros de hemoglobina S (HbS) y la transformación drepanocítica, aún no cuenta con un tratamiento efectivo. El trabajo presenta los resultados principales relacionados con los mecanismos implicados en la acción de la vainillina y los 1-O-alkilglicéoles sintéticos sobre la falciformación de eritrocitos procedentes de enfermos con drepanocitemia. El empleo de técnicas de Relajación Magnética Protónica, Cromatografía Líquida, Espectrofotometría y Microscopía Electrónica, permitió demostrar que la vainillina reacciona covalentemente con la HbS, modifica el patrón electroforético, forma un complejo estable con un tiempo de vida medio de cuatro horas e incrementa el tiempo de demora de la polimerización de la HbS; así como la tendencia a la recuperación de la forma bicóncava discoidal de los eritrocitos sin incremento de la hemólisis por acción de la vainillina y los alkilglicéoles. Se confirma, por primera vez en Cuba, que los enfermos con drepanocitemia presentan un desbalance redox. Por otra parte, aporta conocimientos teóricos y metodológicos que pueden resultar potencialmente beneficiosos en el enfoque clínico de esta patología para una reducción del incremento de la morbi-mortalidad asociada.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	02
1. DREPANOCITEMIA. FISIOPATOLOGÍA Y TERAPÉUTICA. COMPUESTOS QUÍMICOS CON POTENCIAL TERAPÉUTICO	12
1.1 Anemia hemolítica	12
1.2 Hechos relevantes en el descubrimiento de la drepanocitemia	13
1.2.1 Origen y distribución geográfica del gen β^s	14
1.3 Fisiopatología de la drepanocitemia	15
1.3.1 Alteraciones del sistema antioxidante	17
1.3.2 Polimerización de la desoxihemoglobina S	18
1.3.3 Falciformación de los eritrocitos	21
1.4 Compuestos químicos con potencial terapéutico	22
1.4.1 Vías para inhibir la falciformación celular	22
1.4.1.1 Mecanismos para inhibir la polimerización de la dHbS	22
1.4.1.2 Inducción de efectos sobre la membrana celular	26
1.4.1.3 Promoción del flujo capilar	29
1.5 Nueva alternativa en la terapia de la drepanocitemia	29
2. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	31
2.1 Reactivos	31
2.2 Material biológico	31
2.2.1 Preparación de la sangre total	32
2.3 Determinación del efecto hemolítico de los compuestos evaluados	32
2.4 Determinación del efecto de los compuestos sobre la polimerización de la dHbS	33
2.5 Determinación de la modificación de la Hb por focalización isoelectrica	36
2.6 Estudio de la reacción entre la vainillina y la Hb por cromatografía líquida	37
2.7 Efectos de los compuestos sobre los eritrocitos SS por microscopía óptica	38
2.7.1 Efectos de la vainillina sobre los eritrocitos SS	39
2.7.2 Efectos del 1-O- alquilglicerol sobre los eritrocitos SS	39
2.8 Efectos de la vainillina sobre los eritrocitos SS por microscopía electrónica	40

2.9	Evaluación del estado redox en la drepanocitemia y efectos de los compuestos sobre éste	40
2.9.1	Preparación e incubación de la sangre con los compuestos	41
2.9.2	Determinación de antioxidantes totales	41
2.9.3	Determinación de la concentración de malonildialdehído (MDA)	42
2.9.4	Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH)	42
2.9.5	Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	42
2.9.6	Determinación de la actividad de la catalasa intracelular (CAT)	42
2.10	Procesamiento estadístico	43
3.	EFFECTOS DE LA VAINILLINA Y LOS 1-O-ALQUILGLICEROLÉS SINTÉTICOS SOBRE COMPONENTES SANGUÍNEOS DE ENFERMOS CON DREPANOCITEMIA	45
3.1	Actividad hemolítica de la vainillina y los 1-O- alquilgliceroles sintéticos	45
3.2	Efectos de la vainillina y los 1-O- alquilgliceroles sobre la polimerización de la dHbS por relajación magnética	49
3.3	Modificación del patrón electroforético de la Hb por la vainillina mediante focalización isoelectrica en gel de poliacrilamida	54
3.4	Interacción entre la vainillina y la Hb por cromatografía líquida (HPLC)	56
3.5	Efectos de la vainillina y los 1-O- alquilgliceroles sobre los eritrocitos SS	59
3.5.1	Efectos de la vainillina sobre los eritrocitos SS	59
3.5.2	Efectos de los 1-O- alquilgliceroles sintéticos sobre los eritrocitos SS	61
3.6	Efectos de la vainillina sobre los eritrocitos SS por microscopía electrónica de transmisión (MET)	65
3.7	Evaluación preliminar del estado redox en la drepanocitemia	68
3.7.1	Efectos de la vainillina y los 1-O- alquilgliceroles sintéticos en el desbalance redox	71
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	74
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
	ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

La drepanocitemia, hemoglobinopatía de alta prevalencia mundial, es una anemia hemolítica hereditaria autosómica recesiva que sólo se expresa en combinación homocigótica. Está bien documentado que ésta se origina por una mutación puntual del gen que codifica para la cadena β de la hemoglobina (Hb). Como resultado se expresa la sustitución del resto de aminoácido glutámico (Glu) por valina (Val) en la posición seis 6 de la β -globina que caracteriza a la hemoglobina S (HbS).¹⁻³ Cuando se produce una disminución de la presión parcial de oxígeno (pO_2) los eritrocitos en circulación periférica adoptan forma de hoz o media luna, debido a la formación de polímeros de las moléculas de desoxiHbS (dHbS).² Este evento molecular es el responsable de las manifestaciones clínicas y hematológicas que suelen presentar los enfermos con este tipo de anemia. Entre éstas se destacan las crisis vaso oclusivas (CVO) y la anemia hemolítica crónica que cursan con dolor severo y daño multiorgánico.⁴⁻⁶

La prevalencia de esta patología depende de las características genéticas, de las condiciones ambientales, del nivel de salud pública y social, así como de los patrones matrimoniales.^{6,7} En Cuba, debido a la alta prevalencia, constituye un problema de salud pública importante. El 3,1 % de la población general es portadora del gen de la HbS;⁸ con una marcada incidencia en las provincias orientales cuyas cifras oscilan entre el 5,59-10,60 %; mientras que en las provincias occidentales se sitúa entre el 2,12- 3,04 %.⁸⁻¹⁰ En individuos de origen africano negroide y en poblaciones negras de África la prevalencia del gen β^S oscila desde 0 hasta 40 %. En Estados Unidos aproximadamente el 8 % de los afroamericanos porta la mutación y la frecuencia de SS respecto a la población norteamericana es de 1:650, cerca de 50 000 individuos. Por el contrario, existe baja incidencia en países de América Latina y el Caribe, entre otros.¹¹⁻¹³

En la mayoría de los países el pronóstico de vida para los enfermos con drepanocitemia continúa siendo bajo. Por el contrario, en Cuba la implantación del Programa Nacional de Prevención de la Drepanocitemia facilita un diagnóstico más objetivo, así como la atención asistencial y terapéutica. Este programa ha contribuido a incrementar la perspectiva y calidad de vida de estos enfermos.^{14,15}

No obstante, a pesar que la drepanocitemia se conoce hace más de cuatro siglos, la posibilidad de contar con un tratamiento efectivo sigue siendo una aspiración en el campo médico-farmacéutico. Es por ello que la búsqueda de compuestos que inhiban la formación de polímeros de la dHbS, constituye una importante línea de investigación.

Entre los compuestos que están siendo estudiados se destacan los aldehídos aromáticos y los 1-O-alkilglicerol. Los aldehídos aromáticos constituyen un grupo de compuestos orgánicos caracterizados por la presencia del doble enlace carbono oxígeno polarizado y los 1-O-alkilglicerol son una familia de compuestos caracterizados por una función éter en el carbono uno del glicerol.¹⁶

El aldehído aromático 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina), presente en la vaina de la *Vanilla planifolia*, fue sintetizado a partir del guayacol por Reimer en 1874.¹⁷⁻¹⁹ La esencia de vainilla es un aromatizante ampliamente utilizado en pequeñas cantidades en la producción de alimentos, bebidas y preparados galénicos, como correctivo de sabor y olor.¹⁸ Fue admitida por la *Food Chemical News Guide* (1990) como una sustancia sintética aromatizante (*Synthetic flavoring substances and adjuvants*, par.182.60) y reconocido su uso como alimento por la *Food and Drug Administration* (FDA).¹⁹

Estudios realizados sobre el potencial bio-antimutagénico frente a la 1-óxido-4-nitroquinolina (4-NQO), en la cepa de *Escherichia coli* WP2s, demostraron una potente actividad antimutagénica de la vainillina.²⁰ La misma disminuyó la frecuencia de la mutación inducida mostrando una fuerte actividad antimutagénica en comparación con sus isómeros.²⁰ Este hallazgo sugirió que el radical aldehído es esencial para la actividad. En general los metoxiderivados fueron más efectivos que los etoxiderivados; el radical metoxi en posición orto o meta potenció la actividad bio-antimutagénica, aunque este efecto no fue cuantificado.^{20,21}

En 1977 Zaugg informó que la vainillina se enlaza a la Hb mediante una adición nucleofílica con lo cual provoca un desplazamiento de la curva de disociación de oxígeno hacia la izquierda.²² Por otra parte, Abraham en 1991 informó, que la vainillina no afecta el contenido acuoso e iónico de la célula, considerándola como un posible candidato a evaluar en el tratamiento de la drepanocitemia.²³

Los 1-O-alkilglicerol fueron aislados por primera vez por Tsujimoto y Toyama en 1921 del aceite de hígado de peces.²⁴ Posteriormente fueron reconocidos en diferentes fuentes, principalmente de origen marino.²⁵⁻²⁷ Los efectos farmacológicos estudiados en esta familia de compuestos han sido atribuidos a la función éter alquilo en la posición uno del glicerol.²⁸⁻³¹ Se ha demostrado preliminarmente que los 1-O-alkilglicerol naturales inhiben la transformación de las células falciformes,³⁰ promueven la absorción de fármacos a través de la barrera intestinal (vehículo), e inhiben la respuesta inflamatoria inducida, en diversos modelos animales e *in vitro*.³¹⁻³³ Efectos probablemente relacionados con las propiedades surfactantes e inmunoadyuvantes de estos compuestos.³⁴ No obstante, debido a dificultades en cuanto a la disponibilidad de los compuestos naturales, a partir de 1989, en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana, se obtuvieron los análogos sintéticos de los 1-O-alkilglicerol:³¹ el 1-O-octadecilglicerol (C18), el 1-O-hexadecilglicerol (C16), el 1-O-dodecilglicerol (C12) y el 1-O-decilglicerol (C10).

El diseño y construcción por el Centro de Biofísica Médica (CBM) de la Universidad de Oriente del Relaxómetro Universal *Giromag*®01 introdujo un nuevo método, por Relajación Magnética Protónica (RM-¹H), para el estudio *in vitro* de la polimerización de la dHbS.³⁵ Esta metodología, además, demostró ser eficaz para la evaluación del potencial terapéutico de compuestos antidrepanocitarios. Esto motivó el inicio de estudios con aldehídos aromáticos y otros compuestos, para evaluar la influencia de éstos sobre el tiempo de demora (td) de la polimerización de la HbS.³⁶⁻⁴¹

La Tesis se enmarca en el estudio de la actividad antipolimerizante y antidrepanocitaria de la vainillina y los alkilglicerol sintéticos, sobre sangre total procedente de enfermos con drepanocitemia, utilizando la relajación magnética protónica, las microscopías óptica y electrónica. Se realiza una evaluación espectrofotométrica del efecto hemolítico provocado sobre los eritrocitos SS, su blanco de acción farmacológica; así como, el estudio el estado del sistema antioxidante en los enfermos y la influencia de los compuestos sobre éste.

La Tesis que se defiende, “Mecanismos implicados en la inhibición de la drepanocitosis por acción de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos”, constituye uno de los resultados científicos de las investigaciones sobre Drepanocitemia que se realizan en el Centro de Biofísica Médica desde 1992 y en el Instituto de Farmacia y Alimentos desde 1991.

Problema

A pesar de que múltiples compuestos químicos han mostrado efectos inhibitorios sobre la formación de polímeros de la HbS, así como sobre la transformación drepanocítica, aún no se cuenta con un tratamiento efectivo de la drepanocitemia que pueda ser introducido en Hematología Clínica.

Hipótesis

A partir de la información sobre la reactividad de la vainillina con la HbS y la inhibición de la falciformación de los eritrocitos SS por los 1-O-alkilgliceroles, se considera que el potencial terapéutico de éstos compuestos está mediado por la inhibición de la polimerización de la hemoglobina.

Objetivo General

1. Estudiar los efectos de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos: 1-O-decilglicerol y 1-O-dodecilglicerol, sobre el proceso de polimerización de la desoxihemoglobina S; así como los probables mecanismos implicados en la inhibición de la falciformación de los eritrocitos procedentes de enfermos con drepanocitemia.

Objetivos Específicos

1. Determinar los efectos hemolíticos de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos sobre los eritrocitos mediante el porcentaje de liberación de hemoglobina.
2. Evaluar el efecto de la concentración de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos en la polimerización de la hemoglobina S, sobre el tiempo de demora de la nucleación, mediante Relajación Magnética Protónica.
3. Determinar la modificación del patrón de la hemoglobina S producto de la reacción con la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos, por focalización isoelectrica y cromatografía líquida de alta resolución.

-
4. Determinar la cinética de inhibición de la falciformación de eritrocitos SS por la acción de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos mediante microscopía óptica y electrónica.
 5. Evaluar el estado de algunos de los componentes del sistema antioxidante de los eritrocitos procedentes de enfermos con drepanocitemia, así como el probable efecto de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos sobre éste.

La tesis está estructurada en introducción, tres capítulos, conclusiones y recomendaciones. En el capítulo 1 se discute el conocimiento científico previo a esta tesis, en relación con la drepanocitemia. Se abordan los aspectos más relevantes vinculados con el origen y distribución geográfica del gen de la HbS; la polimerización de la dHbS como factor primario esencial que determina la fisiopatología; así como las principales vertientes en la búsqueda y evaluación de compuestos con potenciales posibilidades terapéuticas para el tratamiento. Este capítulo sienta las bases teóricas para entender el problema en estudio y el diseño experimental elaborado.

En el capítulo 2 se plantea la metodología aplicada en la investigación. En él se describen cada uno de los procedimientos técnicos empleados en el manejo de la sangre total, procedente de donantes voluntarios y enfermos; en la preparación de las soluciones reactivas y las mezclas de reacción, así como para la determinación de las interacciones entre los compuestos en estudio y el blanco de acción farmacológica. Se resalta el empleo de tecnologías novedosas y potentes como la relajación magnética y la microscopía electrónica en la evaluación de la acción antidrepanocitaria de los compuestos estudiados.

En el capítulo 3 se presentan y discuten rigurosamente los principales resultados de la investigación. Esta parte del documento muestra las evidencias en cuanto a la interacción de los compuestos estudiados con la HbS y los eritrocitos SS. Los resultados indican como estos compuestos inhiben la polimerización de la HbS, la falciformación de eritrocitos SS; a la vez, que muestran cierta actividad sobre el estado antioxidante de estas células.

Impacto Científico de la Tesis

La Tesis estudia la actividad antipolimerizante y antidrepanocitaria de la vainillina y los 1-O-alquilgliceroles sintéticos sobre muestras procedentes de enfermos con drepanocitemia mediante el empleo de técnicas reconocidas y novedosas. El documento aporta información científica original acerca del efecto de la vainillina en el incremento del tiempo de demora de la polimerización de la HbS y la inhibición de la drepanocitosis; así como hallazgos experimentales inéditos sobre la actividad antidrepanocitaria para los alquilgliceroles sintéticos, no informada hasta la fecha por otro grupo de investigación en el mundo. Aporta conocimientos que resultan potencialmente beneficiosos en cuanto al tratamiento de esta patología, para reducir la alta prevalencia y los efectos sobre el incremento de la morbi-mortalidad en la población y particularmente en Cuba.

La novedad de esta investigación, de gran relevancia y actualidad para la salud humana, se centra en que profundiza, por primera vez, en los efectos farmacológicos potenciales de la vainillina y los 1-O-alquilgliceroles para el tratamiento de una hemoglobinopatía de alta prevalencia mundial. Adicionalmente valida un método por Relajación Magnética desarrollado en el país, con el uso de un Relaxómetro Universal cubano, para el estudio de compuestos con potencial actividad antidrepanocitaria. Proporciona un marco metodológico para futuras investigaciones en la búsqueda, evaluación y desarrollo de nuevos fármacos. Por otra parte, se informan por primera vez en Cuba, datos relacionados con las alteraciones del balance redox que presentan los enfermos con drepanocitemia.

Con relación a su aporte económico se debe destacar que la experiencia del grupo, en la síntesis química de los 1-O-alquilgliceroles de alto grado de pureza, favorece la posibilidad de obtener fármacos potencialmente efectivos en el tratamiento de la drepanocitemia. Esto posibilitaría la introducción de estos u otros análogos en la práctica clínica con mayor eficiencia, en el caso de que se completaran los estudios necesarios.

Producción científica del autor

Los resultados del trabajo han sido validados a través de su presentación en 21 eventos nacionales y 20 internacionales (16 en Cuba y 4 en el extranjero), la obtención de ocho premios en eventos científicos, la tutoría de 2 trabajos de diploma en la especialidad de Licenciatura en Química y el asesoramiento de una tesis de maestría en farmacología. Se han publicado 21 trabajos científicos en revistas, resúmenes de eventos, en el anuario científico del CBM y una monografía de actualización bibliográfica del tema de investigación (CD-ROM) que se encuentra en la base de datos de publicaciones indexadas de la Universidad de Oriente.

Eventos nacionales e internacionales relevantes

1. Taller Nacional sobre Drepanocitosis. 1996 y 2004 (Presentación oral) Cuba.
2. Jornada XXX Aniversario del Instituto de Hematología e Inmunología. 1996. Cuba.
3. 15 y 16 Conferencia Internacional de Química. 1996 y 1999. Cuba.
4. 36th IUPAC Congress. 1997. Suiza.
5. Biotecnología Habana'97. Cuba.
6. II Simposio Internacional de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. 1999. Cuba.
7. 3er. Coloquio Científico Fundación de Investigación del Óxido Nítrico. Instituto de Investigaciones Clínicas de Montreal. 2000. Canadá.
8. Congreso Hematología Habana' 2001 y 2005 (Presentación oral). Cuba.
9. I y II Encuentros Interamericanos de Farmacia y Nutrición. 2001 y 2003. Cuba.
10. Jornada de Resultados de Investigaciones Dr. Varán Von Smith in Memoriam. 2002 (Presentación oral). Cuba.
11. IV Seminario Internacional de estudios avanzados sobre diseño molecular y bioinformática. 2002. Cuba.
12. Cuba Farmacia-Alimentos. 2002 y 2004. Cuba.
13. V Simposio de Estrés Oxidativo. 2003. Cuba.
14. XVIII Congreso de la Federación Panamericana de Farmacia. XXVIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Ciencias Farmacéuticas. 2003. Santo Domingo, República Dominicana.

15. Concurso Provincial Anual de Salud. 2004 y 2005. (Presentación oral). Cuba.
16. 2do. Congreso Internacional de Farmacología y Terapéutica. 2004. Cuba.
17. 5to. Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química. 2004. Cuba.
18. I Simposio Internacional de Ciencias Biológicas "Charles T. Ramsden in Memoriam". 2004. Cuba.
19. I International Congress of Therapeutics. 2005. Venezuela.
20. Forum de Ciencia y Técnica a nivel de base. 1998. (Presentación oral). Cuba.
21. Concurso Científico Técnico Juvenil BTJ. 2002 y 2004. Cuba.
22. Taller "Ciencia, Medio Ambiente, Ética y Sociedad". 2000. (Presentación oral). Cuba.
23. XI Exposición Provincial Forjadores del Futuro 2004. Cuba.

Premios

1. Ponencia Relevante en el Taller "Ciencia, Medio Ambiente, Ética y Sociedad". 2000.
2. Mención en el Concurso Científico Técnico Juvenil de las BTJ a nivel de base. 2002.
3. Trabajo Destacado en el Concurso Científico Técnico Juvenil de las BTJ a nivel de base. 2004.
4. Premio Anual Provincial de Sociedades Científicas de la Salud 2004. Mejor Artículo Científico Publicado (Bioquímica 2003).
5. Trabajo Destacado Provincial de la 11na. Exposición Forjadores del Futuro 2004.
6. Premio al Trabajo más Relevante en Póster: 2do. Congreso Internacional de Farmacología y Terapéutica. 2004.
7. Mención Anual Provincial de Sociedades Científicas de la Salud 2005. Artículo Científico Publicado (Bioquímica 2004).

Reconocimientos

Sello Forjadores del Futuro en 1998 y 2001.

Publicaciones relevantes

1. 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 Quim 1996; 8: 3-10.

-
2. Abdala JC, Álvarez E, Cabal C, Fernández A, Soler C, Lores M, Del Toro G. *Influence of the vanillin in the kinetics of polymerization of HbS*. Proceedings 36th IUPAC International Congress, Chimia Acta 1997; MC-B29.
 3. Álvarez ED, Cabal C, Fernández A, 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.
 4. 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 (3): 87-96.
 5. 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*. CD-ROM: Monografías de Excelencia 2001. ISBN: 959-207-012-1.
 6. 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 Cubana Quím* 2002; 14 (1): 59-64.
 7. Del Toro G, Falcón JE, Alonso Y, Valdés Y. *Estudio de la actividad hemolítica del 4H3MBA en hematíes SS*. *Rev Cubana Farm* 2002; 36 (Supl Esp 1): 54-58.
 8. 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 (1): 63-66.
 9. 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): 4-10.
 10. Del Toro G, Valdés YC, de la Rosa MC, Falcón V, Cabal CA. *Actividad antidrepanocítica de la vainillina sobre hematíes de un paciente con drepanocitemia por microscopía electrónica de transmisión*. *Bioquímica* 2004; 29 (1): 5-10.
 11. Falcón JE, Del Toro G, Alonso Y. *Evaluación de la influencia de agentes antisickling en la polimerización de la hemoglobina S por resonancia magnética*. *Proc I Simp Int Ciencias Biológicas Ch. T. Ramsden in memoriam* 2004. ISBN: 959-207-204-3 (CD ROM, BF-ELE-05).

CAPÍTULO 1. DREPANOCITEMIA. FISIOPATOLOGÍA Y TERAPÉUTICA. COMPUESTOS QUÍMICOS CON POTENCIAL TERAPÉUTICO

En este capítulo se analiza la información científica relacionada con el origen del gen de la HbS, la distribución geográfica y la fisiopatología de la drepanocitemia. Se caracteriza la polimerización de las moléculas de HbS, el evento molecular primario responsable de las principales manifestaciones clínicas y hematológicas que suelen manifestar los enfermos con drepanocitemia. Se profundiza en la información sobre los probables mecanismos de acción farmacológica de compuestos con potencial terapéutico en la drepanocitemia.

1.1 Anemia hemolítica

La anemia hemolítica se manifiesta como consecuencia del desbalance entre la velocidad de destrucción y la producción de los eritrocitos, lo cual disminuye el tiempo de vida media de éstos. En estas condiciones, la médula ósea trata de mantener el volumen celular requerido y aumenta, de seis a ocho veces, la producción y liberación de eritrocitos jóvenes (reticulocitos) a la circulación periférica.⁴²

En las anemias hemolíticas hereditarias la alteración en el eritrocito se puede expresar bajo diferentes formas.⁴³ Entre éstas se incluyen las talasemias, que se caracterizan por la capacidad limitada en la síntesis de las cadenas polipeptídicas de la Hb y, las alteraciones en la secuencia de restos de aminoácidos. Las variantes moleculares más frecuentes de las hemoglobinopatías son las mutaciones puntuales de los genes que codifican para la Hb, como las S, C, D y E. Estas alteraciones dependerán en gran medida de la posición y el tipo de mutación.^{42,43}

La hemoglobinopatía S o drepanocitemia es una anemia hemolítica crónica de intensidad variable pero habitualmente grave. De acuerdo a informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año nacen 200 000 niños afectados y en el mundo la padecen un total de 240 millones de personas.^{1,3}

1.2 Hechos relevantes en el descubrimiento de la drepanocitemia

La biología molecular modificó los conceptos tradicionales al descubrir parte de la información contenida en el ADN. Se ha podido detectar directamente el trastorno genómico asociado con cada una de las diferentes alteraciones moleculares de la Hb.

La primera observación de los eritrocitos falciformes se realizó en 1910, aunque no es hasta 1920 que se utiliza la denominación *Sickle Cell Disease*, para caracterizar esta patología.^{2,3} Hann y Guillespie, en 1927, descubrieron que la deformación de los eritrocitos estaba relacionada con el estado de oxigenación de la Hb en el desempeño de su función. En 1949 Pauling informó sobre la existencia de la Hb anormal S (HbS) e introdujo el concepto de *enfermedad molecular*.⁴⁴ La drepanocitemia constituye un modelo genuino de enfermedad molecular, desde los niveles de la estructura y de la acción genética hasta el síndrome clínico final en el paciente. Representa la homocigocitosis para la HbS heredada y la heterocigocitosis evidencia aproximadamente iguales cantidades de Hb normal y S.^{2,44} El defecto de la HbS se limita a la sustitución del ácido glutámico, un resto polar, en la posición 6 de las cadenas β polipeptídicas de la globina por una valina, un aminoácido hidrofóbico.^{4,9,44,45} Al secuenciar el ARN mensajero que codifica la cadena β normal se observó que el ácido glutámico en la posición 6 es codificado por el triplete ribonucleótido GAG, la conversión de la base simple Adenina por Uracilo era capaz de producir el codón mensajero para valina.⁴⁵

Por cristalografía de rayos X (R-X) a baja resolución se demostró que la estructura de la HbS oxigenada y la HbA era indistinguible. La solubilidad y la afinidad por el oxígeno de la solución diluida de ambas, era virtualmente idéntica, mientras que la solución concentrada de HbS la tenía marcadamente disminuida.⁴⁵ Para que ocurra la falciformación es necesario que exista una concentración mínima de dHbS, con una menor solubilidad. La observación de eritrocitos en forma de hoz al microscopio electrónico mostró una distribución ordenada de las moléculas de Hb y en 1973 se obtuvo el primer patrón de difracción de R-X de HbS polimerizada.^{44,45}

1.2.1 Origen y distribución geográfica del gen β^S

La caracterización de los haplotipos de restricción polimórficos del ADN permitió descifrar los mosaicos culturales y étnicos de ciertas poblaciones. A la vez que contribuyó al enfoque explicativo, al menos parcialmente, de la expresión clínica de esta enfermedad.^{46,47} Los primeros estudios de distribución geográfica de los β haplotipos demostraron que la mutación ocurrió independientemente, al menos en tres ocasiones en África y una vez en la Península Arábig y la India Central. Los cinco haplotipos principales fueron informados en: Benin (Ben), África Occidental Central; Senegal (Sen), África Occidental Atlántica; Bantú (Ban), República Centroafricana (CAR); Camerún (Cam) y Asiático en el Oriente de Arabia Saudita y la India Central.⁴⁸⁻⁵¹

Se reconoció que el gen está disperso y no enlazado racialmente. Desde el punto de vista antropológico y epidemiológico fue evidente que para la HbS, así como otras de las variantes de hemoglobinopatías, la expresión de estas mutaciones génicas fue el resultado de la selección natural para dar respuesta a la malaria falciparum.^{51,52} La mutación se convirtió en un importante factor selectivo a partir del momento en que se inició un contacto estrecho entre el huésped humano, el parásito (*Plasmodium falciparum*) y el vector. El desarrollo de la agricultura y la aparición de los primeros asentamientos humanos hicieron de la malaria un factor selectivo. La densidad poblacional, la destrucción o alejamiento de otros huéspedes mamíferos y la adaptación del mosquito vector a las poblaciones humanas fueron hechos decisivos que consolidaron la endemidad de la malaria y el gen β^S contribuyendo a la prevalencia de la drepanocitemia.⁵² Por otra parte, se ha informado que existe una asociación entre la expresión de los diferentes haplotipos y las variaciones en las concentraciones de la hemoglobina fetal (HbF), encontradas en los enfermos con drepanocitemia en diferentes regiones del mundo.^{50,53-55}

Investigaciones realizadas por el Instituto Nacional de Hematología e Inmunología han informado que la población cubana actual está formada por caucasoides de origen español y negroides africanos, lo cual podría explicar los datos históricos informados (3,4 % Sen, 42,1 % Ben, 54,8 % Ban).⁹⁻¹¹

1.3 Fisiopatología de la drepanocitemia

La drepanocitemia es una enfermedad potencialmente letal con fuertes manifestaciones clínicas que no aparecen en el momento del nacimiento, debido a la alta concentración de la HbF.⁵⁶ A partir de los tres a seis meses de edad se suele observar, en la sangre periférica, los eritrocitos en forma de hoz o media luna, responsables de las manifestaciones clínicas y hematológicas. La hipoxia tisular causada por la vasooclusión (VO), en la microcirculación, y el consecuente daño multiorgánico constituye la primera causa de morbilidad y mortalidad en esta enfermedad.^{1,57,58}

Esta enfermedad se caracteriza por signos y síntomas propios de una anemia hemolítica crónica grave. Como consecuencia se incrementa la susceptibilidad a las infecciones, el retraso del crecimiento, desarrollo de crisis dolorosa por VO, cuadro torácico agudo, síndrome de secuestro esplénico, trastornos del sistema nervioso central, crisis aplásticas, entre otros. La variabilidad en las manifestaciones hematológicas y clínicas afecta la tasa de morbilidad y mortalidad de los enfermos con este síndrome en diferentes partes del mundo.^{57,58,59}

Las crisis vasooclusivas dolorosas (CVO) de intensidad y duración variables son la razón más frecuente de ingreso hospitalario.^{59,60} Éstas constituyen una medida de severidad de la enfermedad y se correlacionan con la supervivencia del paciente, siendo el principal problema el deterioro funcional progresivo de los órganos vitales. Entre los factores de riesgo que las desencadenan se encuentran la concentración de HbS^{46,61}, de HbF⁵⁴ y de reticulocitos, así como la asociación entre Hb u otras Hb anormales de tipo silencioso. Igualmente la concentración de Hb corpuscular media (CHCM), el efecto deletéreo de la β^+ talasemia, la concentración de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG)¹), la menstruación, el embarazo y la expresión de los diversos haplotipos del cluster de genes β contribuyen marcadamente a la manifestación de las CVO.^{57,60}

La expresión persistente de altas concentraciones de HbF disminuye la severidad clínica, por lo que la inducción farmacológica en la producción de ésta resultaría beneficiosa.^{56,62-65} No obstante, para una explicación más completa de las diferencias clínicas en la drepanocitemia, es necesario considerar otros factores de importancia como la heterogeneidad de los individuos, el tiempo de demora de la polimerización, la adherencia de los eritrocitos a las células endoteliales, los cambios metabólicos intracelulares y las anormalidades asociadas a las membranas. La contribución de otros factores enlaza la conocida heterogeneidad clínica con el reciente descubrimiento genético y biofísico del origen de la drepanocitemia.⁶¹

La VO se inicia y se mantiene por la interacción entre los eritrocitos SS, las células endoteliales y los constituyentes del plasma.^{66,67} Los reticulocitos SS se adhieren a las células endoteliales activadas *in vitro*, relacionándose con la severidad de la VO.⁶⁸⁻⁷² Se ha informado que esta adhesión es potenciada por interacciones específicas entre las moléculas $\alpha_4\beta_1$, CD36, la banda 3, glicolípidos sulfatados, moléculas de adhesión celular basales (CAM) de eritrocitos SS, la molécula endotelial de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y, posiblemente, la glicoproteína Ib, el factor von Willebrand (vWF), y las moléculas de la matriz subendotelial (trombospondina TSP, laminina y fibronectina)⁷³⁻⁸⁰ (Anexo I).

Por otra parte, el reducido contenido de agua en los eritrocitos SS está implicado en la patogénesis de las complicaciones clínicas asociadas a la polimerización de la HbS y la falciformación. Se ha demostrado que las fracciones eritrocíticas de alta densidad se caracterizan por una deshidratación severa y una CHCM alta entre 40-50 g/dL.⁸¹ La contracción celular es mediada por la pérdida de K^+ - Cl^- intracelular acompañado de agua. Los estudios realizados sobre las propiedades del transporte de membrana de los eritrocitos SS sugieren que existen dos vías de transporte iónico importantes en la pérdida de K^+ y la deshidratación:⁸¹⁻⁸³ (1) El volumen y sistema de cotransporte K^+ - Cl^- regulado por el pH. (2) El canal de K^+ activado por Ca^{2+} cuando el Ca^{2+} libre citoplasmático está incrementado (Canal de Gardos).

1.3.1 Alteraciones del sistema antioxidante

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) cumplen una importante función en variados procesos homeostáticos como intermediarios en reacciones de oxidación-reducción (redox) esenciales para la vida. La destrucción de microorganismos por fagocitosis, la síntesis de mediadores inflamatorios y la detoxificación constituyen algunos ejemplos relevantes. Las concentraciones bajas de ERO son beneficiosas e incluso indispensables, sin embargo altas cantidades resultan tóxicas ya que al oxidar biomoléculas las alteran y desencadenan trastornos en las funciones de éstas.⁸⁴

El sistema de control del balance pro y antioxidante del organismo lo protege contra los efectos dañinos del incremento en la liberación de ERO. Este sistema se compone de enzimas y metabolitos esenciales cuya función es la producción y eliminación del exceso de estas especies en respuesta a estímulos endógenos y exógenos.^{84,85} Por tanto, cuando se rompe el equilibrio, se expresa el daño tisular que desencadena los trastornos fisiológicos y favorece la expresión de procesos patológicos.⁸⁶

Los eritrocitos poseen un sistema de defensa complejo y eficiente en el cual se incluye el sistema glutatión y enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (Glu-6PDH) y la NADH o NADPH metahemoglobina reductasa.⁸⁴⁻⁸⁷ Se ha informado que en los eritrocitos SS se generan cantidades excesivas de ERO debido a la presencia de la HbS inestable y la autooxidación espontánea del hierro en el hemo. Por otra parte, la VO que ocurre en la drepanocitemia provoca daños por isquemia-reperfusión y activación de procesos inflamatorios tisulares que aumentan la producción y liberación de ERO, así como la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (NOSi).⁸⁸⁻⁹¹ En los estudios con eritrocitos procedentes de donantes voluntarios y de enfermos con drepanocitemia se ha encontrado que, en los segundos, la generación de ERO es aproximadamente 2 veces mayor para el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el hidroxilo ($\cdot OH$) y la peroxidación lipídica. Igualmente se encontró una disminución en la producción o liberación de óxido nítrico (NO) durante las CVO.^{89,92}

La peroxidación lipídica de los fosfolípidos de membrana en eritrocitos SS ha sido confirmada mediante la determinación de la producción espontánea de malondialdehído (MDA), así como la depleción de fosfatidilserina (PS) y fosfatidil etanolamina (PE) asociadas a la producción excesiva de MDA.⁹³⁻⁹⁵ Por otra parte, se ha informado, que en presencia del factor vWf, los eritrocitos SS interactúan con células endoteliales y provocan un incremento de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la activación del factor de transcripción NF- κ B, ambos indicadores del desbalance redox.⁸⁸ Además se ha observado que éste puede ser inducido por la adhesión de las células SS al endotelio vascular, que provoca un importante aumento en la migración de leucocitos hacia el área subendotelial. Se sugiere que la adherencia de los eritrocitos SS a las células endoteliales en los grandes vasos puede generar un aumento del desbalance redox que favorece el incremento en la adhesión y la diapédesis de monocitos. Igualmente, el aumento de la adherencia de reticulocitos SS indica la activación y el daño del endotelio que contribuye a la VO en la drepanocitemia.^{88,96}

1.3.2 Polimerización de la desoxihemoglobina S

En los estados de hipoxia, las moléculas de dHbS polimerizan para formar agregados moleculares en forma de estructuras microtubulares elongadas o polímeros paracristalinos. Estos también son reconocidos como estados de gel, cristal líquido o tactoide. La formación de estos agregados de HbS provoca que los eritrocitos se distorsionen y disminuyan la flexibilidad, como consecuencia obstruyen los pequeños capilares de la microcirculación lo cual provoca la hipoxia tisular.⁹⁷⁻¹⁰⁰

En los estudios de inducción de la polimerización mediante cambios de la temperatura se han encontrado tiempos de gelificación inusuales, y se han observado mecanismos de nucleación homogéneo y heterogéneo. La polimerización es iniciada por la nucleación homogénea, previo al inicio de la reacción hay un t_d durante el cual no se produce una formación medible de fibras y las moléculas de HbS se agregan para formar un núcleo crítico (nucleación).¹⁰¹⁻¹⁰³

Una vez formado el núcleo la polimerización continúa, por la adición sucesiva de monómeros de Hb, y aumenta la estabilidad del agregado. Esta se completa al 90% en un tiempo igual o menor al td. Las fibras crecen, se alinean espontáneamente y forman dominios, sobre los cuales se produce la nucleación heterogénea, o sea, la formación de un núcleo en la superficie del polímero ya existente.^{100,103}

Durante la interacción proteína-proteína la estructura ordenada de las moléculas de agua circundantes se distorsiona por las interacciones hidrofóbicas de la Val $\beta 6$ con la Phe $\beta 85$ y la Leu $\beta 88$ de moléculas adyacentes.^{104,105} Uno de los grupos metilo de la Val $\beta 6$ de una molécula de HbS (sitio o subunidad donante) se inserta dentro de un nicho hidrofóbico cerca de la Leu $\beta 88$ y la Phe $\beta 85$ en una segunda molécula de HbS (sitio aceptor). Sólo una de las dos Val $\beta 6$ en cada tetrámero participa en estos enlazamientos hidrofóbicos moleculares.¹⁰⁴ Estas moléculas hidrofóbicamente asociadas interactúan con otros sitios de contacto del polímero y forman un complejo con una estructura ordenada. Un puente de hidrógeno entre la Thr $\beta 4$ de la subunidad donante y la Asp $\beta 73$ del sitio aceptor ayuda a estabilizar el contacto lateral de la Val $\beta 6$ entre simples cadenas.¹⁰⁴

Por estudios de difracción de R-X y microscopía electrónica se ha observado que los tetrámeros de dHbS, al formar el polímero, se van uniendo alrededor de un eje vertical y forman anillos helicoidales espirales de moléculas de Hb. Éstas se encajan unas encima de las otras y forman largas fibras. La estructura de la fibra es resultado del ensamblamiento helicoidal complejo de 14 trenzas de moléculas de HbS (núcleo central de 4 trenzas y 10 externas rodeándolas) donde cada fibra está compuesta de 7 pares de moléculas en un empaquetamiento aproximadamente hexagonal.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ Aunque han sido reconocidos otros sitios de contacto, axiales y laterales, para estabilizar las fibras de dHbS, la imposibilidad de la oxiHbA de polimerizar, aún bajo condiciones drásticas de desoxigenación a concentraciones celulares normales, sugiere que las interacciones en el sitio aceptor-donante cerca del área de la mutación (Val $\beta 6$) son cruciales para estabilizar la fibra de HbS.^{105,108}

La probabilidad de VO, y de hecho la severidad clínica, están determinadas por la relación entre el t_d y el tiempo de tránsito de los eritrocitos a través de la microcirculación.^{61,107} Una disminución del t_d parece estar asociada con un incremento en la severidad clínica a través de un mecanismo fisiopatológico en el cual, si disminuye t_d previo a la gelación intracelular relativo al tiempo de tránsito capilar, se incrementa la probabilidad de la falciformación intracapilar. Se ha sugerido que las crisis ocurren como resultado de la falciformación en los capilares y el consecuente bloqueo de la microcirculación por las células rigidizadas, o sea que las crisis ocurren cuando el t_d es suficientemente corto o el tiempo de tránsito capilar suficientemente prolongado para incrementar significativamente esta probabilidad.^{61,107}

Entre los factores de mayor incidencia en la polimerización de la dHbS podemos señalar:

El grado de oxigenación de la HbS

El factor fisiológico más importante en la polimerización de la HbS es el oxígeno. Sólo la conformación desoxigenada de la HbS polimeriza, favoreciendo un mayor número de contactos inter tetraméricos que estabilizan la estructura del polímero, y disminuyen la afinidad de la Hb por el oxígeno. Aunque en soluciones diluidas la afinidad de la HbA y la HbS es idéntica, en solución concentrada la HbS tiene una afinidad marcadamente disminuida.^{98,109}

La concentración de monómeros de HbS

El t_d es extremadamente sensible a la concentración total de la dHbS. Éste depende de las condiciones de la solución a través de la razón de sobresaturación $S [(HbS)_{ini}/(HbS)_{sol}]$. Esta relación, a una temperatura dada, varía inversamente con cambios en el t_d $[(1/t_d \sim S^n), n=10-40, 1/t_d = \text{velocidad de formación del polímero}]$. Se ha informado que la dependencia de la velocidad de polimerización en función de la concentración de dHbS resulta crítica en la patología de la enfermedad.^{99,102}

La temperatura

La concentración de HbS y la temperatura se encuentran estrechamente relacionadas. Al variar la temperatura el t_d puede variar desde unos pocos segundos a muchas horas o inclusive días.¹¹⁰

La polimerización de la HbS muestra un coeficiente de temperatura negativo, un polímero formado de una solución de HbS desoxigenada con una concentración determinada a 37°C, se convierte a 4°C en una solución homogénea de monómeros.¹¹⁰ Los contactos entre los monómeros en el polímero desplazan moléculas de agua que se mantenían unidas a las moléculas de Hb. Éstas pueden moverse libremente y, aunque los monómeros de HbS están más ordenados en el polímero, son más las moléculas de agua que están desordenadas y libres, por lo cual aumenta la entropía que conduce a la terminación de la reacción.^{110,111}

La presencia de otras Hb

Al mezclar HbS con variantes hemoglobínicas como la HbA ($\alpha_2\beta_2$); la HbF ($\alpha_2\gamma_2$) y la HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), se ha observado un efecto fuertemente inhibidor en los sitios de contactos intermoleculares implicados en la polimerización. La copolimerización con los tetrámeros de estas variantes es baja, ya que desestabilizan la doble hélice, debido a la diferente composición aminoacídica entre las cadenas.^{112,113}

El pH

Se ha informado que la contribución del pH se debe a la disminución de la afinidad por el oxígeno a través del efecto Bohr lo cual incrementa la cantidad de Hb desoxigenada, así como a los cambios en el número de grupos ionizables sobre la proteína. Un medio alcalino inhibe la polimerización mientras que la acidificación la incrementa. Similarmente, si aumenta la concentración de 2,3-DPG se estabiliza la estructura desoxigenada e incrementa la polimerización.¹¹¹

1.3.3 Falciformación de los eritrocitos

Mediante fotólisis de rayos láser se observó que la falciformación del eritrocito se debe a la formación del gel de HbS, el cual desaparece una vez que la célula recupera la forma bicóncava esferoidal. La desoxigenación lenta provoca células elongadas (forma de hoz), la rápida células granulares y la media los llamados discocitos. Este proceso está directamente relacionado con la variación de la solubilidad de la HbS.¹⁰² No obstante, en un mismo individuo, a una velocidad de desoxigenación constante pueden existir diferentes tipos morfológicos^{1,103} (Anexo II).

Por el contrario, existen células irreversiblemente deformadas (CID) que no varían durante el mecanismo oxigenación-desoxigenación. La ocurrencia de ciclos repetidos provoca un flujo neto de iones fuera de la célula acompañados por pérdida de agua y por tanto, incrementa la concentración de Hb.¹⁰⁹ Aunque no existe una clara correlación clínica entre el porcentaje de CID y la frecuencia de las crisis, al parecer existe cierta correlación con la velocidad de hemólisis.^{1,4}

1.4 Compuestos químicos con potencial terapéutico

A pesar de los conocimientos sobre la etiopatogenia de la drepanocitemia aún no se cuenta con una terapia farmacológica efectiva de prevención o remisión de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad. Esta sólo comprende el manejo y el control general de los síntomas relacionados con las crisis, mediante el empleo de vasodilatadores,¹¹⁴ anticoagulantes y algunos inhibidores de la agregación plaquetaria,¹¹⁵ analgésicos,¹¹⁶⁻¹¹⁹ antibióticos¹²⁰⁻¹²² y la terapia transfusional.¹²³

1.4.1 Vías para inhibir la falciformación celular

Evitar la falciformación constituye el objetivo fundamental del tratamiento, una de las vías para lograrlo es mediante la inhibición de la polimerización de la dHbS. Se ha informado sobre una serie de compuestos que inhiben este proceso y, por tanto evitan la falciformación. Otros, aunque no interactúan de forma directa con la Hb pueden revertir la deformación celular. Estos compuestos se reconocen como agentes antidrepanocitarios o agentes *antisickling*.¹

1.4.1.1 Mecanismos para inhibir la polimerización de la dHbS

1) Prevenir los contactos intermoleculares

Interacciones no covalentes: interrumpen los enlaces débiles entre las moléculas de proteína. Algunos compuestos atacan las interacciones proteína-solvente a expensas de los contactos proteína-proteína y otros compiten por los sitios de contacto intermoleculares en el polímero.¹

Mediante este tipo de interacciones no covalentes fueron efectivos compuestos como: la urea; alquileas (metil-, etil-, propil-, butil-); algunos restos de aminoácidos como el triptófano (Trp), la fenilalanina (Phe) y la tirosina (Tyr) y péptidos de diferente tamaño.¹²⁴⁻¹²⁷

Un rasgo común en muchos de los compuestos estudiados es el núcleo aromático. Mientras mayor era la polaridad de éste, así como la hidrofobicidad del compuesto, mayor actividad antipolimerizante. Aunque fue demostrado, mediante el empleo de otras sustancias aromáticas (fenol, anilina, ácidos salicílico y acetilsalicílico) que la aromaticidad no es una condición suficiente para inhibir la polimerización.^{126,127} Del mismo modo se demostró que la hidrofobicidad de un péptido es simplemente aditiva; determinada por el número, tipo e interacciones no intramoleculares de la cadena.¹²⁷

En el estudio con péptidos no polares se descubrió que un mecanismo para la desestabilización en la formación de las fibras de dHbS, más que la interferencia con interacciones iónicas o enlazamiento de hidrógeno, podrían ser las interacciones no polares entre éstos y la proteína.¹²⁷ Un área disponible de interacciones no polares es la región donde se encuentran la Phe β 85 y la Leu β 88, sitios complementarios para la interacción de la Val β 6, la cual existe como un sitio de contacto entre trenzas adyacentes en el cristal. Los residuos 78-88 en una trenza de la cavidad contienen un número alto de cadenas hidrofóbicas laterales estrechamente empaquetadas. La aplicabilidad de los péptidos hidrofóbicos en el tratamiento de la drepanocitemia ha sido entorpecida por su carencia de permeabilidad hacia la célula, por lo que péptidos pequeños serían inhibidores más efectivos.¹²⁷

Interacciones covalentes: se enlazan firmemente a la Hb por compartimiento de electrones entre las moléculas. Entre los compuestos que establecen interacciones covalentes con la Hb se han estudiado el cianato (NCO)¹²⁸ y los aldehídos aromáticos.²²

El NCO inhibe la deformación eritrocitaria por carbamilación de la Hb por el grupo amino terminal (NH_2), alteración el equilibrio conformacional (T-R), aumenta la afinidad por el oxígeno e incrementa la deformabilidad de la membrana. Sin embargo, el empleo de éste incrementa el riesgo de efectos tóxicos al establecer un equilibrio con la urea en solución.¹²⁸

Los aldehídos aromáticos formaron una base de schiff, por adición nucleofílica con la Hb, en la región de los NH_2 de las cadenas β . Se observó en el patrón electroforético una banda en posición anodal a la Hb no modificada.²² Este enlazamiento incrementó la afinidad por el oxígeno al prevenir el enlazamiento normal con el 2,3-DPG, un potente efector negativo en el enlace con el oxígeno.²² Entre estos compuestos mostraron un marcado incremento en la afinidad de la Hb por el oxígeno el 2,4-dihidroxibenzaldehído, la vainillina (Anexo III) y la o-vainillina.²²

- La vainillina

Los estudios de Zaugg²² mostraron que la vainillina ocasiona un desplazamiento de la curva de disociación del oxígeno hacia la izquierda e incrementa el número de moléculas de HbS en estado soluble (relajado, R). En estudios de la reacción de la vainillina con la HbA y la HbS, por cromatografía líquida de intercambio iónico catiónico (HPLC-IC),²³ se obtuvieron tiempos de retención más cortos para el complejo Hb:vainillina que para los controles. Se demostró a su vez que la vainillina no produjo cambios significativos en el contenido iónico y de agua de la célula. En el análisis del patrón de cristalografía R-X se encontró un sitio principal y otro de menor ocupación en el enlace de la vainillina con la Hb (Anexo IV).²³ El sitio de menor ocupación se encontró entre la His 116 β y la His 117 β , identificada la primera como un sitio de contacto del polímero.

Este hallazgo sugirió que la inhibición de los contactos intermoleculares en el polímero podría ser el modo de acción antipolimerizante para la vainillina. Inhibir la polimerización de la dHbS a través de un mecanismo dualitario: (1) producir una variante de Hb de alta afinidad al incrementar el número de moléculas de HbS en estado R y (2) causar la inhibición estereoquímica de la polimerización de la dHbS.²³

Otros agentes antisickling covalentes o inhibidores estereoespecíficos no covalentes

Se ha estudiado una serie importante de moléculas aromáticas activas, definiendo algunos sitios de enlace en la cavidad crucial de la mutación. El donador para los derivados disustituidos del ácido benzoico y el aceptor para los salicilatos de la prolina.^{104,129-135}

2) Disminuir la concentración de la dHbS

La concentración de dHbS puede ser disminuida si se mejora la oxigenación de la HbS e incrementa la afinidad por el O₂. El tratamiento con O₂ hiperbárico causa una pronta disminución en la circulación periférica de las células falciformes, aunque aún no se ha dilucidado este efecto en las CVO.¹ En este sentido también han sido estudiados los aldehídos aromáticos,²² las soluciones alcalinas (bicarbonato de sodio) y los modificadores de los grupos sulfidrilos.¹

3) Disminuir la concentración de la HbS

La aceleración de la polimerización incrementa la falciformación antes de la salida de los eritrocitos de los capilares, por lo tanto, la prevención del incremento de la CHCM es una de las limitadas estrategias para disminuir la polimerización de la HbS y la falciformación celular. Teóricamente, la prevención de la deshidratación celular puede lograrse por incremento de la presión osmótica o mediante la contracción celular provocada por el ambiente ácido e hipóxico de la cama capilar.⁸¹

La pérdida de K⁺ (canal de Gardos), Cl⁻ y H₂O de los eritrocitos SS contribuyen a la deshidratación.⁸¹ El clotrimazol (CLT) y otros derivados del imidazol resultaron potentes inhibidores específicos del canal de Gardos de los eritrocitos SS (CLT > miconazol (MIC) > econazol > metronidazol).^{81,136} El CLT pudiera ser empleado en la prevención de la deshidratación de las células SS *in vivo* o en combinación con otros agentes terapéuticos como la hidroxurea (UH) o el fenilbutirato de sodio.^{137,138} Estudios similares se han realizado con ácido ocaídoico, fluoruro de sodio,¹³⁹ suplemento de magnesio oral¹⁴⁰, dimetil adipimidato,¹⁴¹ arginina¹⁴² y el ICA-17043.^{143,144}

Generalmente en la clínica de los casos de CVO se utiliza la dilución de Hb intracelular a través de la hidratación oral o parenteral; los análogos sintéticos de vasopresores para inhibir la excreción de agua renal, en combinación con un alto flujo hacia el interior; así como la restricción del sodio en la dieta.^{1,3}

Síntesis de otras hemoglobinas

Se ha sugerido que las células no falciformes en el recién nacido se deben a la presencia de la HbF. El descubrimiento de la persistencia hereditaria de HbF y su interacción con el portador (HbAS) proporcionó la evidencia clínica y las explicaciones para la inhibición al nivel molecular. La administración de 5-azacitidina (AzaC) a los recién nacidos anémicos causó un incremento marcado de la HbF pero se demostró en modelos animales que podía ser un carcinógeno.¹⁴⁵

La HU, aunque teratogénica y mutagénica en modelo animal, incrementó el número de eritrocitos con HbF, el porcentaje de HbF y la cantidad de HbF por célula.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Ésta afecta el transporte pasivo de K⁺, incrementa el volumen corpuscular medio (VCM), altera la permeabilidad de la membrana celular y la deformabilidad, a la vez que disminuye la adhesión de las células rojas al endotelio; por lo cual provoca la disminución de la severidad clínica y el número de CVO.¹⁴⁹⁻¹⁵⁵

De forma general la HU mejora los síntomas de la drepanocitemia severa en niños y en adultos, sin embargo no parece tener influencia sobre la prevención del desarrollo de complicaciones una vez que se presenta el daño del órgano asociado a la falciformación intravascular.¹⁵⁶⁻¹⁶³ Se ha llegado a la hipótesis de que el beneficio experimentado por algunos enfermos se debe, en parte, a la MetHbS y la posible formación de HbS-NO.¹⁵⁵ El efecto neto sobre la concentración de Hb está en función del balance entre la reducción en la producción de células rojas y el incremento de la supervivencia.¹⁶⁴⁻¹⁶⁹

1.4.1.2 Inducción de efectos sobre la membrana celular

Se ha observado que los agentes con actividad antidrepanocitaria, independiente de la polimerización y del cambio en la afinidad de la Hb por el O₂, afectan a la membrana eritrocitaria.¹⁷⁰

Los derivados de la fenotiazina [cloropromazina (CPZ), trifluopromazina (TRFP), trifluoperazina (TFP)], a bajas concentraciones, estabilizaron la membrana eritrocitaria y provocaron la formación de esferocitos (TFP > TRFP > CPZ); pero se asociaron con la hemólisis a altas concentraciones.^{171,172}

Entre los ésteres benzílicos de aminoácidos se destaca el efecto de la L-fenilalanina (Phe-Bz), a bajas concentraciones, sobre la membrana eritrocitaria.¹⁷³ La inserción de ésta en la cara interna de la bicapa lipídica inhibe el transporte activo de cationes e incrementa el flujo pasivo de cationes. Al incrementar el VCM disminuye la concentración de HbS intracelular. El rápido paso del Phe-Bz al interior de la célula favorece la hidrólisis de éste en L-Phe y alcohol benzílico, los que probablemente interactúan con la Hb. La L-Phe y el alcohol benzílico muestran un efecto sinérgico sobre la falciformación de eritrocitos, independiente de la acción del Phe-Bz. No obstante, el uso clínico del Phe-Bz está limitado debido a los efectos hemolíticos asociados.¹⁷³

- Los 1-O-alkilglicerol

Los 1-O-alkilglicerol, importantes fosfolípidos de la membrana, son considerados como precursores biosintéticos o catabolitos de los 1-O-alkilglicerofosfolípidos, precursores directos de los plasmalógenos.¹⁷⁴ Estos presentan la estructura básica de los más complejos glicerofosfolípidos de las membranas celulares, con una función éter alquilo como resultado de la eterificación de un alcohol graso de cadena larga, en la posición 1 del glicerol (Anexo III), a la cual se le atribuyen los efectos farmacológicos estudiados con estos compuestos.^{29,174} Se destacan las propiedades bactericidas, fungicidas, antitumorales, antiinflamatorias, inmunoadyuvantes y promotora de la absorción.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶

Se ha informado que los éteres de glicerol procedentes del aceite de hígado de tiburón reducen la mortalidad por cáncer,¹⁷⁷ mediante mecanismos diferentes que actúan de forma independiente o combinada.¹⁷⁸ Localizan selectivamente, *in vivo*, los tejidos tumorales; así como en dependencia de la dosis y la sensibilidad de la línea celular se comportan como agentes citotóxicos directos o aceleran el proceso de apoptosis.¹⁷⁹ Pueden inducir la desdiferenciación de células tumorales a normales tanto *in vitro* como *in vivo*, a la vez que inhiben el crecimiento y la invasión tumoral.^{180,181}

Una de las propiedades más comunes de esta familia de compuestos es su interacción e incorporación a las membranas celulares, probable origen de los múltiples efectos observados.³² En modelos animales aumentaron la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al provocar un *shock* osmótico e *in vitro* la intestinal como se demostró mediante el modelo de saco de ileon invertido.²⁸ Lo cual los ubica como posibles promotores de la absorción o vehículo de fármacos a través de membranas biológicas.³² Propiedad particularmente importante cuando se trabaja con medicamentos poco absorbibles.

Se ha demostrado que tanto los alquilglicerol naturales como los análogos sintéticos (C16 y C18) inhiben la transformación de las células falciformes, promueven la absorción de fármacos (vehículo), inhiben la respuesta inflamatoria inducida en diversos modelos animales y a nivel molecular mediante la inhibición de la actividad fosfolipasa A₂ (citósólica y de secreción) a la vez que exhiben efectos inmunoadyuvantes en esquemas de poliquimioterapia y en estudios *in situ*.^{29,31,34}

En 1988 se demostró que el rac-1-O-dodeciliglicerol estimula la fagocitosis en macrófagos (MΦ) mediada por el receptor Fc^{182,183} y en 1994 se demostró *in vitro* que incrementa la generación de O[•]₂ de los MΦ.^{184,185} Posee efectos adyuvantes sobre la producción de anticuerpos a la vez que estimula la diferenciación de las neuronas.¹⁸⁶ Uno de los efectos ampliamente estudiados para el 1-O-dodeciliglicerol es la actividad antimicrobiana. En 1984 se demostró que estimula la actividad autolítica en *Streptococcus faecium* ATCC 9790¹⁸⁷ e inhibe el crecimiento de algunos miembros de dos géneros de levadura: *Candida* y *Cryptococcus*, así como sinergiza con el efecto antibiótico de anfotericina B.¹⁸⁸

El 1-O-deciliglicerol (C10), evaluado por primera vez por el equipo de investigación del IFAL-UH, ha mostrado marcada actividad citotóxica sobre células tumorales de origen nervioso. Esta incluye varios mecanismos: el antitumoral, la diferenciación celular y la apoptosis (*observaciones no publicadas*).

1.4.1.3 Promoción del flujo capilar

Está bien documentado el uso de vasodilatadores para mejorar la circulación capilar durante las crisis dolorosas (Ej. papaverina). Así como, anticoagulantes para inhibir cambios secundarios de la coagulación a la VO en las crisis dolorosas; y algunos inhibidores de la agregación plaquetaria como la aspirina.^{1,57}

1.5 Nueva alternativa en la terapia de la drepanocitemia

Con los avances en la ingeniería genética se ha fortalecido el uso de la terapia génica como vía alternativa en el tratamiento de algunas hemoglobinopatías como la drepanocitemia y la talasemia. Esta consiste en el reemplazo del gen β -globínico anormal por uno normal mediante el trasplante de médula ósea (TMO) o de células hematopoyéticas (*stem-cell*), cuando existen donantes compatibles disponibles. Esta terapia ofrece, a los enfermos con drepanocitemia, una mejor expectativa en cuanto a la longevidad y calidad de vida.^{189,190} El TMO es usado como una terapia alternativa específicamente para aquellos enfermos sometidos a largos regímenes de transfusiones. Se han informado muy pocos casos con resultados satisfactorios que aún se encuentran sometidos a monitoreo continuo, por su complejidad y dependencia de factores de aceptación o rechazo por el organismo.¹⁹⁰

La terapia génica constituye una alternativa futura que encierra ventajas y riesgos para el enfermo con drepanocitemia. Además es una vía más costosa y de menor posibilidad de ejecución en aquellos países de mayor prevalencia de la drepanocitemia. Independientemente del problema que ésta plantea: ¿Cómo transferir efectivamente genes de forma segura o de riesgos compatibles con la vida y que no afecten la calidad de ésta?.¹⁹¹⁻¹⁹³

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

En este capítulo se presenta un sistema de experimentos en función de los objetivos propuestos. En él se describe la metodología de trabajo utilizada para cada una de las determinaciones analíticas realizadas. Se presenta un estudio *in vitro* de los efectos de diferentes relaciones molares de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos, mediante la determinación de la acción antidrepanocitaria, así como de la influencia sobre componentes sanguíneos de los enfermos con drepanocitemia. La actividad antipolimerizante de la vainillina se evaluó para relaciones desde 1:1 hasta 1:15 con el objetivo de obtener la concentración óptima para la posible acción farmacológica. En el caso de los 1-O-alkilgliceroles se evaluaron las relaciones 1:1, 1:5 y 1:10 en todos los experimentos porque se conoce que sus propiedades farmacológicas han sido previamente informadas por otros investigadores.

2.1 Reactivos

La vainillina de origen comercial (Panreac, España) y los 1-O-alkilgliceroles obtenidos por el grupo de síntesis química del Departamento de Química Orgánica del IFAL-UH. El método de síntesis basado en la reacción de Williamson a partir del 1,2-O-isopropilidenglicerol, con el uso de 1-clorododecano y 1-clorodecano como derivados halogenados. La caracterización y control de la calidad de los alkilgliceroles, con >90% de pureza, fue realizada por cromatografía gaseosa acoplada a masa en Francia. El resto de los reactivos fueron comerciales procedentes de Sigma (St Louis MO), Merck (Alemania), Alfa Aesar, Imefa (Cuba). Juego de reactivos para determinaciones bioquímicas RANDOX (NX2332, Francia), juego de reactivos IEF-M1A (pl 3,6-9,3 Lot 015H9524: pl 6,6 C-6653, pl 6,8/7,2 M-9267, *Pharmacia*, Suiza), y Cytoseal™ 60 (Richard-Allan Scientific).

2.2 Material biológico

Las pruebas se realizaron *in vitro* con sangre total procedente de adultos asintomáticos con drepanocitemia, suministrada por el Hospital General de Santiago de Cuba y el Instituto Nacional de Hematología e Inmunología de Ciudad de La Habana; previo consentimiento informado (Anexo V).

Se excluyó de las pruebas la sangre procedente de embarazadas y de aquellos que se encontraban bajo tratamiento con HU, así como los transfundidos o sometidos a otros tratamientos en un plazo ≤ 2 meses. La sangre total de donantes voluntarios empleada como control fue suministrada por los Bancos de Sangre de Santiago de Cuba y Ciudad de La Habana. Todos los protocolos de investigación fueron aprobados por los comités científicos y de ética correspondientes.

2.2.1 Preparación de la sangre total

La sangre total heparinizada se centrifugó a 3000 r/min durante 10 min, el precipitado celular fue sometido a tres lavados consecutivos con solución amortiguadora (PBS) pH 7,4 para obtener un concentrado de eritrocitos, al que se le determinó la concentración de Hb según el método de la cianometahemoglobina.¹⁹⁴ A partir de este dato se calculó la cantidad de compuesto a adicionar para establecer relaciones molares con la Hb. Cada compuesto fue diluido en 100 μ L de etanol absoluto y 900 μ L de PBS, para un volumen final de 1 mL de solución hidroalcohólica.³⁶

2.3 Determinación del efecto hemolítico de la vainillina y los 1-O-alkilglicerol

El estudio del efecto hemolítico de la vainillina y los alquilglicerol sintéticos sobre los eritrocitos se realizó por el método espectrofotométrico.¹⁹⁵ El porcentaje de hemólisis (%H) se calculó a partir de los valores de densidad óptica (DO) medidos en el sobrenadante de cada prueba.¹⁹⁵

Para la vainillina se realizaron nueve pruebas para cada una de las relaciones molares (hemoglobina: compuesto) 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:8 y 1:10, en solución de eritrocitos procedentes de enfermos con drepanocitemia, y nueve a 1:1, 1:4, 1:8 y 1:10, para la sangre procedente de donantes voluntarios.^{196,197}

Para los 1-O-alkilglicerol sintéticos: 1-O-decilglicerol (C10) y 1-O-dodecilglicerol (C12), se realizaron siete pruebas para cada una de las relaciones molares 1:1, 1:5 y 1:10.

El estudio de los efectos hemolíticos se realizó por triplicado para cada una de las relaciones molares, se procedió como se muestra en la Tabla 1, en todos los casos se utilizó un control positivo para actividad hemolítica, un control negativo y un control negativo (*) al que se le adicionó la solución vehículo.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷

Tabla 1. Procedimiento para el estudio del efecto hemolítico de los compuestos sobre los eritrocitos.*195

V _i =10 mL	0,1% Na ₂ CO ₃ (mL)	PBS pH 7,4 (mL)	Concentrado celular diluido (mL)	Solución compuesto (mL)	Solución vehículo (mL)
Control positivo	9,8	-	0,2	-	-
Control negativo	-	9,8	0,2	-	-
Control negativo*	-	9,79	0,2	-	0,01
Mezclas de reacción	-	9,79	0,2	0,01	-

Control positivo 0,1% Na₂CO₃, control negativo PBS pH 7,4 y control negativo (PBS pH 7,4+vehículo).195

Después de adicionar los compuestos se agitaron las mezclas y se dejaron reposar durante 30 min, posteriormente se centrifugaron, se descartó el precipitado y se retuvo el sobrenadante en el que se midió la DO a 545 nm, en el espectrofotómetro *UV-Vis ULTROSPEC III (Pharmacia)*, para detectar la liberación de Hb. Utilizando los valores de DO se calculó el %H provocado según:195

$$\%H = \frac{DO_m - DO_{cn}}{DO_{cp} - DO_{cn}} \times 100$$

(1)

Donde: DO = densidad óptica m = muestra cn = control negativo cp = control positivo

Estos datos se promediaron para cada relación molar y se graficaron en *Microsoft Excel 97*, para las curvas de actividad hemolítica por cada una y la curva promedio por prueba.

2.4 Determinación del efecto de los compuestos sobre la polimerización de la dHbS

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN), particularmente la Relajación Protónica (RM-¹H) es potencial para el estudio de los diferentes estados en que se pueden encontrar las moléculas de H₂O en los eritrocitos falciformes,³⁵ las cuales experimentan variaciones en la movilidad debido a la formación de polímeros en el medio y provocan un acortamiento del tiempo de relajación espín-espín (T₂).³⁵ Las variaciones temporales de T₂ describen la cinética de la polimerización de la HbS intracelular o en solución, diferenciándose tres estados característicos.^{198,199}

El primero se corresponde con las moléculas de Hb predominantemente disueltas en el medio, el segundo caracteriza el equilibrio existente entre las moléculas de Hb disueltas y las que forman el polímero (nucleación) y el tercero donde se encuentran las moléculas de Hb predominantemente en el polímero (Figura 1).^{35,100,102}

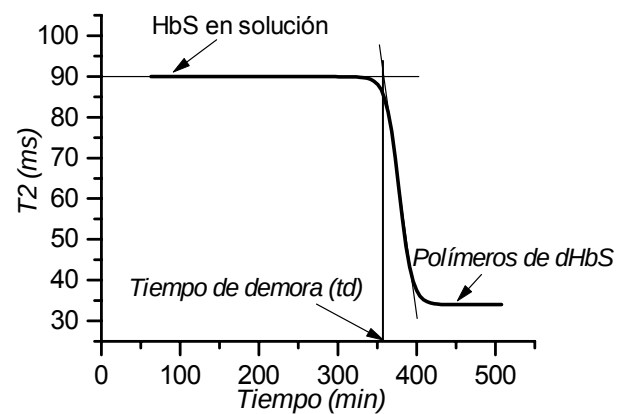


Figura 1. Curva sigmoide que describe la cinética de polimerización de la dHbS siguiendo la variación temporal (minutos) de T2 por RM-¹H en el Relaxómetro Universal cubano Giromag®01. T2 (ms): tiempo de relajación espín-espín.³⁵

Para determinar el efecto de los compuestos sobre el td de la polimerización de la HbS, se establecieron las condiciones experimentales que reflejaran de forma objetiva la manifestación del fenómeno en el sistema biológico seleccionado.³⁵ Como se conoce, cada enfermo muestra un valor de td característico porque inicialmente se poseen parámetros anatomofisiológicos propios, entre los que podemos señalar: pO_2 en sangre, pH, concentración de HbS y de HbF.^{35,198} Debido a esto, los preparados se termostataron a la temperatura de mínima concentración de solubilidad de la solución de HbS (36°C) y el pH se mantuvo en 7,4.¹⁹⁹ La pO_2 , así como la concentración de HbS y HbF, no fueron controlados a pesar de conocer que éstos influyen directamente en la polimerización. La concentración de HbF, registrada en la historia clínica de cada enfermo con drepanocitemia que accedió voluntariamente para que utilizaran su sangre, era diferente para cada uno de ellos (datos no mostrados). Los experimentos se realizaron bajo condiciones de desoxigenación espontánea de los preparados y con concentraciones de HbS diferentes.¹⁹⁸

Es conocido que el tamaño y la cantidad de los dominios que se forman en la agregación molecular dependen de la escala de tiempo en la cual ocurre la polimerización, la desoxigenación espontánea garantiza que el número y las dimensiones de los dominios formados sean más reproducibles.^{35,97,100} Los métodos que utilizan condiciones de desoxigenación forzada, a pesar de no estar alejada de las condiciones fisiológicas (salvo el valor del gradiente de concentración de O₂), tienen inconvenientes experimentales, entre los que se encuentran:¹⁹⁹

- El tiempo de duración de la agregación molecular es muy corto y, por tanto, el desarrollo del proceso sólo puede ser observado con contados métodos experimentales.
- Provocan altas concentraciones de O₂ disuelto lo cual hace que disminuyan los tiempos de relajación en el método de relajación magnética.
- Provocan cambios significativos en los parámetros que rigen la estabilidad de la solución de HbS como sistema físico, lo que trae como consecuencia comportamientos que dependen de las condiciones iniciales, dispersan los resultados y complican la interpretación de los mismos.

Teniendo en cuenta este análisis la metodología de relajación magnética empleada en el estudio de la polimerización de la HbS, en condiciones de desoxigenación espontánea, resulta útil en la evaluación de la acción de compuestos químicos sobre la polimerización de la HbS.¹⁹⁹

Se utilizó el Relaxómetro Universal *Giromag*®01 (Santiago de Cuba, Cuba) para estudiar el comportamiento temporal de T₂ a la frecuencia de 4,4 MHz con la serie de impulsos 90°-τ-180° (Hahn).^{35,199} A partir de las curvas características del proceso se determinó el td, cuya variación permitió evaluar la acción de los agentes químicos sobre el proceso de polimerización de la dHbS y su relación con la concentración de los mismos.³⁶⁻⁴¹ Se reportó un 5% de error sistemático y un intervalo de 3-9% de error aleatorio en la medición de T₂ y determinación del td.³⁵

El hemolizado de eritrocitos SS se obtuvo a partir del concentrado celular lavado (como se describió en 2.2.1), mediante dos ciclos de congelación y centrifugación (-4°C, 3 000 r/min, 10 min). Seguidamente se determinó la concentración de Hb liberada en éste y se le controló el valor de pH. Se formaron alícuotas de 1,5 mL que se conservaron a 4°C hasta el momento de realizar la prueba.^{39,40}

Los compuestos fueron disueltos en etanol absoluto/PBS al 20%. Para evaluar el efecto de éstos sobre la polimerización de la dHbS se realizaron veinte pruebas a las relaciones molares 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:10, 1:11, 1:13 y 1:15 de vainillina^{39,40} y cuatro a las relaciones molares 1:1 y 1:5 de los 1-O-alkilgliceroles. Para ello se adicionaron 20 µL de solución hidroalcohólica de cada compuesto a cada una de las alícuotas del hemolizado. De cada una de las mezclas de reacción se tomaron 500 µL que se depositaron en ámpulas de RMN (tres réplicas por relación molar).⁴⁰ Para cada prueba se midió un patrón de HbS y un control a la que se añadió 20 µL de la solución hidroalcohólica (vehículo). Durante el curso de las mediciones todas las muestras se mantuvieron en un baño de agua calibrado a 36°C.¹⁹⁸

Los datos se graficaron utilizando el *Microcal Origin 3.5* como programa estadístico profesional. La curva sigmoideal de la variación temporal de T2 se ajustó (Sigmoide de Boltzman) y normalizó en un intervalo de 0 a 1, para facilitar la diferenciación del td en cada caso. Se realizó un ajuste por regresión lineal y se determinó el valor del td.^{35,198} La influencia de la concentración sobre la polimerización se evaluó a partir del cálculo del porcentaje de variación de td (%Vtd) para cada relación molar (rm) con relación al patrón (pat).^{39-41,198}

$$\%Vtd = \frac{td(rm) - td(pat)}{td(pat)} \times 100 \quad (2)$$

2.5 Determinación de la modificación de la Hb por focalización isoelectrica

La focalización isoelectrica provoca la migración de las moléculas de acuerdo a su punto isoelectrico (pI) en un gradiente de pH estable generado por anfolitos transportadores y logra una mejor separación de las cadenas de la Hb.^{200,201} La HbS muestra una movilidad electroforética alterada pues ésta es más electropositiva que la HbA, de modo que migra lentamente hacia el polo positivo (ánodo).²⁰¹ Este comportamiento electroforético indica la incidencia de la composición y secuencia aminoacídica sobre la carga neta de la molécula. Al modificarse la Hb por interacción química con otras sustancias, la especie formada se focalizará en una posición ligeramente anodal respecto a la Hb no modificada.^{22,38}

Se utilizó un sistema de Electroforesis (*Pharmacia*, Suiza) con una cámara horizontal termostatada *Multiphor II* y una fuente *MultiDrive XL*.

Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada. Se prepararon geles de poliacrilamida T=7,5% C=3% (125 mm x 260 mm x 0,5 mm), a partir del procedimiento técnico establecido en el Laboratorio de Biofísica del CBM.³⁸ Los parámetros de precorrida fueron: 1 000 V, 30 mA, 25 W, 30 min, 10°C; y para la corrida: 1 000 V, 15 mA, 15 min, 15 W, 10°C.^{38,200}

Se realizaron 11 corridas con las alícuotas del hemolizado procedente de donantes voluntarios (HbA) y 13 con el de los enfermos con drepanocitemia (HbS). Se partió de 1 mL de sangre total al que se adicionó 10 µL de solución hidroalcohólica de vainillina para una relación molar de 1:20.³⁸ Como control se utilizó 1 mL de sangre total a la cual se le adicionaron 10µL de la solución vehículo. Éstas se incubaron con agitación constante durante una hora a 37°C. De cada solución se tomaron 5 µL y se provocó la hemólisis con soluciones de urea y 2-mercaptoetanol. Se aplicaron 5 µL del hemolizado a cada gel de corrida (2 réplicas por prueba). Para determinar el pI del complejo Hb:vainillina se aplicó en el gel de corridas electroforéticas, 5 µL ($C_f=1$ mg/mL) de los marcadores de pI 6,6 (anhidrasa carbónica I de eritrocitos humanos) y pI 6,8/7,2 (mioglobina de corazón de caballo).³⁸

El proteinograma o fraccionamiento eléctrico de cada proteína se midió manualmente en cm (regla graduada, 0,01 mm) y los datos obtenidos fueron procesados con el paquete *Microcal Origin v3.5*.³⁸

2.6 Estudio de la reacción entre la vainillina y la Hb por cromatografía líquida

Se estudió la estabilidad en el tiempo del producto de la reacción entre la vainillina y la Hb, por intercambio iónico catiónico, teniendo en cuenta la versatilidad, especificidad, precisión y rapidez de la cromatografía líquida.^{38,202} Con el uso de un cromatógrafo HPLC (*Pharmacia*, Suiza) compuesto por un sistema de gradientes con 2 bombas 2048, mezclador de alta presión externo, puerto de inyección y detector monitor variable UV-Visible (190-600 nm) VWM 2141, y una columna de intercambio catiónico TSK CM-3SW (150mm x 7.5mm) (*Toyo Soda*). Las soluciones A (BIS-TRIS 0,05 M; KCN 0,0015 M; pH 6,40) y B (A + CH₃COONa 0,15 M; pH 6,40) como fase móvil. Los solventes fueron desgasificados durante cinco min y filtrados, al igual que las alícuotas a analizar, en membranas 0,45 µm.³⁸

Se estableció un gradiente de 0 – 100 % B durante 10 min, 100 % B en 8 min y 100 – 0 % B en 2 min, a una velocidad de flujo de 1mL/min y se detectó a 415 nm. Se utilizó un laso de 10 µL para la inyección en la columna.

A partir de 3 mL de sangre venosa total heparinizada, procedente de enfermos con drepanocitemia (HbS), se tomó una alícuota de 1 mL y se adicionaron 10 µL de solución hidroalcohólica de vainillina, para establecer las relaciones molares Hb:vainillina 1:10 y 1:20, con el objetivo de lograr la saturación de la Hb, para mantener el valor de concentración del aldehído próximo al de la dosis terapéutica estimada por Abrahan (1991).^{23,38} La mezcla de reacción fue mantenida a 37°C durante 90 min con agitación constante. Posteriormente los eritrocitos se lavaron con solución salina (0,9% NaCl), 10 µL fueron hemolizados en 2 mL de fase móvil A y a continuación se realizó la filtración con membranas de 0,45 µm. Procedimiento que se repitió para cada uno de los tiempos de incubación.

La inyección de las mezclas se realizó después de 1:30 h, 2 h, 2:30 h, 3 h, 4h y 7:30 h de la incubación con vainillina a la relación 1:20; mientras que para la relación 1:10 se inyectó a los 30 min, 1 h, 1:30 h, 2 h, 3:30 h, 4 h y 6:30 h. Se procedió igual con el control de la solución vehículo y con mezclas de donantes voluntarios (HbA) a la relación molar 1:20. Se realizaron 10 experimentos, los cromatogramas se adquirieron con el programa central del equipo y procesados con el paquete *PE Nelson v2.6*.³⁸

2.7 Efectos de los compuestos sobre los eritrocitos SS por microscopía óptica

Existe una dependencia directa entre la polimerización de la HbS y la falciformación de los eritrocitos, donde la variedad de formas que asumen las células se encuentra directamente relacionada con la velocidad de desoxigenación.^{2,102} A través de la prueba de Huck o prueba directa de falciformación al microscopio óptico, se realiza el análisis morfológico por la acción de los compuestos sobre los eritrocitos SS. Al estudiar los cambios morfológicos se puede corroborar la relación existente entre polimerización y deformación, así como comprobar si el compuesto logra inhibir ambos procesos. Si el compuesto inhibe la falciformación de los eritrocitos el porcentaje de drepanocitos debe disminuir con relación a la muestra control y aumentar el número de otras alteraciones morfológicas, preferentemente equinocitos.

2.7.1 Efectos de la vainillina sobre los eritrocitos SS

En el estudio del efecto de la vainillina sobre los eritrocitos SS se realizaron ocho pruebas a partir de sangre total procedente de enfermos con drepanocitemia (2.2.1), para obtener un volumen de eritrocitos con una concentración de Hb de 254 g/L. El concentrado de eritrocitos se diluyó en PBS pH 7,4 para un $V_f=10$ mL. A partir de esta solución se tomaron alícuotas de 1 mL que fueron incubadas a 36°C con la vainillina, a las relaciones molares 1:1, 1:2 y 1:10. Estas mezclas de reacción se prepararon por duplicado y se utilizaron en cada caso dos controles positivos (solución de eritrocitos sin tratar) y dos controles negativos (solución de eritrocitos con solución vehículo). A continuación se depositaron 10 μ L de cada una de estas disoluciones en un portaobjetos, se cubrió y selló con parafina para lograr condiciones anoxigénicas espontáneas.

Las láminas fueron observadas al microscopio óptico *MHN 8* en el momento de la preparación o tiempo inicial t_0 , a las 6 h (t_{6h}), a las 12 h (t_{12h}) y a las 24 h (t_{24h}). Se utilizó una cámara de video acoplada a una computadora, los programas *Ortopack ver.2.0* y *Photodeluxe 2.0* para procesar la imagen obtenida. Para cada lámina se determinó un campo de 200 células y se realizó el conteo de drepanocitos en el mismo.

2.7.2 Efectos de los 1-O-alkilglicerol sobre los eritrocitos SS

Para la valoración del efecto de los alquilglicerol sobre los eritrocitos SS se realizaron ocho pruebas a partir de 5 mL de sangre total procedente de pacientes con drepanocitemia (2.2.1). Las mezclas de reacción, para cada relación molar (1:1 y 1:5), se obtuvieron al mezclar 200 μ L de solución de eritrocitos, 200 μ L de bisulfito de sodio y 200 μ L de la solución de alquilglicerol, en un vial que se selló con papel parafinado, para evitar la incorporación de O_2 en el espacio libre. A las 24 h y 48 h se extrajeron 10 μ L de cada vial para realizar los frotis, que fueron contrastadas con hematoxilina y eosina y fijadas con Cytoseal™ 60. Para el conteo de drepanocitos se procedió igual que en las pruebas con vainillina. Se utilizó un microscopio óptico de alta resolución *LaborLux S Leitz* con cámara digital (*Panasonic Súper DYNAMIC*) acoplada con el programa *ATI Play*.

2.8 Efectos de la vainillina sobre los eritrocitos SS por microscopía electrónica de transmisión

Se utilizó la microscopía electrónica de transmisión (MET) para evaluar el efecto de la vainillina sobre la polimerización de la HbS y la formación de las fibras poliméricas. Las pruebas se realizaron en concentrados de eritrocitos (2.2.1) obtenidos a partir de la sangre total heparinizada de un paciente con drepanocitemia.²⁰³ Se empleó una solución hidroalcohólica de vainillina a la concentración 0,15 M (C1). Fueron añadidos 50 µL de C1 a 1mL del paquete celular con HbS (2mM), para una relación molar 1:4 (vainillina 8 mM), y se incubó durante 5 y 24 h. Para los tiempos t_0 , t_{5h} y t_{24h} , se utilizaron muestras de eritrocitos con HbS y con Hb normal A como controles positivo y negativo, respectivamente.²⁰³

Una vez tratadas las mezclas, éstas se fijaron con glutaraldehído al 3,2% durante 1 h, se lavaron con solución amortiguadora cacodilato tres veces durante 20 min, se postfijaron con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 2% durante 1 hora y se lavaron con cacodilato dos veces durante 5 min a 4°C.²⁰³ A continuación se realizó la deshidratación en alcohol absoluto de concentraciones crecientes (30, 50, 70, 80, 90 y 100 %), infiltración e inclusión en la resina Spurr. Se realizaron los cortes en un Ultramicrotomo Nova (L.K.B.), se colocaron en rejillas de 400 µm y se contrastaron con sales de acetato de uranilo y citrato de plomo. La observación y toma de las microfotografías se realizaron en el Microscopio Electrónico Jeem 2000 EX Jeol con un voltaje de aceleración de 80.0 kV.²⁰³

2.9 Evaluación del estado redox en la drepanocitemia y efectos de los compuestos sobre éste

Se ha informado que en los enfermos con drepanocitemia se presentan alteraciones de la defensa antioxidante, asociadas a los daños en los fosfolípidos y las proteínas de las membranas de los eritrocitos.^{93,95} Considerando estos hechos se realizó la determinación de la concentración plasmática de los antioxidantes totales (AT), de MDA y de glutathion reducido (GSH), así como la actividad de la SOD y la CAT.⁹³ Por otra parte, se evaluó el efecto de la vainillina y los 1-O-alkilglicerol sobre estos marcadores del estado redox.

Las determinaciones bioquímicas se realizaron según la metodología establecida en los procedimientos normalizados y validados por el Laboratorio de Bioquímica del Centro Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB) del Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), y se utilizaron como referencia (VR) los indicadores establecidos por éste para una población supuestamente sana.²⁰⁴⁻²⁰⁶

2.9.1 Preparación e incubación de la sangre con los compuestos

El estudio *in vitro* del estado del balance redox de los enfermos con drepanocitemia, se realizó a partir de la sangre total procedente de 14 enfermos. Los efectos de la vainillina (1:4) y los 1-O-alkilglicerol sintéticos (1:1 y 1:5) sobre este sistema, se evaluaron en mezclas de reacción a partir de la sangre total procedente de 9 enfermos. Para la determinación de cada uno de los marcadores del estado redox se partió de 1 mL de sangre total, después se centrifugó (3 000 r/min, 15 min), se descartó el precipitado y se retuvo el sobrenadante (plasma) para las determinaciones bioquímicas. En el caso de las determinaciones de MDA, GSH y SOD se deslipidó el plasma según describe la metodología.²⁰⁷⁻²⁰⁹ La lectura de la DO se realizó en el sistema ultra-micro analítico *SUMA* (Lector de placas PR 521, Tecnosuma La Habana, Cuba) y en el espectrofotómetro UV-Vis *ULTROSPEC Plus* (Pha-LKB).

Para evaluar el efecto de los compuestos se tomó 1 mL de sangre total al cual se le adicionó 100 µL de la solución de cada uno de estos a las relaciones molares de trabajo, se incubó durante 1 h, después se centrifugó (3 000 r/min, 15 min), se descartó el precipitado y se retuvo el sobrenadante.

2.9.2 Determinación de antioxidantes totales

Se empleó el método colorimétrico utilizando el juego de reactivos *RANDOX*. El 2,2'-azinodi-[3-etilbenzotiazolinosulfonato] (ABTS®) reacciona con una peroxidasa (metamioglobina) y H₂O₂ para producir el radical catiónico ABTS®.+ de color verde azulado, relativamente estable, medible a 600 nm. Los antioxidantes presentes en la muestra adicionada causan la supresión de la producción del color en un grado proporcional a su concentración. La concentración de los AT se determinó según:

$$AT \text{ (mmol/L)} = \text{Factor} \times (\Delta DO_b - \Delta DO_m) \quad \text{Donde: Factor} = \frac{\text{concentración patrón}}{(\Delta DO_b - \Delta DO_p)}$$

diferencia de la densidad óptica (ΔDO); muestra (m); patrón (p); blanco reactivo (b)

2.9.3 Determinación de la concentración de malonildialdehído

Los niveles de peroxidación lipídica se estimaron determinando la concentración de MDA.^{205,208} Mediante la reacción entre el N-metil-2-fenil-indol y el MDA, luego de la incubación a 45°C durante 60 min, se produce un cromóforo estable cuya DO se registró a 590 nm en el SUMA. El empleo de esta longitud de onda y la baja temperatura de incubación minimizan las interferencias, presentes en otros métodos, para determinar estos aldehídos derivados de la peroxidación lipídica. De conjunto con los preparados se midieron los patrones de MDA (2,5; 5; 10; 15 y 20 µM). Los cálculos de la concentración de MDA se realizaron con el patrón 10 µM $[MDA \mu M = (\Delta DO_m / \Delta DO_p) \times 10]$.^{205,209}

2.9.4 Determinación de la concentración de glutatión reducido

La concentración de GSH se determinó por la reacción con el ácido 5,5'-Ditiobis (2-nitrobenzoico) DTNB que rinde el cromóforo que absorbe a 412 nm. Para cuantificar la concentración de GSH (mg/L) se realizó una curva patrón de GSH.^{93,207} Se mezclaron 2 900 µL de solución amortiguadora pH 8,00 y 50 µL del deslipidado (2.9.1). Luego se adicionaron 50 µL de DTNB en la cubeta, se tapó, agitó y se leyó la DO a 412 nm.

2.9.5 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

La determinación de la actividad de la SOD total se realizó por la técnica del pirogallo.^{93,204} Éste en medio básico se autooxida y genera en el medio de reacción el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). De esta forma la reacción radicalaria se propaga y acelera la autooxidación del pirogallo cuya forma oxidada absorbe la luz a 420 nm. La presencia de un secuestrador de $O_2^{\cdot-}$ en el medio, como la SOD, inhibe la autooxidación al evitar las reacciones de propagación.⁹³ Primeramente se realizó el ensayo de la reacción no inhibida (blanco) y se leyó la diferencia de DO en 1 min a 420 nm. El mismo procedimiento se siguió en el ensayo añadiendo 100 µL del deslipidado (2.10.1) en lugar del H_2O utilizada para el blanco. Se calculó la actividad enzimática $U mL^{-1} min^{-1} = [(\Delta DO_m / \Delta DO_p) \times 100 / - 100] \times 0,6$.

2.9.6 Determinación de la actividad de la catalasa

La CAT es una hemoenzima que se encuentra ubicada preferentemente en los peroxisomas de las células animales y cataliza la inactivación del H_2O_2 tóxico, convirtiéndolo en agua y oxígeno.^{93,208}

La técnica se basa la medición de la variación de la DO (240 nm), que tiene lugar durante la descomposición del H_2O_2 por la CAT. Se adicionaron 900 μL de solución amortiguadora pH 7,0 en la cubeta, 500 μL H_2O_2 50 mM, 100 μL del sobrenadante (2.9.1) y se invirtió para homogenizar. Se leyó la DO a los 10 y 70 s de reacción y se calculó la actividad en $\text{UL}^{-1}\text{min}^{-1} = (\Delta\text{DOm} - \Delta\text{DOp}) \times 30\,000$.²⁰⁶

2.10 Procesamiento estadístico

En el análisis de los datos se utilizaron los paquetes estadísticos *Statistica v4.5* para windows y el *Statgraphics plus v2.1*. Se realizó un análisis descriptivo en el cual se calcularon la media y la desviación estándar para cada grupo experimental. Se compararon las medias con la prueba de comparación múltiple de Duncan, el análisis de varianza simple (anova), el t-student para comparar dos grupos y la prueba de Kruskal-Wallis para variables con un comportamiento no paramétrico, con un nivel de significancia al 95%. Se hizo un análisis de regresión y correlación con el objetivo de determinar el grado de asociación entre las variables estudiadas.

CAPÍTULO 3. EFECTOS DE LA VAINILLINA Y LOS 1-O-ALQUILGLICEROLES SINTÉTICOS SOBRE COMPONENTES SANGUÍNEOS DE ENFERMOS CON DREPANOCITEMIA

En este capítulo se presentan los principales hallazgos de la caracterización, por relajación magnética protónica, de la polimerización de las moléculas de dHbS. En las mezclas de reacción con vainillina se encontró un incremento del td. Ésta, interrumpió la formación y crecimiento organizado de los polímeros en los dominios. Por otra parte la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos mostraron una tendencia a revertir la drepanocitosis mediante la recuperación de la forma bicóncava discoidal, sin incrementar los eventos hemolíticos. Se corrobora el mecanismo de acción de la vainillina mediante la inhibición de los sitios de contacto intermoleculares, por interacción covalente con la Hb, que modifica su patrón electroforético y forma un complejo estable con un tiempo de vida medio 4 horas. Los 1-O-alkilgliceroles sintéticos favorecieron la formación de equinocitos probablemente debido a las propiedades surfactantes y como portadores de la estructura básica de los éteres de glicerofosfolípidos y lisofosfolípidos, así como alteraron el estado micelar crítico de la estructura supramolecular de la membrana celular. También se observó la manifestación de un desbalance redox de los eritrocitos SS, por depleción del estado antioxidante de la célula, así como un probable efecto de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles en la compensación de éste, principalmente de un incremento de los antioxidantes totales.

3.1 Actividad hemolítica de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos

A partir de los valores de DO medidos en cada mezcla de reacción, para cada uno de los compuestos estudiados, se calculó el porcentaje de hemólisis (%H) ((1), 2.3). A partir de éste se calculó el valor promedio correspondiente a cada compuesto por cada una de las concentraciones de trabajo.

El efecto hemolítico *in vitro* de la vainillina, el decilglicerol y el dodecilglicerol, sobre los eritrocitos de donantes voluntarios fue no significativo ($p \geq 0,05$). El %H promedio osciló en un intervalo de $(0,15 \pm 0,3) - (0,35 \pm 0,6) \%$, $(0,5 \pm 0,49) - (1,31 \pm 1,4) \%$, $(0,11 \pm 0,3) - (1,07 \pm 1,6) \%$; para la vainillina,¹⁹⁶ C10 y C12, respectivamente. Sin diferencias ($p \geq 0,05$) entre cada una de las relaciones molares empleadas.

En el estudio del efecto hemolítico sobre las células procedentes de enfermos con drepanocitemia los resultados fueron similares a los de donantes voluntarios, para cada uno de los compuestos evaluados. En la Figura 2 se muestra el %H promedio calculado para cada una de las relaciones molares de la vainillina.¹⁹⁶ No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre las relaciones molares 1:1, 1:2, 1:4, 1:5 y 1:8. Se obtuvo un incremento moderado y significativo ($p < 0,05$) de la actividad hemolítica a la relación molar 1:10, en comparación con 1:1, 1:2, 1:4 y 1:5, y no significativo ($p \geq 0,05$) con 1:8. El %H promedio por concentración osciló en un intervalo de $(0,23 \pm 0,4) - (1,69 \pm 2,0)\%$.¹⁹⁶

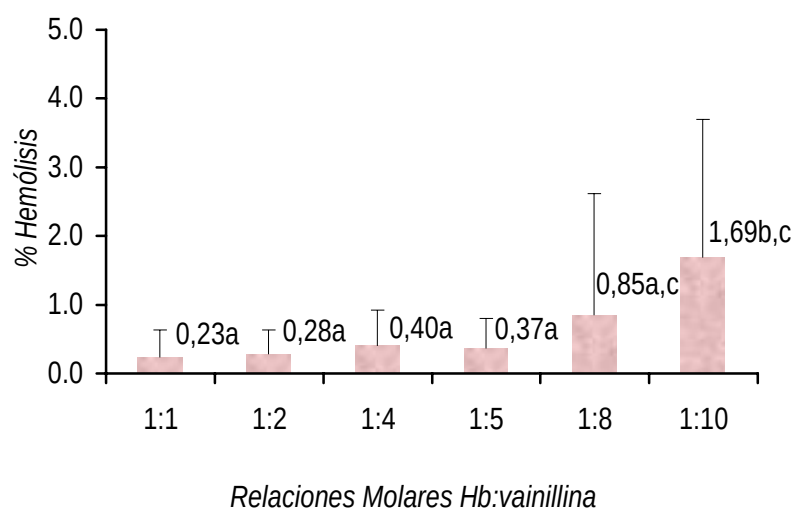


Figura 2. Efecto hemolítico de diferentes relaciones molares de la vainillina sobre los eritrocitos SS. Porcentaje de hemólisis (%H) calculado a partir de la medición de la DO por espectrofotometría. La vainillina, a 1:10, incrementó ($p < 0,05$) moderadamente la hemólisis, con relación a 1:1, 1:2, 1:4 y 1:5. Los datos representan la media $\pm$ D.E. de $n = 9$ pruebas, por relación molar. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p \geq 0,05$).¹⁹⁶

Los 1-O-alkilgliceroles manifestaron un comportamiento similar al observado con los eritrocitos procedentes de donantes voluntarios. En la Figura 3 se muestra el %H promedio, por relación molar, calculado en los preparados tratados con C10 y C12. Los datos indican una actividad hemolítica baja dentro del intervalo permisible (hasta 10%) según la técnica utilizada.¹⁹⁵ El %H por concentración provocado por C10 osciló en un intervalo de $(0,23 \pm 0,3) - (1,94 \pm 1,3)\%$, mientras que para C12 fue de $(0,29 \pm 0,4) - (1,11 \pm 0,8)\%$.

La actividad hemolítica de C10 fue ligeramente superior a la de C12, excepto a la relación molar 1:1. No se obtuvieron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las relaciones molares de los preparados tratados con C12; mientras que, con C10 a la relación 1:10 se incrementó ligeramente la hemólisis en relación con 1:1 y 1:5 ($p < 0,05$).

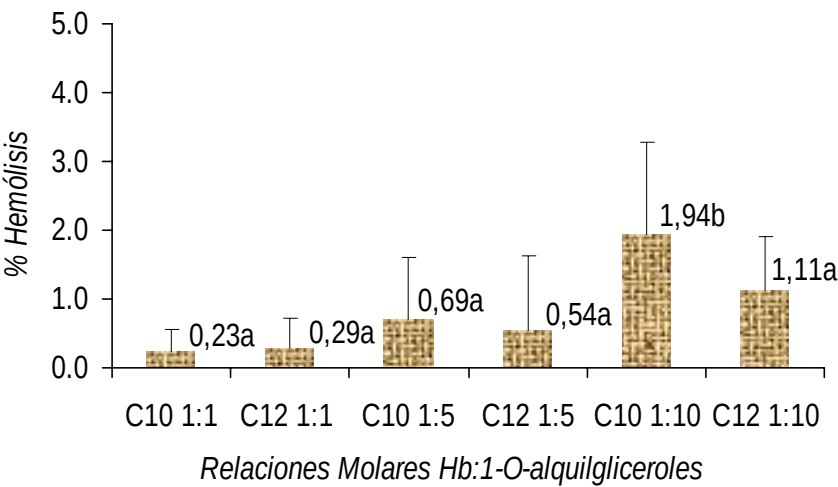


Figura 3. Efecto hemolítico de diferentes relaciones molares de C10 y C12 sobre eritrocitos SS. Porcentaje de hemólisis (%H) calculado a partir de la medición de la DO por espectrofotometría. El C10, a 1:10, incrementó ($p < 0,05$) moderadamente la hemólisis con relación a 1:1 y 1:5. Los datos representan la media $\pm$ D.E de $n=7$ pruebas por relación molar. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p \geq 0,05$).

Se comparó el efecto hemolítico provocado por cada uno de los compuestos sobre eritrocitos SS y de donantes voluntarios (Figura 4). En el caso de la vainillina¹⁹⁶ y el C10 se obtuvo un moderado incremento ($p < 0,05$) en la liberación de Hb a 1:10 para los eritrocitos SS. El %H total calculado para la vainillina, C10 y C12 sobre eritrocitos SS fue de $(0,64 \pm 0,7)$, $(0,95 \pm 0,6)$ y $(0,65 \pm 0,4)$ %, así como $(0,24 \pm 0,3)$, $(1,03 \pm 0,6)$ y $(0,65 \pm 0,7)$ % sobre los voluntarios, respectivamente.

Se considera que a relaciones molares $< 1:10$, estos compuestos manifiestan una actividad hemolítica baja sobre ambos grupos celulares, que pudiera además ser inherente a las células, al procedimiento de extracción de la sangre, a la preparación experimental, así como a las características de la enfermedad. A relaciones molares $\geq 1:10$ pudiera considerarse un incremento de la hemólisis sobre los eritrocitos SS, aunque por debajo del 10% aceptable según la metodología empleada (Stanley 1987).¹⁹⁵

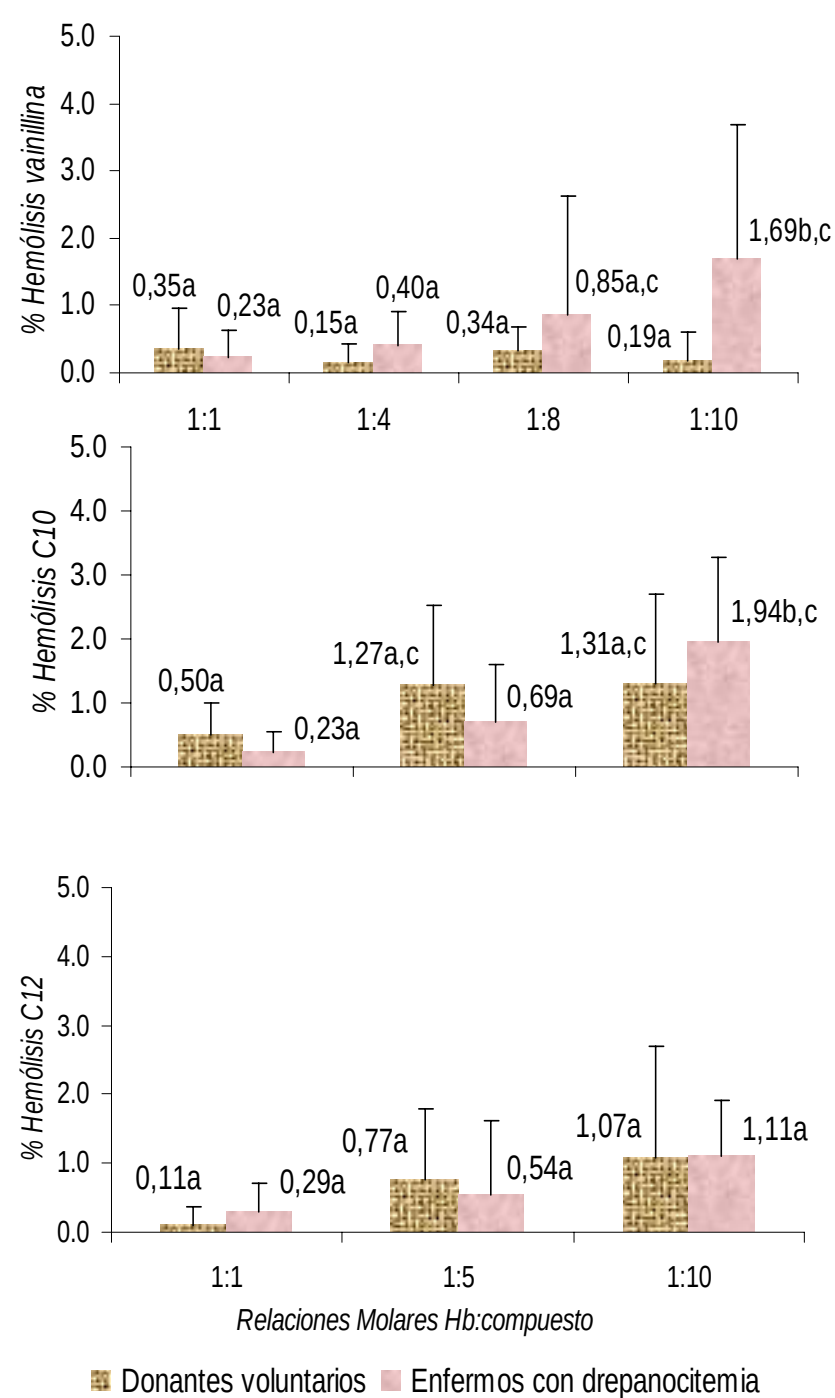


Figura 4. Porcentaje de hemólisis (%H) calculado para diferentes relaciones molares de la vainillina,¹⁹⁶ C10 y C12, sobre eritrocitos SS y de donantes voluntarios. Al comparar entre ambos grupos celulares se obtuvo que la vainillina y el C10, a 1:10, incrementaron moderadamente ($p<0,05$) la hemólisis de los eritrocitos SS. Se representa la media $\pm$ D.E de $n=9$ (vainillina) y $n=7$ (alkilgliceroles) pruebas por relación molar. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p\geq 0,05$).

Las variaciones observadas entre las pruebas en una misma relación molar pueden tener su causa en la no homogeneidad de los preparados utilizados. Cada uno de ellos se realizó a partir de sangre total procedente de individuos diferentes, sin considerar factores hematológicos ni fisiológicos individuales.²¹⁰

Cada individuo posee características reológicas propias. El tiempo de vida medio de los eritrocitos normales es de 120 días.^{43,210} En enfermos con drepanocitemia la polimerización intracelular de la dHbS daña la membrana y ocasiona la liberación de Hb con valores de hasta 40% de hemólisis.^{1,4,6,43} Los drepanocitos, debido a la polimerización, son más rígidos y frágiles que los normales, por estar sometidos a cambios intracorpóreos que causan pérdida de su elasticidad. La destrucción de éstos consiste en la lisis intravascular como consecuencia de una fragilidad mecánica aumentada, y la extracción por retención y fagocitosis en el sistema reticuloendotelial, con un tiempo de vida medio de aproximadamente 60 días.^{66,211} Los cambios morfológicos celulares, la resistencia a factores externos, así como la gravedad de expresión de las CVO recurrentes y la hemólisis crónica, varían entre individuos, y el número de células irreversiblemente falciformes circulantes determina el componente hemolítico.^{66,212}

Los resultados corroboran estudios previos realizados con 1-O-alkilglicerol naturales de origen marino, en los cuales se demostró que esta familia de compuestos provoca cambios morfológicos en los eritrocitos sin incrementar los eventos hemolíticos.³⁰ La vainillina, el 1-O-decilglicerol y el 1-O-dodecilglicerol tienen actividad hemolítica $\leq 2\%$, sobre los eritrocitos de donantes voluntarios y enfermos con drepanocitemia. Esto sugiere la ausencia de efectos citotóxicos sobre los eritrocitos, blanco de acción farmacológica de estos compuestos, y el posible beneficio del empleo de éstos en la clínica.

3.2 Efectos de la vainillina y los 1-O-alkilglicerol sobre la polimerización de la dHbS por relajación magnética protónica

Todos los patrones (HbS) procedentes de enfermos con drepanocitemia reprodujeron la curva sigmoide de variación temporal de T₂; lo que demostró la sensibilidad de la metodología establecida por Relajación Protónica (RM-¹H) para describir la cinética de la polimerización de la dHbS intracelular.³⁵ Los tiempos de relajación inicial (T_{2ini}) y final (T_{2fin}) fueron diferentes entre réplicas, para cada una de las mezclas de reacción de un mismo experimento. Mostraron para los preparados tratados valores superiores a los controles ($p < 0,05$).

Los valores del t_d , determinados a partir de la curvas de polimerización, fueron diferentes entre réplicas dentro de un mismo experimento y entre experimentos diferentes, para una misma relación molar. Durante el estudio los valores de t_d oscilaron en un intervalo de 207–418 min (controles), 280–370 min (1:1), 221–388 min (1:2), 297–401 min (1:4), 285–472 min (1:5), 357–495 min (1:6), 340–557 min (1:7), 347–584 min (1:8) y 269–422 min (1:10).

La vainillina incrementó el t_d de la nucleación para cada una de las relaciones molares estudiadas vs. los controles.^{39,40} La Figura 5 muestra los datos de cuatro de los experimentos realizados, donde se representa el t_d del patrón de HbS y los preparados tratados con vainillina a 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:10, 1:11, 1:13 y 1:15.^{39,40} En los preparados con vainillina a las relaciones molares 1:11, 1:13 y 1:15, se incrementó significativamente ($p < 0,05$) el t_d con relación al patrón. Se calculó el incremento del t_d (t_{dRM}/t_{dP}) en 1,55; 1,37 y 1,48; para 1:11, 1:13 y 1:15, respectivamente. Estos datos se compararon con los de las pruebas a las relaciones molares 1:8 y 1:10, y se encontraron diferencias no significativas ($p \geq 0,05$) entre ellos.⁴⁰

Por el contrario, los 1-O-alkilgliceroles sintéticos no incrementaron el t_d de la polimerización. En la mayoría de los experimentos el t_d , para los preparados tratados, se mantuvo al nivel de los patrones de HbS. En la Figura 6 se muestran los datos de uno de los experimentos en los que se evaluaron C10 y C12, a las relaciones molares 1:1 y 1:5. Sólo se determinó un incremento, no significativo ($p \geq 0,05$), del t_d correspondiente al preparado con C10 a la relación molar 1:1. Por otra parte, no se encontró relación entre el t_d y el aumento de la concentración de los compuestos. Se considera que los 1-O-alkilgliceroles C10 y C12, pudieran inhibir la falciformación de los eritrocitos SS por un mecanismo no relacionado con la polimerización de la HbS.

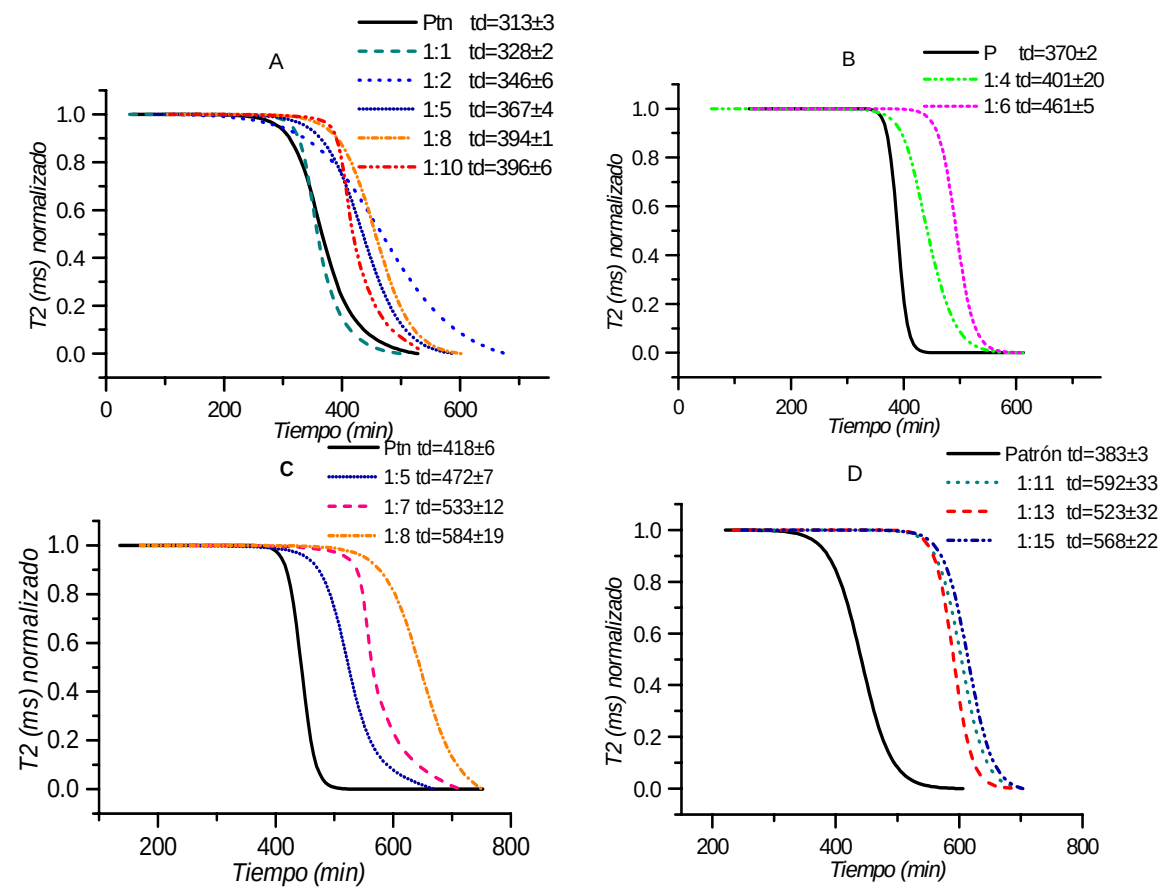


Figura 5. Curvas de la polimerización de la dHbS. Patrón (Ptn) y preparados tratados con vainillina a las relaciones molares 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:10, 1:11, 1:13 y 1:15 correspondientes a cuatro experimentos (A, B, C, D). Valores de T2 normalizados a partir de los promedios de cada una de las curvas, obtenidas de la variación temporal de T2 en el Relaxómetro Giromag®01. Valor medio del td (min) $\pm$ D.E. de tres réplicas por patrón y por relación molar.^{39,40}

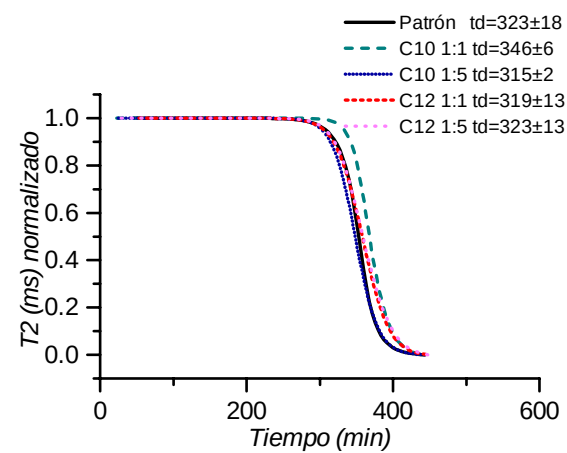


Figura 6. Cinética de polimerización de la dHbS. Patrones HbS (Ptn) y preparados tratados con C10 y C12 a relaciones molares 1:1 y 1:5, correspondientes a un experimento. Valores de T2 normalizados a partir de los promedios de cada una de las curvas, obtenidas de la variación temporal de T2 en el Relaxómetro Giromag®01. Valor medio del td (min) $\pm$ D.E. de tres réplicas por patrón y por relación molar.

A partir de los valores de td se calculó el porcentaje de variación del td (%Vtd) (2) para cada uno de los preparados tratados con vainillina con relación al patrón, y se calculó el valor promedio por relación molar entre todas las pruebas realizadas (Tabla 2).

Tabla 2. Variación del tiempo de demora (%Vtd) de la polimerización de la dHbS por los efectos inhibitorios de la vainillina a las relaciones molares de trabajo.*

	1:1	1:2	1:4	1:5	1:6	1:7	1:8	1:10
%Vtd	4±1,1	8,35±2,3	17,2±8,0	20,30±11,1	25±16,5	23±9,5	34±20	25±5,4

* Cada valor como la media ± D.E. para n=20.

El %Vtd mostró que relaciones molares > 1:4 no influyen significativamente ($p \geq 0,05$) en el alargamiento del td. Analizando individualmente cada preparado, se obtuvo un incremento del td hasta 1:6, con una disminución a 1:7 y nuevamente aumenta para 1:8. Al comparar los datos para 1:7, 1:8, 1:10, 1:11, 1:13 y 1:15, no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en cuanto al alargamiento del td.⁴⁰

El aumento de los valores del T2 y el alargamiento del td de la polimerización es una consecuencia de la movilidad de las moléculas de agua por inhibición del polímero.^{35,198,199} Al aumentar la concentración es probable que se establezca un equilibrio entre las moléculas de vainillina en solución y las enlazadas a la Hb.^{40,199} Esto podría explicar el efecto retardador del td sin diferencias significativas ($p \geq 0,05$) a mayores concentraciones, lo que sugiere una saturación de los sitios de enlace entre Hb y vainillina.

La inhibición de los sitios de contacto intermoleculares por el enlace covalente entre la vainillina y la Hb enlentece la polimerización, por lo cual las moléculas de HbS permanecerán mayor tiempo en estado soluble y la afinidad de la Hb por el oxígeno será mayor.^{23,103} Las variaciones del T2 (inicial y final) y del td entre las réplicas de una misma prueba por relación molar, así como entre experimentos, pudieran estar relacionadas con las diferencias interindividuales de los enfermos con drepanocitemia,⁹⁷ así como con el procedimiento técnico empleado para las determinaciones.^{35,40,199}

La vainillina se enlaza covalentemente a los grupos amino terminales (NH_2) de la Hb para formar una base de schiff.^{22,37-40} La influencia de los sustituyentes del anillo en la reactividad se manifiesta de acuerdo a conceptos tradicionales según los efectos estéricos y electrónicos. Los grupos enlazados al formilo no impiden estéricamente el acceso hacia el carbono del carbonilo (CO). El núcleo aromático posee propiedades electrodonoras que hacen al carbono del CO menos deficiente electrónicamente.¹⁶ En posición *meta* se encuentra el grupo metoxi (OCH_3) con efectos inductivo negativo (-I) y mesomérico positivo (+M), mientras que, en *para* está el hidroxilo (OH) con -I y +M predominante. Por tanto, los pares electrónicos del oxígeno se conjugan con el sistema aromático y aumentan la densidad electrónica. Estos efectos hacen que el carbono del CO tenga la reactividad disminuida para la adición nucleofílica y la estabilidad del producto intermediario sea menor.¹⁶ Debido a la combinación de estos efectos, electrónicos y estéricos, la actividad de la vainillina se considera *moderada*.^{22,40}

A partir de estos resultados se considera oportuno utilizar concentraciones $\leq 1:4$ en posteriores estudios para evaluar su actividad farmacológica en la clínica de la drepanocitemia.

Se corroboró el valor potencial de la técnica de RMN como metodología para determinar la actividad antipolimerizante, mediante un experimento con la sangre correspondiente a donantes voluntarios (solución de HbA) (Figura 7).

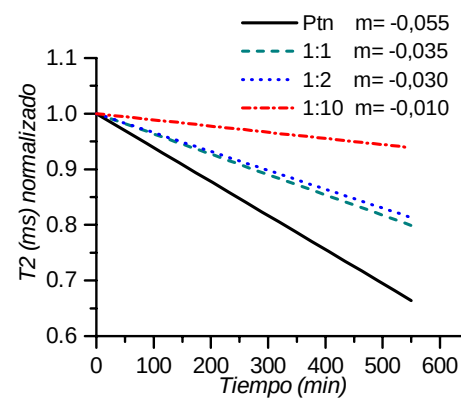


Figura 7. Curvas promediadas y normalizadas a partir de la variación temporal del T2 medida en el Relaxómetro Giromag®01, para la solución de HbA tratada con vainillina a las relaciones molares 1:1, 1:2 y 1:10 correspondientes a un experimento. Se muestran los valores de la pendiente (m).

Se demostró, en las condiciones experimentales establecidas, que la HbA no polimeriza, por lo que no se obtiene una curva sigmoideal como la que caracteriza a la HbS (Figura 7).¹¹² La vainillina también reacciona con la HbA para formar la base de schiff,^{22,38} razón por la cual la movilidad de las moléculas de agua varía en menor proporción con el incremento de la concentración de ésta.

3.3 Modificación del patrón electroforético de la Hb por la vainillina mediante focalización isoelectrica en gel de poliacrilamida

Los marcadores de pl se aplicaron en todas las corridas electroforéticas y se confeccionaron curvas de calibración (pH/distancia de migración (cm)) para cada una con el objetivo de garantizar la confiabilidad de los resultados y determinar la reproducibilidad del gel de poliacrilamida. El análisis de la pendiente (valor medio: $0,39 \pm 0,05$) de cada recta mostró un 8% de error.³⁸ En cada uno de los geles se midió la distancia de migración (cm) de las bandas focalizadas del proteinograma para cada aplicación. Se calculó el pl a partir de la ecuación correspondiente a la curva de calibración de los marcadores y se promediaron los valores finales para establecer la diferencia entre los controles y tratadas.

A partir de la ecuación de la recta se calculó el pl experimental de los marcadores, obteniendo en el caso de la anhidrasa carbónica I de eritrocitos humanos ($6,57 \pm 0,01$) y para la mioglobina de corazón de caballo I ($6,84 \pm 0,02$) y II ($7,17 \pm 0,03$), respectivamente. Valores aproximados a los teóricos informados para ambos marcadores (6,6; 6,8 y 7,2). Se obtuvo una reproducibilidad del gel de poliacrilamida con un 5 % de variación. Evaluando la distancia de migración de las muestras de sangre y los marcadores se obtuvieron valores entre 4 y 5 % de variación, aceptables pues se enmarcan dentro del intervalo de error del método y la reproducibilidad del gel.^{38,200}

En los preparados tratados con vainillina se obtuvo una banda tenue en posición anodal a la banda de la Hb que se corresponde con el complejo Hb-vainillina descrito por Zauug (1977).^{22,38} Las bandas focalizadas para uno de los preparados se muestran en la Figura 8. El valor del pl para la HbA fue 7,121 (C, 1) y el del complejo 7,069 (M, 2).³⁸

Se ha informado para el complejo entre la HbA y el 4-cianobenzaldehído,²² aldehído aromático con fuerte actividad antipolimerizante, un valor de $pI = 6,90$, con una variación del 2,4 % al comparar con el 7,069 determinado para la vainillina estudiada.³⁸ Para el complejo con HbS no ha sido informado un valor de pI por lo cual no fue posible realizar un análisis comparativo. En la Tabla 3 se muestran los valores medios de pI de los preparados con HbA y HbS calculados.

Tabla 3. Valores de pI de las bandas correspondientes a los controles y preparados, con Hb humana normal (HbA) y HbS, tratados con vainillina a la relación molar 1:20, obtenidos por focalización isoelectrica en gel de poliacrilamida T=7,5 %, C=3 % (125 mm x 260 mm x 0,5 mm) (Pha-LKB).^{*38}

Muestra	pI	Muestra	pI
Control HbA	$7,121 \pm 0,034$ (0,47 %)	Control HbS	$7,39 \pm 0,06$ (0,86 %)
HbA no modificada	$7,099 \pm 0,026$ (0,36 %)	HbS no modificada	$7,38 \pm 0,08$ (1,15 %)
HbA:vainillina	$7,069 \pm 0,027$ (0,38 %)	HbS:vainillina	$7,33 \pm 0,06$ (0,9 %)

** pI calculado a partir de las ecuaciones de regresión lineal de cada experimento, como la media $\pm$ D.E. (% error) para $n=11$ (HbA) y $n=13$ (HbS).*

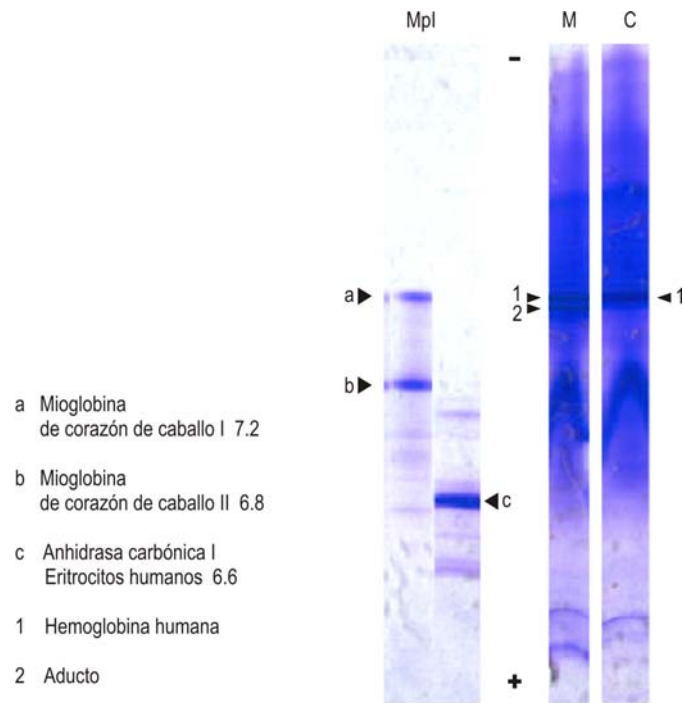


Figura 8. Proteinograma correspondiente a la Hb (1) y al complejo Hb:vainillina (2) en la mezcla (M) tratada con vainillina a la relación molar 1:20. (C) Control HbA. $pI_{Hb:vainillina} = 7,069$ determinado a partir de valores experimentales de los marcadores (Mpl): anhidrasa carbónica I de eritrocitos humanos (6,57) y mioglobina de corazón de caballo I (7,17) y II (6,84), $C=1$ mg/mL. Gel de poliacrilamida T=7,5 %, C=3 % (125 mm x 260 mm x 0,5 mm).³⁸

3.4 Interacción entre la vainillina y la Hb por cromatografía líquida (HPLC)

Se realizaron las reacciones de la Hb con la vainillina y se obtuvieron en todos los cromatogramas los picos correspondientes a la Hb y al complejo Hb:vainillina.^{201,202} No se detectaron picos de interferencia en la vainillina, en la fase móvil o las mezclas de reacción. Los picos gaussianos son poco frecuentes en cromatografía por lo que se analizó la simetría (As), magnitud que determina la tolerancia de los errores, de los picos de la Hb y del complejo.^{38,202} Ésta, al igual que la resolución de los picos en los cromatogramas, fue analizada con el software *NELSON*. Se obtuvo un valor medio de resolución igual a 1,059 con un coeficiente de variación de 2,74 %. A un 5 % de la altura del pico, el complejo mostró una As anterior igual a 1,29; mientras el de la Hb fue As = 1,12, valores más pequeños que el valor máximo de asimetría informado en la literatura (As= 2,00).^{38,202}

En la Tabla 4 se muestran los datos del área de los picos de la HbS y del complejo Hb:vainillina, correspondientes a los preparados tratados con vainillina a las relaciones molares 1:20 (A) y 1:10 (B), obtenidos en uno de los experimentos por HPLC-IC.³⁸ En la mezcla de reacción a la relación molar 1:20 se obtuvo a los 90 min de incubación el mayor pico del complejo. Éste representó el 67,34 % con respecto al de la Hb y disminuyó en el tiempo hasta la total desaparición 8 h después de la incubación. Se comprobó que con el tiempo el área del pico del complejo disminuye; mientras que el de la Hb aumenta, en un 5 y un 10% con respecto al anterior. Los tiempos de retención (TR) del complejo y la Hb fueron de (18,17±0,015) min y (18,78±0,023) min, respectivamente. Con un error relativo de 0,0013 % (cv=0,00023) y 0,003 % (cv=0,0053).³⁸

El área del pico del complejo Hb:vainillina se incrementó con la concentración de la vainillina. En la relación molar 1:10 el pico de mayor área se obtuvo a los 30 min de incubación, aunque comparado con el pico mayor a 1:20, fue mucho menor (Tabla 4 B). Los TR del complejo y la Hb fueron de (18,6±0,03) min y (19,08±0,02) min, respectivamente, con un error relativo de 0,004 % (cv=0,00075) y 0,004 % (cv=0,00083). En cuanto al porcentaje que representó el área de los picos del complejo con respecto a los de la Hb el mayor fue de 15,1% y disminuyó hasta 4,06 % a las 6:30 h después de la incubación.³⁸

De forma general se obtuvo que el complejo Hb:vainillina, con relación al área del pico mayor, decae hacia las 4 h entre un 54 % y un 53 % para las relaciones molares 1:20 y 1:10, respectivamente. Esto indica la estabilidad *in vitro* del complejo Hb:vainillina, con un tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) de 4 h, independientemente de la concentración de la vainillina en la mezcla de reacción.³⁸

Tabla 4. Datos de los cromatogramas obtenidos por HPLC-IC de las mezclas de reacción entre la vainillina y la HbS, a las relaciones molares 1:20 (A) y 1:10 (B), correspondientes a un experimento. Se muestran, para los diferentes tiempos de incubación, el área de los picos de la HbS y del complejo Hb:vainillina; el porcentaje (%) que representa el área del pico del complejo con relación a la Hb; así como los tiempos de retención (TR) para el complejo y la Hb.

A					
Incubación (h:min)	área complejo	área Hb	% área complejo	TR complejo (min)	TR Hb (min)
1:30	720 231	1 069 480	67,34	18,17	18,78
2:00	565 980	1 183 790	47,81	18,19	18,81
2:30	487 586	1 247 018	39,10	18,16	18,80
3:00	441 759	1 384 747	31,90	18,16	18,78
4:00	391 157	1 498 972	26,09	18,16	18,78
7:30	113 915	2 691 125	4,23	18,15	18,75
TR medio±D.E.				18,17±0,014	18,78±0,021
B					
0:30	324 226	2 146 894	15,10	18,14	19,08
1:00	270 217	2 265 442	11,92	18,13	19,06
1:30	268 287	2 395 373	11,20	18,14	19,06
2:00	220 611	2 431 648	9,07	18,15	19,08
3:30	193 756	2 703 257	7,16	18,19	19,10
4:00	172 612	2 772 548	6,22	18,19	19,11
6:30	159 218	3 913 022	4,06	18,19	19,07
TR medio±D.E.				18,16±0,03	19,08±0,02

En el experimento realizado con la sangre procedente de donantes voluntarios (HbA) tratada con vainillina a la relación molar 1:20 también se obtuvo el pico correspondiente al complejo y a la Hb, como se muestra en la Figura 9. EL TR de la Hb fue de 20 min y para el complejo de 18 min.³⁸

Los complejos de la vainillina con la HbA y la HbS tienen TR más cortos que la Hb control, lo cual en una columna de IC indica que el complejo tiene menor carga positiva que la proteína nativa.³⁸ La reacción con la HbA y la HbS *in vitro*, en sangre total, demostró que la vainillina puede transitar entre las proteínas plasmáticas, entrar a los eritrocitos y reaccionar covalentemente con la Hb como fue mostrado por EIE.³⁸

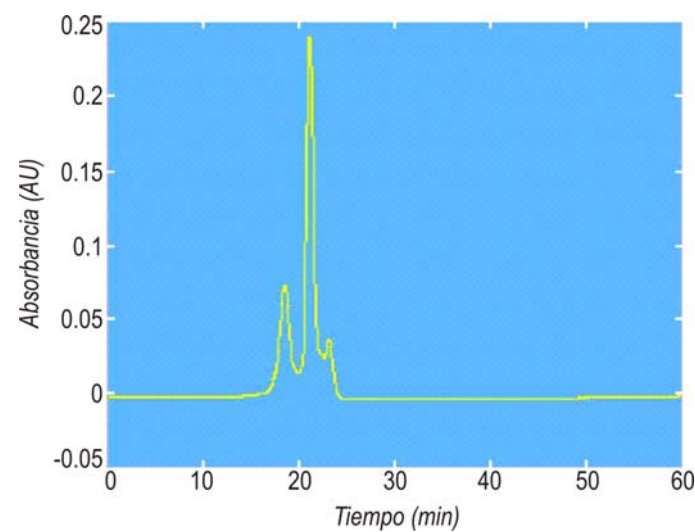


Figura 9. Cromatograma típico de la reacción entre la vainillina y la HbA obtenido por HPLC-IC a $\lambda=545$ nm, con fase móvil: 0-100 % B (A + CH_3COONa 0,15 M; pH 6,40) 10 min; 100 % B 8 min; 100 – 0 % B 2 min; $v_f = 1$ mL/min. A (BIS-TRIS 0,05 M; KCN 0,0015 M; pH 6,4). El pico pequeño corresponde al complejo HbA-vainillina y el mayor a la Hb. TR complejo =18 min, TR Hb=20 min.³⁸

En la evaluación general del estudio se obtuvo que, la resolución fue mayor que 1,5 y la variación de los TR fue menor del 2 % ($\alpha=0,05$). Las diferencias encontradas entre los cromatogramas para cada uno de los tiempos de inyección fueron no significativas ($p \geq 0,05$). Los valores de área normalizados mostraron que, en promedio, el área del complejo Hb:vainillina decae hacia un 50 % del mayor valor a las 4 h, su $t_{1/2}$.³⁸ Este resultado *in vitro* sugiere que *in vivo*, podría ocurrir más rápido, en parte debido a la oxidación de la vainillina y su excreción como ácido vanílico.²³

A partir de estos resultados se concluye que la vainillina reacciona tanto con la HbA como con la HbS para formar un complejo Hb-vainillina estable, con un $t_{1/2}$ de cuatro horas. Este hallazgo demuestra la actividad de la vainillina como agente antidrepanocítico.^{22,23,38}

3.5 Efectos de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos sobre los eritrocitos SS

Mediante el conteo del número de eritrocitos deformes bajo condiciones anoxigénicas, las cuales favorecieron la polimerización de la HbS y la falciformación de los eritrocitos, se observó una inhibición de la drepanocitosis para los tres compuestos a las relaciones molares estudiadas.

3.5.1 Efectos de la vainillina sobre los eritrocitos SS

En la Tabla 5 se muestran los datos del conteo eritrocitario en los controles positivos (eritrocitos SS sin vainillina) y en los preparados con vainillina durante la observación al microscopio óptico luego de 6 h (t_{6h}), 12 h (t_{12h}) y 24 h (t_{24h}). Los controles positivos al inicio del experimento (t_0 , datos no presentados en la tabla) mostraron eritrocitos aparentemente normales y un 5 % de drepanocitos. A las 6 h y 12 h se observó, con relación al t_0 , un incremento significativo ($p < 0,05$) de los drepanocitos, para un 13 % y 14 % respectivamente; mientras que a las 24 h se observó un 20 % ($p < 0,05$). Entre el control positivo y el negativo (eritrocitos SS con solución vehículo) no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) para todos los tiempos, por lo cual no se presentaron los datos.

En los preparados tratados con vainillina, para cada relación molar, no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre cada uno de los tiempos de incubación. Al comparar éstos con los controles positivos se observó un menor número de drepanocitos en los preparados ($p < 0,05$), con una tendencia a la recuperación de la forma bicóncava discoidal. Este comportamiento fue similar para las tres relaciones molares en todos los tiempos. En la Figura 10 se muestran las microfotografías tomadas a uno de los preparados utilizados como control positivo durante la observación inicial t_0 (A) y final t_{24h} (B), y a un preparado con vainillina, a 1:10, en el transcurso de las 6 h (C) y las 24 h de incubación (D).

Los resultados corroboran los informes bibliográficos sobre la dependencia de la deformación de los eritrocitos con la polimerización de la dHbS.^{102,109} Al establecer condiciones anoxigénicas se induce la polimerización de la dHbS y como consecuencia la falciformación de los eritrocitos, por lo cual en los controles positivos se encontró un mayor número de alteraciones morfológicas en el transcurso del tiempo.¹⁰⁹

Tabla 5. Conteo eritrocitario en los controles positivos (solución de eritrocitos SS diluidos con PBS pH 7,4) y los preparados tratados con vainillina, a las relaciones molares 1:1, 1:2 y 1:10, durante la observación al microscopio óptico MHN 8 (20 x 0,65) a las 6h, 12 h y 24 h de incubación.*

Preparados	Número de eritrocitos deformes valor medio (mínimo - máximo) n = 16		
	t _{6h}	t _{12h}	t _{24h}
Control positivo	25 (22 – 28) ^a	29 (27 – 32) ^b	40 (33 – 44) ^c
1:1	5 (3 – 7) ^d	6 (3 – 9) ^d	8 (5 – 12) ^d
1:2	4 (3 – 7) ^d	5 (3 – 6) ^d	7 (5 – 10) ^d
1:10	4 (3 – 6) ^d	5 (4 – 6) ^d	7 (3 – 11) ^d

*Se representa el intervalo y el valor medio (n = 16) del número de eritrocitos falciformes para cada tiempo de reacción. Letras iguales indican diferencias no significativas (p≥0,05).

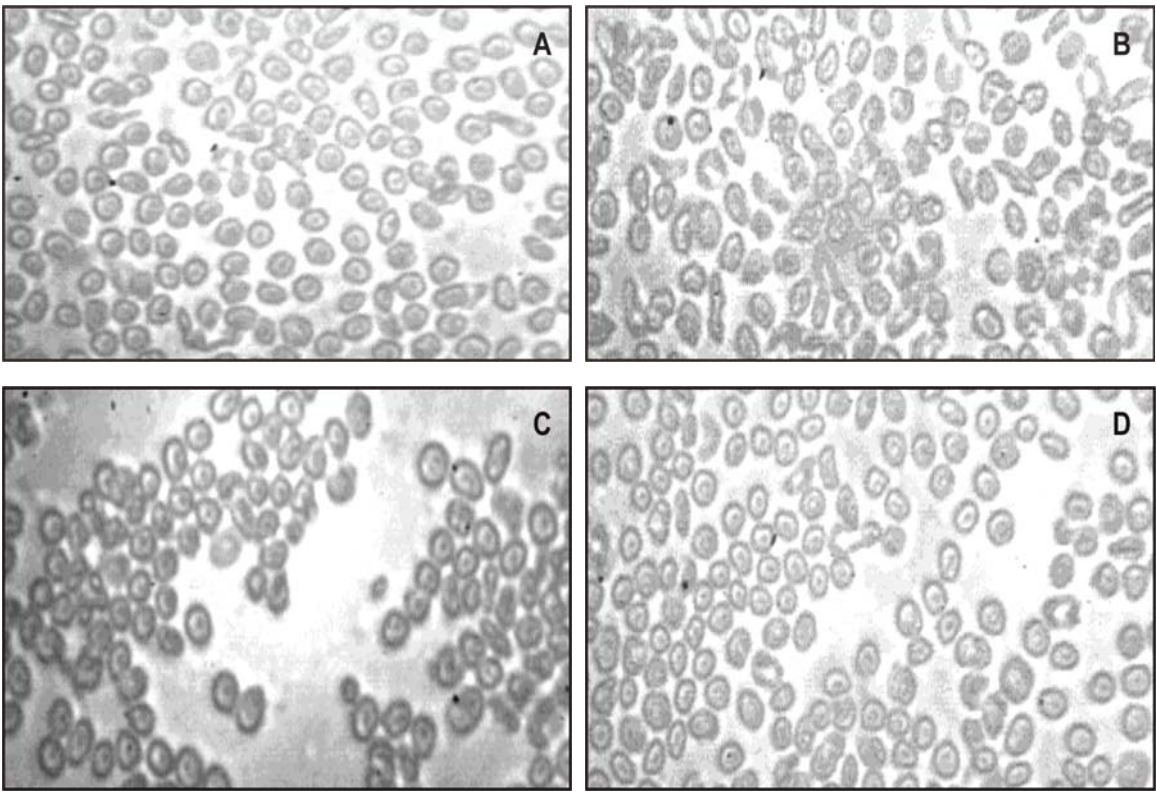


Figura 10. Microfotografías tomadas a un control positivo (eritrocitos SS) y a un preparado tratado con vainillina a la relación molar 1:10, durante la observación al microscopio óptico MHN 8 (20x0,65) luego de la incubación. A = control positivo (t₀), B = control positivo (t_{24h}), C = tratado (t_{6h}), D = tratado (t_{24h}). Se observa en el control positivo, a las 24 h, un mayor número de eritrocitos deformes con mayor daño celular y en los tratados con vainillina (C, D) una recuperación de la forma discoidal de éstos.

La presencia de algunos eritrocitos deformes en los preparados tratados con vainillina se debe a células irreversiblemente deformes que no fueron capaces de recuperarse del daño estructural.^{134,213}

En condiciones anoxigénicas la vainillina induce cambios en la reología celular que restablecen la forma discoidal de los eritrocitos, lo cual está relacionado con su mecanismo de acción antipolimerizante.^{23,109} El complejo Hb:vainillina es una variante hemoglobínica de alta afinidad por el O₂ y la polimerización-falciformación ocurre en menor grado aún a bajas concentraciones de éste.^{22,40} Por otra parte, reduce la pérdida de K⁺ y H₂O, por lo que disminuye la contracción celular.⁸² Como consecuencia disminuiría la probabilidad de falciformación intracapilar y la adhesión endotelial, con una disminución de los eventos VO.⁶⁹⁻⁷¹

3.5.2 Efectos de los 1-O-alkilglicerol sintéticos sobre los eritrocitos SS

Los 1-O-alkilglicerol ocasionaron variaciones morfológicas a los dos intervalos de tiempo evaluados como consecuencia de una inhibición de la drepanocitosis para ambos compuestos a las relaciones molares estudiadas. En todos los controles (Figura 11) se observó un elevado número de drepanocitos con un aumento significativo ($p < 0,05$) a las 48 h (38 %) con relación al 18 % encontrado a las 24 h.

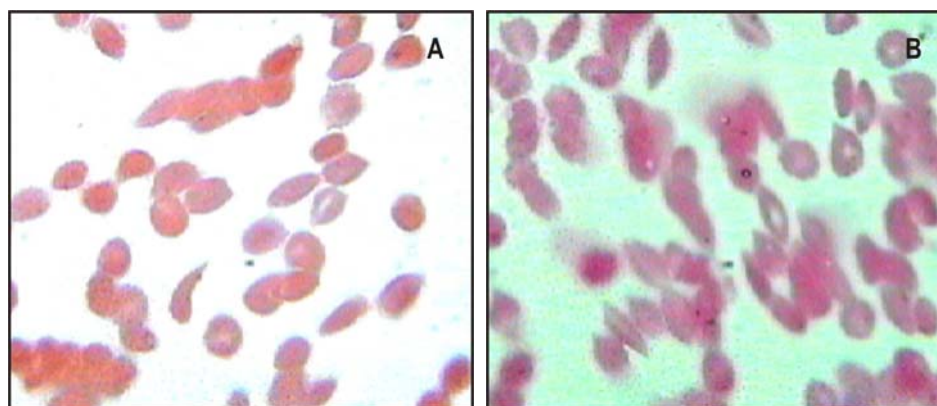


Figura 11. Microfotografías tomadas a un control positivo (eritrocitos SS+ bisulfito de Na) a las 24 y 48 h en el microscopio óptico Laborlux S, amplificación 40x. A: t_{24h}, B: t_{48h}. Se observan drepanocitos en ambas imágenes, con un mayor número a las 48 h.

En la Tabla 6 se muestra el conteo eritrocitario realizado a los controles positivos y preparados tratados con los compuestos a los intervalos 24 (t_{24h}) y 48 h (t_{48h}). Al comparar el control positivo a las 24 h con el C10 y C12 a las dos relaciones molares estudiadas se encontraron diferencias significativas entre éstos ($p < 0,05$). Un comportamiento similar se observó a las 48 h de incubación.

Se encontró además, una tendencia al aumento de la drepanocitosis para el control positivo a las 24 y a las 48 h. Sin embargo, los 1-O-alkilgliceroles mostraron la misma tendencia a la inhibición de la drepanocitosis a los tiempos estudiados, independientemente de las concentraciones empleadas ($p \geq 0,05$).

Tabla 6. Conteo eritrocitario en los controles positivos (eritrocitos SS + bisulfito de Na) y los preparados tratados con C10 y C12, a las relaciones molares 1:1 y 1:5, durante la observación al microscopio óptico LaborLux S, Leitz, 40X, a las 24 h y las 48 h de incubación.*

Preparados	Número de eritrocitos deformes valor medio (mínimo - máximo) n = 16	
	t _{24h}	t _{48h}
Control positivo	35 (15 - 48) ^a	76 (62 - 82) ^d
C10 1:1	7 (1 - 10) ^c	5 (0 - 10) ^c
C10 1:5	7 (2 - 9) ^c	4 (0 - 15) ^c
C12 1:1	8 (1 - 15) ^c	5 (0 - 7) ^c
C12 1:5	5 (2 - 59) ^c	2 (0 - 5) ^c

*Se representa el intervalo y el valor medio (n = 16) del número de eritrocitos falciformes para cada tiempo de reacción. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p \geq 0,05$).

Por el contrario, si comparamos los controles con los preparados tratados con C10 a las relaciones molares 1:1 y 1:5, observados a las 24 h y 48 h, se evidencia una disminución significativa ($p < 0,05$) del número de drepanocitos y la aparición de equinocitos (Figura 12). En esta figura se muestran dos de los preparados tratados con C10 a las relaciones molares de trabajo. Como se observa, a las 48 h de incubación (B, D), casi todos los eritrocitos se transformaron en equinocitos, aunque también se aprecian algunos con forma bicóncava discoidal. Este resultado pudiera estar relacionado con un efecto modulador de los 1-O-alkilgliceroles sobre la membrana eritrocitaria.²⁸⁻³⁰ A la relación molar 1:5 el C10 mostró el mismo comportamiento.

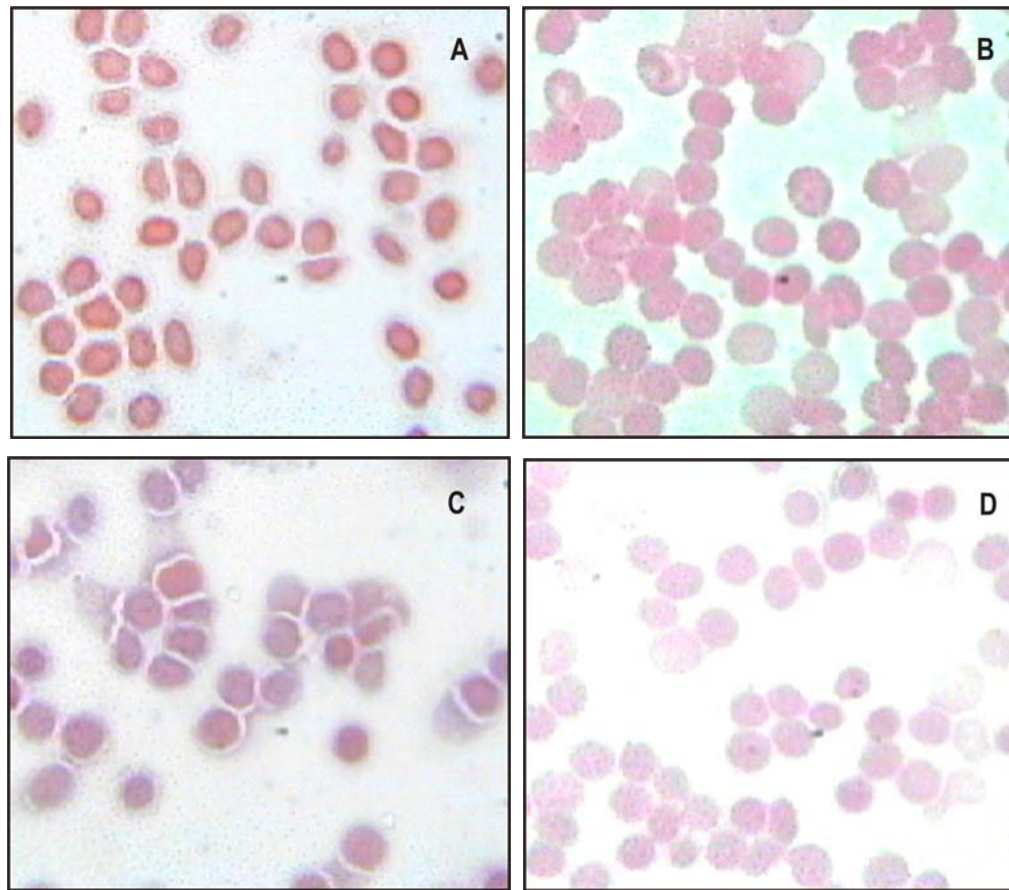


Figura 12. Microfotografías tomadas a un preparado con C10 a las relaciones molares 1:1 y 1:5, a las 24 h y 48 h, en el microscopio óptico Laborlux S, amplificación 40x. A: 1:1 (t_{24h}), B: 1:1 (t_{48h}), C: 1:5 (t_{24h}), D: 1:5 (t_{48h}). Se observan equinocitos y algunos eritrocitos discoidales, en todas las imágenes, con un mayor número de los primeros a las 48 h para ambas relaciones molares.

El C12 (1:1 y 1:5) mostró similar efecto al observado para C10 (Figura 13). Se corroboraron los resultados con los 1-O-alkilgliceroles de gorgonáceas y del aceite de hígado de tiburón, así como con los sintéticos C16 y C18; en los cuales se demostró que estos compuestos inhiben o retardan la transformación drepanocitaria de los eritrocitos de enfermos con diferentes hemoglobinopatías sin incrementar la hemólisis.³⁰

La deformación eritrocitaria, asociada al incremento del recambio lipídico y a las variaciones de la fluidez de la membrana celular, puede ocurrir por la acción de agentes endógenos o exógenos.²¹¹ Las variaciones equinogénicas son reversibles, más flexibles que los drepanocitos y pueden conducir a una hemólisis tardía en dependencia del tiempo de exposición y concentración al agente equinogénico. Este proceso, por lo general, se revierte siempre que se elimine el factor desencadenante.^{211,212}

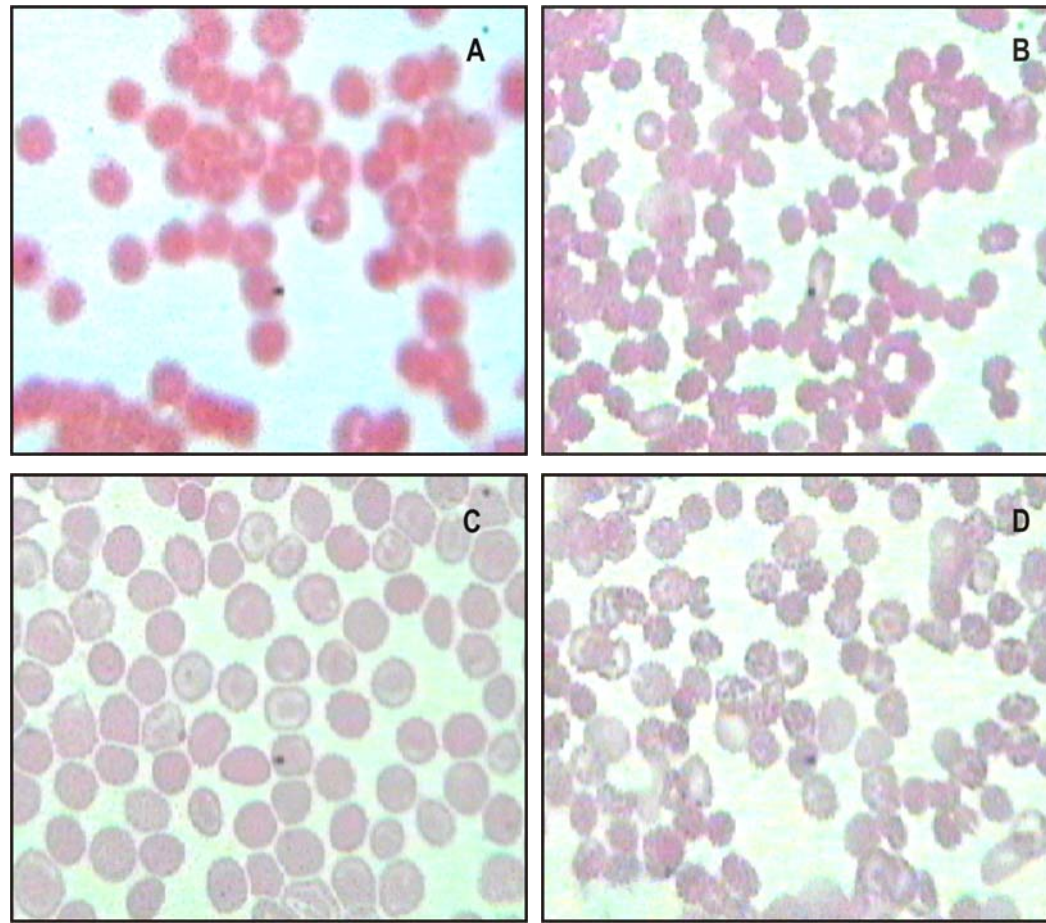


Figura 13. Microfotografías tomadas a un preparado con C12 a las relaciones molares 1:1 y 1:5, a las 24 y a las 48 horas, en el microscopio óptico Laborlux S, amplificación 40x. A: 1:1 (t_{24h}), B: 1:1 (t_{48h}), C: 1:5 (t_{24h}), D: 1:5 (t_{48h}). Se observan los equinocitos en todas las imágenes, aunque con una mayor definición estructural a las 48 h para ambas relaciones molares.

Considerando que los 1-O-alkilgliceroles poseen la estructura básica de los éteres de glicerofosfolípidos y los lisofosfolípidos, como la 2-lisofosfatidilcolina, cuyos efectos equinogénicos han sido demostrados,³⁰ se pudieran interpretar los cambios morfológicos producidos por el C10 y el C12 sintéticos, como resultado de la alteración del estado micelar crítico de la estructura supramolecular de la membrana celular, probablemente asociados a las propiedades surfactantes que se atribuyen a estos compuestos.²⁸⁻³²

El comportamiento de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos sobre los eritrocitos SS constituye un hallazgo sobre los beneficios que pudieran aportar en el tratamiento de las anemias hemolíticas.

3.6 Efectos de la vainillina sobre los eritrocitos SS por microscopía electrónica de transmisión (MET)

En todos los preparados procedentes de donantes voluntarios con HbA se observaron eritrocitos en la forma bicóncava discoidal que los caracteriza, con una estructura interior homogénea compuesta en su mayoría por los tetrámeros de Hb en solución (Figura 14).²⁰³ Mientras que en las microfotografías realizadas a los controles procedentes de enfermos con drepanocitemia (HbS) (Figura 15), se observaron eritrocitos morfológicamente diferentes a los normales, completamente falciformes y con 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, y predominaba una orientación en forma de dominios hacia los extremos de la célula.^{101,108,203} Según ha sido descrito en la literatura estas fibras constituyen una organización compleja de los polímeros de dHbS, diferenciándose de la estructura homogénea presente en los eritrocitos normales.^{43,102,103}

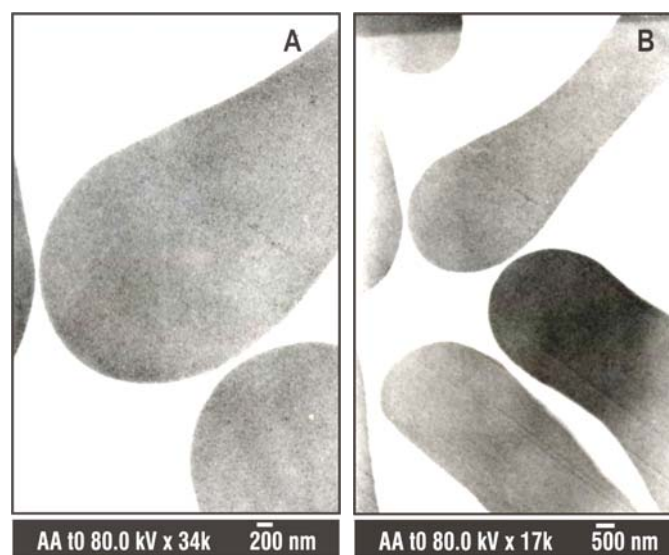


Figura 14. Microfotografías electrónicas realizadas a un preparado con eritrocitos procedentes de donantes voluntarios (HbA) en el tiempo inicial (t_0), en el Microscopio Electrónico Jeem 2000 EX Jeol, voltaje de aceleración 80.0 kV. A: t_0 , x34k, 200 nm. B: t_0 , x17k, 500nm. Se observa la forma discoidal con una estructura interior homogénea compuesta por los tetrámeros de Hb en solución.²⁰³

En los preparados tratados con vainillina (Figura 16) no se observaron, en un número elevado de los eritrocitos, las fibras de los polímeros de dHbS, y sí una tendencia al incremento del número de eritrocitos en estado bicóncavo discoidal.^{125,203}

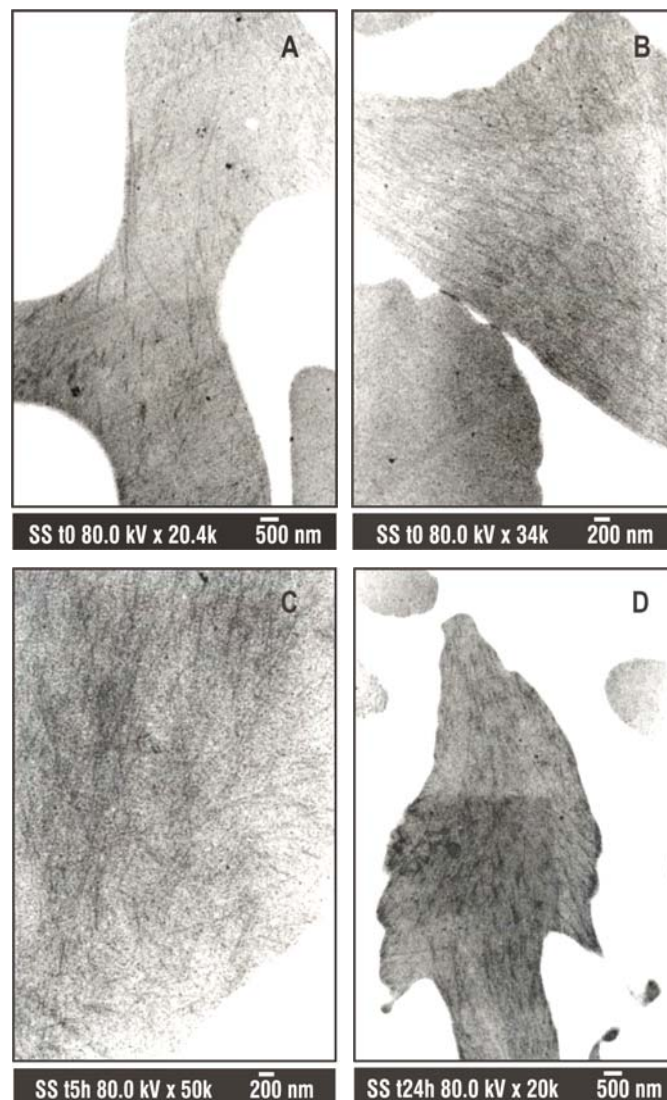


Figura 15. Microfotografías electrónicas realizadas a los controles positivos (eritrocitos procedentes de enfermos con drepanocitemia), en el tiempo inicial (t_0), 5 h (t_{5h}) y 24 h (t_{24h}), en el Microscopio Electrónico Jeem 2000 EX Jeol, voltaje de aceleración 80,0 kV. A: t_0 , x20,4k; 500nm. B: t_0 , x34k; 200nm. C: t_{5h} , x50k; 200nm. D: t_{24h} , x20k; 500nm. Se observan eritrocitos con formas no comunes que contienen estructuras largas en forma de "pelos" o fibras, distribuidas irregularmente en dominios.²⁰³

Al observar detenidamente las células tratadas con vainillina, se pudo apreciar que no había fibras en zonas específicas, y se encontró en ellas sólo pequeños fragmentos que indicaban la interrupción del crecimiento y la alineación de los polímeros de dHbS.^{103,203} La comparación de las microfotografías electrónicas de los eritrocitos tratados y los controles permitió demostrar, cualitativamente, que ocurre reacción y que al final de cada tiempo de incubación (t_{5h} y t_{24h}) se forma un complejo Hb:vainillina estable, el cual pudiera incidir directa o indirectamente en la inhibición de otros sitios de contacto intermoleculares como ha sido informado en la literatura.^{23,106,125,203}

De esta forma contribuye a la desestabilización de los polímeros e impide su crecimiento y alineación; es decir, interrumpe la distribución de las fibras en forma de dominios hacia los extremos de los eritrocitos, lo cual contribuye a la disminución de los daños a la membrana celular.^{101-103,108,109}

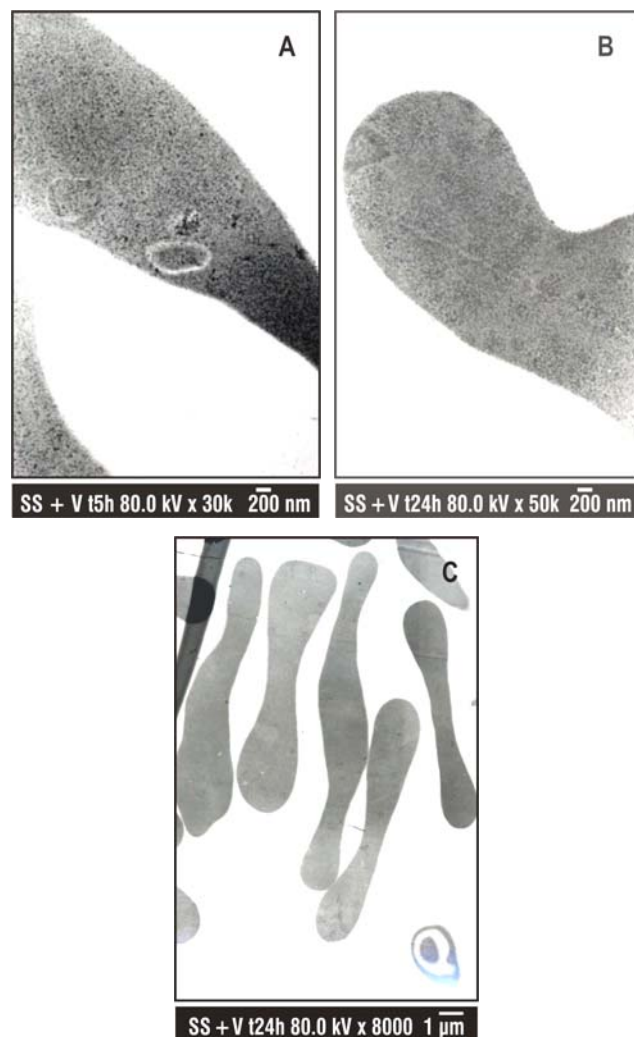


Figura 16. Microfotografías electrónicas realizadas a los eritrocitos procedentes de enfermos con drepanocitemia tratados con vainillina a la relación molar 1:4, durante 5 h (t_{5h}) y 24 h (t_{24h}), en el Microscopio Electrónico Jeem 2000 EX Jeol, voltaje de aceleración 80.0 kV. A: t_{5h} , x30k, 200nm. B: t_{24h} , x50k, 200 nm. C: t_{24h} , x8000, 1 μ m. Se observan eritrocitos con su forma discoidal característica y algunas zonas que indican la interrupción de las fibras poliméricas (A, B).²⁰³

En el estado desoxigenado de la Hb se desencadena la polimerización por tanto se sugiere, a partir de que ocurren múltiples ciclos de oxigenación-desoxigenación, que el incremento del td es la causa que justifica la tendencia a la manifestación de la forma bicóncava, así como una moderada contribución a la restauración de algunas de las células anteriormente deformadas.⁹⁷⁻¹⁰⁰ Aunque se observaron, minoritariamente, algunas células irreversiblemente deformadas en algunos de los campos de observación.²¹³

La gravedad de expresión de las CVO recurrentes y la hemólisis crónica varían entre individuos y el número de células irreversiblemente falciformes circulantes determina el componente hemolítico;^{4,61,213} entonces la recuperación de la elasticidad y la disminución de la fragilidad mecánica de los eritrocitos, extendiendo el $t_{1/2}$ más allá de los 60 días informados, influiría en el mejoramiento de la calidad de vida del enfermo por drepanocitemia.^{211,212}

La inhibición en la formación de las fibras de los polímeros de dHbS observada por MET, en los eritrocitos tratados con vainillina (t_{5h} , t_{24h}) para una razón molar Hb: vainillina 1:4, así como la tendencia al incremento del número de eritrocitos en estado bicóncavo discoidal, corroboran lo planteado sobre la moderada actividad antidrepanocitaria de la vainillina.^{22,23,36-40}

3.7 Evaluación preliminar del estado redox en la drepanocitemia

En la drepanocitemia, como se ha informado para la mayoría de los estados patológicos, se presenta un balance del sistema redox como consecuencia de la depleción de los componentes antioxidantes.⁸⁶⁻⁹¹ Los resultados en cuanto al desbalance redox en los preparados procedentes de enfermos con drepanocitemia fueron preliminares. Se encontraron variables concentraciones de AT en cada uno de ellos en un intervalo de (0,8 - 2,2) mmol/L (Tabla 7), en comparación con el VR informado por el CEIEB para una población aparentemente sana.^{204,208}

Este hallazgo corrobora lo planteado en la literatura sobre el desbalance del sistema redox encontrado en enfermos con drepanocitemia, como consecuencia de la depleción de los componentes antioxidantes, lo cual pudiera estar relacionado con un elevado consumo metabólico de los endógenos asociado a un bajo consumo los exógenos.⁸⁷ Se incrementa la producción y liberación de ERO, situación favorecida por las frecuentes etapas de crisis de estos enfermos estrechamente asociadas a eventos inflamatorios.⁹¹

Tabla 7. Concentración de los AT, MDA y actividad de algunos de los componentes del sistema antioxidante endógeno (GSH, CAT, SOD) en los enfermos con drepanocitemia en comparación con los valores (VR) reportados por el CEIEB, para una población supuestamente sana.*

	AT mmol/L	MDA μM	GSH mg/L	SOD UmL ⁻¹ min ⁻¹	CAT UL ⁻¹ min ⁻¹
Enfermos	0,8–2,2 (1,4 ± 0,5)	2,9-13,8 (4,7 ± 2,9)	95,6–243,4 (164,5 ± 44,6)	5,39–20,48 (13,2 ± 4,7)	705–1530 (1 060,2 ± 220,7)
VR CEIEB	1,3 - 1,77	1,74 ± 0,27	786 ± 1146	1,45 ± 0,15	161 ± 12,5

*Se representa el intervalo de concentración y la media ± DE para n = 14 enfermos.

La concentración de MDA, en el plasma de estos enfermos, fue alta en comparación con el VR. Este incremento del MDA probablemente esté asociado a los daños de los fosfolípidos y las proteínas de la membrana eritrocitaria, como se ha informado por otros autores.^{93,209} Por otra parte, se encontró una disminución de la concentración plasmática de GSH, así como un incremento de la actividad SOD y CAT.

El poder reductor en los eritrocitos es proporcionado fundamentalmente por el GSH y la coenzima NADPH, formada en la ruta del fosfogluconato, que integran el sistema antioxidante de los éstos (Figura 17).^{84,214} El GSH constituye un excelente secuestrador de radicales a la vez que protege contra la oxidación a los grupos tioles de las proteínas.^{84,214} Se ha informado que en algunos enfermos la G6PG es disfuncional, que afecta la generación del poder reductor de los eritrocitos.^{207,215} Es por ello que las bajas concentraciones de GSH encontradas pudieran asociarse con un desbalance redox por exceso de ERO y un incremento del daño a las proteínas de la membrana.^{95,216,217}

La SOD, una metaloenzima (Mn-SOD, Fe-SOD, CuZn-SOD) presente en los organismos aeróbicos y compartimentos celulares que generan ERO, cataliza la dismutación del anión O⁻₂ a H₂O₂ y O₂.⁹³ El incremento de la actividad de ésta pudiera ser un mecanismo de respuesta al exceso de O⁻₂ por la aceleración de la autooxidación espontánea de HbS, así como a los eventos inflamatorios asociados.^{69,217}

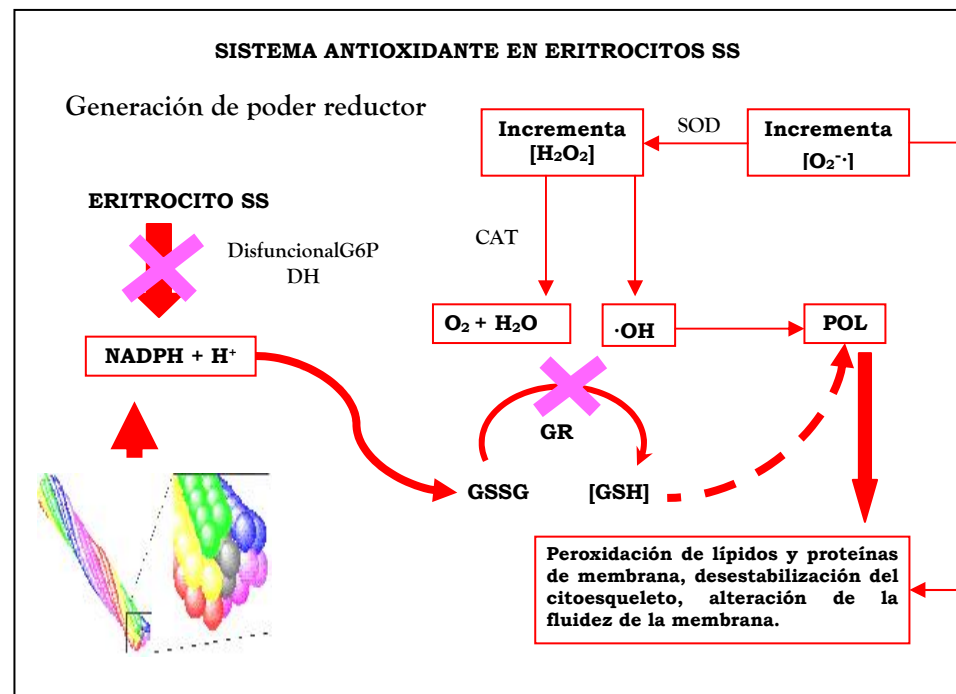


Figura 17. Sistema antioxidante en los eritrocitos SS. POL: peroxidación lipídica, G6PD: glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa.²¹⁷

Si se tiene en cuenta que se trabajó con sangre procedente de enfermos con drepanocitemia, la hemólisis pudo ser uno de los factores que influyó en el incremento de la actividad de CAT. Ésta se localiza en mitocondrias y peroxisomas, excepto en los eritrocitos que se encuentra en el citosol.²¹⁸ Cataliza la remoción del H₂O₂ generado en los procesos redox del metabolismo celular, mediante la conversión en H₂O y O₂.²¹⁸ Al parecer, en estos enfermos se incrementa la actividad de SOD y CAT como respuesta al exceso de O₂⁻ y H₂O₂ que se manifiesta en la enfermedad, lo cual pudiera ser el resultado de una respuesta compensadora.⁸⁸ No obstante, esta actividad no se incrementa sin la presencia de H₂O₂, por lo cual se infiere que son varios los factores implicados. En primer lugar, daño de la membrana por peroxidación lipídica que facilita la incorporación de la enzima al plasma sanguíneo y en segundo lugar la producción de H₂O₂ por la enzima SOD como consecuencia del incremento en la liberación de O₂⁻ en los procesos de oxidación.^{86,87,93} La SOD y la catalasa constituyen la primera línea de defensa antioxidante.⁸⁴ La relación CAT/SOD calculada fue de 0,08 < 0,11 (VR), lo cual indica una acumulación de H₂O₂.⁸⁷

La manifestación del desbalance redox detectado pudiera estar, además, relacionada con la polimerización de la HbS y alteraciones de la membrana eritrocitaria.²¹⁷

De forma general, el desbalance redox y la depleción de los antioxidantes se ha relacionado con la disfunción endotelial y por tanto, con la expresión y la activación de CAM, que facilita la adhesión y migración de reticulocitos y monocitos responsables de la obstrucción y los eventos vasooclusivos recurrentes.^{69,76,91} El aumento de los indicadores de daño oxidativo y la expresión de CAM, pudiera a su vez relacionarse con el incremento de la actividad XO. Ésta es una de las posibles fuentes de $O^{\bullet}_2$ y H_2O_2 en la drepanocitemia y, quizás una de las causas de las bajas defensas antioxidantes que se aprecian en estos enfermos.⁹¹ Durante los procesos de peroxidación lipídica se altera la fluidez de la membrana plasmática y las funciones de transporte iónico, entre otros.^{84,89}

3.7.1 Efectos de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos en el desbalance redox

En la sangre de enfermos con drepanocitemia tratada *in vitro* con vainillina y 1-O-alkilgliceroles sintéticos se incrementó ($p<0,05$) la concentración plasmática de los AT en comparación con la obtenida en los enfermos (Tabla 8). Mientras que la concentración de MDA se mantuvo al mismo nivel de la de los enfermos. Estos resultados indican que estos compuestos no interfieren con el mecanismo de peroxidación lipídica, al menos, en las condiciones experimentales establecidas no se observaron efectos anti o prooxidantes.⁸⁷

Los preparados tratados con vainillina disminuyeron significativamente ($p<0,05$) la actividad SOD vs. los enfermos. Ésta pudiera, indirectamente, disminuir la actividad de la enzima probablemente mediante la captura del $O^{\bullet}_2$.²¹⁹ La vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos mostraron una tendencia a incrementar ($p<0,05$) la actividad CAT, particularmente los 1-O-alkilgliceroles a la relación molar 1:5. La relación CAT/SOD a partir de las mediciones en los preparados tratados con vainillina y alkilgliceroles sintéticos, fue de 0,54 (vainillina); 0,21 (C10 1:1); 0,26 (C10 1:5); 0,25 (C12 1:1) y 0,31 (C12 1:5); superiores vs. los enfermos (0,08) y el VR (0,11). Esto indudablemente está relacionado con el incremento de la actividad de los antioxidantes exógenos por efecto de los compuestos evaluados.⁸⁶ La depleción del estado redox de los eritrocitos procedentes de enfermos con drepanocitemia fue parcialmente compensada por acción de la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos, a las relaciones molares estudiadas.

Tabla 8. Concentración de los AT, MDA y actividad de algunos de los componentes del sistema antioxidante endógeno (GSH, CAT y SOD), en los preparados tratados *in vitro* con vainillina (1:4) y 1-O-alkilgliceroles sintéticos (1:1 y 1:5).*

	AT mmol/L	MDA μM	GSH mg/L	SOD U _{mL} ⁻¹ min ⁻¹	CAT U _L ⁻¹ min ⁻¹
Vainillina 1:4	3,4 – 4,3 (3,8 ± 0,4) ^b	4,3 – 7 (4,88 ± 1,2) ^a	278 – 335,2 (312,1 ± 19,4) ^b	3,6 – 6,1 (4,8 ± 0,7) ^b	1378 - 4890 (2602,5±1059,8) ^b
C10 1:1	3,5 – 15,3 (9,4 ± 5,4) ^c	2,2 – 7,2 (4,66 ± 2,1) ^a	98,4 – 220,2 (145,0 ± 45,8) ^a	4,2 – 24,8 (13,2±10,8) ^a	1485 - 4380 (2823,1±915,3) ^b
C10 1:5	2,6 – 3,7 (3,0 ± 0,5) ^b	2,03 – 16 (6,59 ± 4,9) ^a	104,9 – 365,2 (173,9 ± 82,9) ^a	6,9 – 27,9 (13,5±9,6) ^a	2460 - 4950 (3599±823,1) ^c
C12 1:1	4,6 – 15 (11,1 ± 4,9) ^c	2,4 – 6,9 (4,68 ± 2,1) ^a	96,5 – 307,2 (174,8 ± 76,4) ^a	4,1 – 25,1 (10,1±7,2) ^a	1395 - 4170 (2593,1±1003,2) ^b
C12 1:5	9,9 – 14,9 (11,5 ± 2,5) ^c	2,4 – 11,4 (6,4 ± 5,1) ^a	98,4 – 243,4 (151,4 ± 48,1) ^a	4,1 – 29,7 (11,5±10,2) ^a	1170 - 4605 (3608,6±1037,5) ^c

*Se representa el intervalo y la media ± D.E. para n=9. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p \geq 0,05$) entre cada uno de los compuestos evaluados por determinación bioquímica.

Se ha informado que la vainillina tiene características antioxidantes y bioantimutágenas^{20,21} funciones probablemente asociadas a la actividad antidrepanocitaria. Estas propiedades pudieran intervenir, de alguna forma, en la restauración del estado antioxidante del eritrocito y otras células relacionadas con la drepanocitemia, como las endoteliales. Los estudios *in vitro* de la vainillina sobre la citotoxicidad, las mutaciones y las aberraciones cromosómicas, inducidas por mutágenos químicos como el H₂O₂, demostraron que ésta favorece la restauración de la estructura celular y reduce las aberraciones cromosómicas inducidas, probablemente por la estimulación de la replicación del ADN.²²⁰

Los moderados efectos provocados por la vainillina y los 1-O-alkilgliceroles sintéticos sobre el estado redox en los preparados de enfermos con drepanocitemia, deben ser estudiados con el objetivo de dilucidar y profundizar en los probables mecanismos de acción implicados en el restablecimiento del sistema de defensa eritrocitario. Así como profundizar en el mecanismo de acción de la vainillina pues se ha informado que ejerce la actividad antioxidante mediante la captura de radicales libres.²¹⁹

CONCLUSIONES

1. La Relajación Magnética Protónica (RM-¹H) resulta efectiva para el estudio *in vitro* del mecanismo de acción de compuestos químicos sobre la polimerización de la dHbS.
2. La vainillina y los 1-O-alkilglicerol sintéticos no provocan la hemólisis, lo que favorece la potencial aplicación de éstos como antitrepanocitarios en el tratamiento de los enfermos con drepanocitemia.
3. La vainillina, a relaciones molares $\leq 1:4$, inhibió la formación y crecimiento organizado de los polímeros en los dominios mediante el incremento del t_d de la polimerización de la dHbS.
4. La vainillina inhibe los sitios de contacto intermoleculares en el polímero de dHbS mediante interacciones covalentes con la molécula de Hb, y modifica el patrón electroforético a través de la formación de un complejo Hb:vainillina estable con un tiempo de vida medio de cuatro horas.
5. Tanto la vainillina como los 1-O-alkilglicerol, a las relaciones molares estudiadas, reversionaron la drepanocitosis con una tendencia a la recuperación del estado bicóncavo discoidal de las células sin incrementar los eventos hemolíticos.
6. La manifestación del desbalance redox detectado en la drepanocitemia pudiera estar relacionado con la polimerización de la HbS y alteraciones de la membrana eritrocitaria.
7. La depleción del estado redox de los eritrocitos procedentes de enfermos con drepanocitemia fue parcialmente compensada por acción de la vainillina y los 1-O-alkilglicerol sintéticos, a las relaciones molares estudiadas.

RECOMENDACIONES

1. Profundizar en los mecanismos moleculares implicados en el efecto antioxidante de la vainillina y los 1-O-alkilglicerol sintéticos, en drepanocitos, mediante la determinación de la actividad glutatión peroxidasa, SOD, CAT y G-6PDH, así como el incremento del 4-OH-nonanal e hidroperóxidos totales.
2. Obtener un pro-fármaco a partir de la vainillina y los 1-O-alkilglicerol, por síntesis de química, con el objetivo de incrementar el potencial farmacológico de éstos sobre la drepanocitemia en estudios preclínicos y clínicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Serjeant GR. Sick Cell Disease. 2nd ed. Great Britain: Oxford Medical Publications; 1992.
2. Colombo B, Guerchicoff E, Martínez G. Genética y clínica de las hemoglobinas humanas. 1a ed. Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1993.
3. 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. CD-ROM: Monografías de Excelencia. ISBN: 959-207-012-1. Santiago de Cuba: Editorial Oriente; 2001.
4. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. N Engl J Med 1997; 337: 762-769.
5. Serjeant GR. Sick cell disease. Lancet 1997; 350 (9079): 725-730.
6. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. N Engl J Med 1999; 340 (13): 1021-1030.
7. Davies SC. Fortnightly review: Management of patients with sickle cell disease. BMJ 1997; 315: 656-660.
8. Espinosa E, Svarch E, Martínez G. La Anemia Drepanocítica en Cuba. Experiencia de 30 años. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemot 1996; 12 (2): 97-105.
9. Martínez G, Hernández A, Corral L, Muñiz A, Hernández A. Biología molecular en hemoglobinopatías y hemopatías malignas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemot 1996; 12 (2): 81-85.
10. Muñiz A, Puig A, Cabrera M, Fernández J, Martínez G. Marcadores genéticos en pacientes con anemia drepanocítica de la provincia de Cienfuegos: haplotipos del bloque β y α -talasemia. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemot 2000; 16 (2): 142-144.
11. Rodríguez WE, Sáenz GF y Cháves MA. Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica, Am J Public Health 1998; 3 (1): 32-36
12. Caruso-Nicoletti M y col. Growth and development in white patients with sickle cell disease. J Pediatr Hematol Oncol 1992; 14 (4): 285-288.

-
13. Streetly A. Sickle Cell Disease: the case for coordinated information. *Br Med J* 1993; 306: 1490-1491.
 14. Martín MR, Dorticós A, Granda H. Eficiencia del programa de prevención de anemia falciforme en Ciudad de La Habana. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2000; 16 (5): 430-435.
 15. Granda H, Gispert S, Dorticós A, Cuadras Y, Calvo M. Cuban programme for prevention of sickle cell disease. *Lancet* 1991; 337: 152-153.
 16. Fieser & Fieser. *Organic Chemistry*. Third Edition. New York: Reinhold Publishing Corporation; 1989.
 17. AVI Sourcebook and Handbook Series (Source Book of Flavors). INC. West port (Connecticut): The AVI Publishing Company; 1981.
 18. USP XVIII. The United States Pharmacopeia. Eighteenth edition. The US Pharmacopeial Convention. Easton PA 18042: Mack Printing Company; 1970.
 19. Feron VJ. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat Res* 1991; 259: 363-385.
 20. Watanabe K, Ohta T, Shirasu Y. Antimutagenic effects of benzaldehydes and its derivatives on mutagenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide in *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem* 1988; 52: 1041-1045.
 21. Ohta T. Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives. *Critical Rev Toxicol* 1993; 23: 127-146.
 22. Zaugg RM, Walder JA, Klotz IM. Schiff base aducts of hemoglobin. *J Biol Chem* 1977; 252 (53): 8542-8548.
 23. 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 (6): 1334-1341.
 24. Tsujimoto M, Toyama AS. Studies on unsaponifiable fractions from some fish liver oil. *Ann Rep Tokyo Inst Technol* 1921; 16: 471-510.
 25. Sedeño C, Prun B, Angeles M, Enríquez RD. Estudios químicos de las gorgonias Cubanas. XIV Gliceril éteres presentes en 5 especies de gorgonias. *Rev Cubana Farm* 1985; 84: 237-243.

-
26. Quijano L, Cruz F, Navarrete I y col. Alkylglycerol monoethers in the marine sponge *Desmapsamma anchorata*. *Lipids* 1994; 72: 7-8.
 27. Bordier CG, Sellier N, Foucault AP, Le Goffic. Purification and characterization of deep shark *centrophorus squamosus* liver oil 1-O-alkylglycerol ether lipids. *Lipids* 1996; 31 (5): 521-528.
 28. Mangold HK. Synthesis of biologically active ether lipids. *Prog Biochem Pharmacol* 1988; 22: 123-132.
 29. Weber N. Biological effects of alkylglycerols. *Prog Biochem Pharmacol* 1988; 22: 48-57.
 30. Valdés YC. Propiedades biológicas de los 1-O-alkilglicerol de origen marino. [Tesis Doctoral]. La Habana: Universidad de La Habana; 1997.
 31. Bilbao M, León J, Sotomayor H, Valdés Y, Merchán F. Síntesis química y caracterización del 1-O-octadecilglicerol. Sus efectos antiinflamatorios. *Memorias Joven Ciencia* 1998: 115.
 32. Fernández E, Sedeño C, Valdés Y, Mamposo M. Éter de glicerilo de origen marino: Un promotor de la absorción. *Rev Cubana Farm* 1993; 27 (2): 223-233.
 33. Sotomayor H, Bilbao M, González B, León JL, Merchán F, Mosquera T y col. Evaluación farmacológica del 1-O-dodecilglicerol sintético en un modelo de angiogénesis inflamatoria. *Bioquímica* 2005, 30 (1): 7-11.
 34. Acevedo R, Gil D, del Campo J, Bracho G, Valdés Y, Pérez O. The adjuvant potencial of synthetic alkylglycerols. *Vaccine* 2005; 1: 23-28.
 35. 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; Poznań. 1027-1030.
 36. Abdala JC, Soler C, Fernández A, Álvarez E, Del Toro G. Estudio de la interacción de compuestos carbonilos con hemoglobinas in vitro. Valoración de su efecto antisickling. *Rev Cubana Quím* 1996; 8 (2): 3-10.
 37. Abdala JC, Cabal CA, Fernández AA, Soler C, Alvarez ED, Lores M, Del Toro G. Influence of the vanillin in the kinetics of polimerization of HbS. *Proceedings of the 36th IUPAC Congress. Chimia Acta*; MC-B29. Suiza. 1997.

-
38. 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.
 39. 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 Cubana Quím* 2002; 14: 59-64.
 40. 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): 4-10.
 41. Falcón JE, Del Toro G, Alonso Y. Evaluación de la influencia de agentes antisickling en la polimerización de la hemoglobina S por resonancia magnética. *Proceedings I Symposium Internacional de Ciencias Biológicas Charles T. Ramsden in memoriam*. 2004. ISBN: 959-207-204-3 (CD ROM, BF-ELE-05).
 42. Spivak JL. The blood in systemic disorders. *Lancet* 2000; 355 (9216): 1707-1712.
 43. Weatherall DJ. ABC of clinical haematology: The hereditary anaemias. *Br M J* 1997; 314: 492-498.
 44. Eaton WA. Linus Pauling and sickle cell disease. *Biophys Chem* 2003; 100: 109-116.
 45. Davis T. Biography of Vernon M. Ingram. *Neuroscience. PNAS* 2004; 101(40): 14323-14325.
 46. Nagel RL, Fabry M, Kaul D. New insights on sickle cell anemia. *Diagnostic Medicine* 1984; 1: 1-7.
 47. Rodgers GP, Noguchi CT, Schechter AN. Sickle Cell Anemia. *Sci Am Sci Med* 1994; 1 (4): 48-57.
 48. Powars D, Chan LS, Schroeder WA. The variable expression of Sickle Cell Disease is genetically determined. *Semin Hematol* 1990; 27 (4): 360-376.
 49. Steinberg MH et al. Gender and haplotypes effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. *Am J Hematol* 1995; 48: 175-181.
 50. Steinberg MH. Genetic modulation of sickle cell anemia. *Soc Exp Biol Med* 1995; 209: 1-13.
 51. Steinberg MH et al. Hematological effects of atypical and cameroon β -globin gene haplotypes in adult sickle cell anemia. *Am J Hematol* 1998, 59: 121-126.
 52. Friedman MJ. Erythrocytic mechanism of sickle resistance to malaria. *Proc Natl Acad Sci* 1978; 75 (4): 1994-1997.

-
53. Seltzer WK, Abshire TC, Lane PA, Roloff JS and Githens JH. Molecular genetic studies in black families with sickle cell anemia and unusually high levels of fetal hemoglobin. *Hemoglobin* 1992; 16 (5): 363-377.
 54. Dover GJ y col. Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an x-linked gene located at xp22.2. *Blood* 1992; 80 (3): 816-824.
 55. Nagel RL y col. The Senegal DNA Haplotype is associated with the amelioration of anemia in African-American Sickle Cell Anemia patients. *Blood* 1991; 77 (6): 1371-1375.
 56. 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.
 57. Steingart R. Management of patients with Sickle Cell Disease. *Med Clin North Am* 1992; 76 (3): 157-160.
 58. Harrison's Principles of Internal Medicine. 14th Edition. Part six. Section 2 (107). Mac Graw Hill 1998.
 59. Pollack ChV. Emergencies in Sickle Cell Disease. *Emerg Med Clin North Am* 1993; 11 (2): 365-377.
 60. Dolor en Drepanocitosis. PAIN Clinical Updates. International Association for the Study of Pain V Edición 2; 1997.
 61. Brittenham GM, Schechter AN, Noguchi CT. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood* 1985; 65 (1): 183-189.
 62. Forget BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Aca Sci* 1988; 850: 38-44.
 63. Rodgers GP. Pharmacologic Modulation of Fetal Hemoglobin. En: *Sickle Cell Disease: Basic principles and clinical practice*. 1st ed. New York: Raven Press Ltd; 1994. p. 829-843.
 64. Rodgers GP. Overview of pathophysiology and rationale for treatment of Sickle Cell Anemia. *Semin Hematol* 1997; 34 (3): 2-7.
 65. Bunn HF. Induction of fetal hemoglobin in Sickle Cell Disease. *Blood* 1999; 93 (6): 1787-1789.

-
66. Hebbel RP, Boogaerts MAB, Eaton JW, Steinberg MH. Erythrocyte adherence to endothelium in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1980; 302: 992-995.
 67. Solovey A, Yi Lin BS, Browne P y col. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1997; 337 (22):1584-1590.
 68. Vordermeier S, Singh S, Biggerstaff J, Harrison P, Grech H, Pearson T y col. Red blood cells from patients with sickle cell disease exhibit an increased adherence to cultured endothelium pretreated with tumour necrosis factor (TNF). *Br J Haematol* 1992; 81: 591-597.
 69. Belhassen L, Pelle G, Sediame S, Bachir D, Carville C y col. Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood* 2001; 97 (6): 1584-1589.
 70. Lubin BH. Sickle cell disease and the endothelium. *N Engl J Med* 2004; 124 (3): 391-402.
 71. 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 (5): 227-228.
 72. Pawloski J, Hess D, Stamles J. Impaired vasodilation by red blood cells in sickle cell disease. *PNAS* 2005; 102 (7): 2531-2536.
 73. Wick TM, Eckman JR. Molecular basis of sickle-endothelial cell interactions. *Curr Opin Hematol* 1996; 3: 118-124.
 74. Setty BN, Stuart MJ. Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to endothelium: potential role in sickle cell disease. *Blood* 1996; 88: 2311-2320.
 75. Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest* 1997; 99: 2561-2564.
 76. Graido-González E, Doherty JC, Bergreen EW, Organ G, Telfer M, McMillen MA. Plasma endothelin-1, cytokine and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive crisis. *Blood* 1998; 92 (7): 2551-2555.
 77. Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 1998; 101 (9): 1899-1904.

-
78. Matsui NM, Borsig L, Rosen SD, Yaghmai M, Varki A, Embury SH. P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. *Blood* 2001; 98 (8): 1955-1962.
 79. Villaescusa R, Arce A, Serrano O, Merlín J, Guerreiro A, Morera L, Espinosa E. Alteraciones del sistema complemento en pacientes con anemia drepanocítica en estado basal. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2001; 17 (22): 123-127.
 80. Pathare A, Kindi SA, Daar S, Dennison D. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology* 2003; 8 (5): 329-337.
 81. Brugnara C, de Franceschi L, Alper SL. Inhibition of Ca^{2+} -dependent K^{+} transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazol and other imidazole derivatives. *J Clin Invest* 1993; 92: 520-526.
 82. Lew VL, Etzion Z, Boockchin RM. Dehydration response of sickle cells to sickling-induced Ca^{++} permeabilization. *Blood* 2002; 99 (7): 2578-2585.
 83. Gibson J, Muzyamba M. Modulation of Gardos channel activity by oxidants and oxygen tension: effects of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and phenazine methosulphate. *Bioelectrochemistry* 2004; 62: 147– 152.
 84. Yu BP. Cellular defenses against damaged from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-162.
 85. Fung LW, Zhang Y. A method to evaluate the antioxidant system for radical in erythrocyte membrane. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 289-298.
 86. Halliwell B. Antioxidants and human diseases: a general introduction. *Nutr Rev* 1997; 55: S44-S52.
 87. Chan AC, Chow ChK, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implications in genetic anemia. *Exp Biol Med* 1999; 222: 274-282.
 88. Sultana C, Shen Y, Rattan V, Johnson C, Kalra VK. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to trasendothelial migration of monocytes. *Blood* 1998; 92 (10): 3924-3935.

-
89. Aslan M, Ryan TM, Adler B, Townes TM, Parks DA, Thompson JA y col. Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *PNAS* 2001; 98 (26): 15215-15220.
 90. Aslan M, Ryan TM, Townes TM, Coward L, Kirk MC, Barnes S y col. Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem* 2003; 278: 125-130.
 91. Blann AD, Marwah S, Serjeant G, Bareford, Wright J. Platelet activation and endothelial cell dysfunction in sickle cell disease is unrelated to reduced antioxidant capacity. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14 (3): 255-259.
 92. Weiner DL, Hibberd PL, Betit P y col. Preliminary Assessment of Inhaled Nitric Oxide for Acute Vaso-occlusive Crisis in Pediatric Patients With Sickle Cell Disease. *JAMA* 2003; 289: 1136-1142.
 93. Das SK, Nair RC. Superoxide dismutase, glutathion peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickle erythrocytes. *Br J Hematol* 1980; 44: 87-92.
 94. Hebbel RP. Auto-oxidation and membrane associated fenton reagent: A possible explanation for development of membrane lesions in sickle erythrocytes. *J Clin Invest* 1985; 75: 1531.
 95. Rice-Evans C, Omorphos SC, Baysal E. Sickle cell membrane and oxidative damage. *Biochemistry* 1986; 237: 265.
 96. Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercelloti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood* 2000; 96 (7): 2451-2459.
 97. Eaton WA, Hofrichter J and Ross PD. Delay time of gelation. A possible determinant of clinical severity in Sickle Cell Disease. *Blood* 1976; 47 (4): 115-120.
 98. Wellems TE, Josephs R. Crystallization of deoxyhemoglobin S by fiber alignment and fusion. *J Mol Biol* 1979; 135: 651-674.
 99. Noguchi CT and Schechter AN. The intracellular polymerization of sickle hemoglobin and its relevance to sickle cell disease. *Blood* 1981; 58: 1057-1068.

-
100. Ferrone FA, Hofrichter J, Eaton WA. Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. *J Mol Biol* 1985; 183: 611-631.
 101. Eaton WA, Hofrichter J. Hemoglobin S gelation and Sickle Cell Disease. *Blood* 1987; 70: 1245-1266.
 102. Eaton WA, Hofrichter J. Sickle cell hemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem* 1990; 40: 67-8, 157-175.
 103. 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.
 104. Abraham DJ, Gazze DM, Kennedy PE, Mokotoff M. Desing, 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.
 105. Schechter AN, Noguchi CT. Sickle hemoglobin polymer: Structure-function correlates. En: *Sickle Cell Disease: Basic principles and clinical practice*. New York: Raven Press Ltd; 1994.
 106. 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.
 107. Adachi K, Kim J, Ballas S, Surrey S, Asakura T. Facilitation of HbS polimerization by the substitution of Glu for Gln at β 121. *J Biol Chem* 1988; 263 (12): 5607-5610.
 108. Harrington DJ, Adachi K, Royer WE. The high resolution crystal structure of deoxyhemoglobin S. *J Mol Biol* 1997; 272: 398-407.
 109. Noguchi CT, Torchia DA, Schechetr AN. Determination of deoxyhemoglobin S polymer in sickle erythrocytes upon deoxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; Med Sci 77, 9: 5447-5491.
 110. Magdoff-Fairchild B, Poillon WN, Li T, Bertles JF. Thermodynamic studies of polymerization of deoxygenated sickle cell hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73 (4): 990-994.
 111. Poyart C, Bohn B, Bursaux E, Guesnon P. Détermination du temps de retard d'agrégation de la déoxyhéoglobine S en tampon phosphate concentré. *Nouv Rev Fr Hematol* 1981; 23: 17-25.
 112. Cheetham RC, Huehns ER, Rosemeyer MA. Participation of haemoglobins A, F, A2 and C in polymerisation of haemoglobin S. *J Mol Biol* 1979; 129: 45-61.

-
113. He Z, Russell E. A human embryonic hemoglobin inhibit HbS polymerization in vitro and restores a normal phenotype to mouse models of sickle cell disease. *PNAS* 2002; 99 (16): 10635-10640.
 114. Charache S. Experimental therapy. *Hematol Oncol Clin Noth Am* 1996; 10 (6): 1373-1382.
 115. Ballas SK. Management of sickle pain. *Curr Opin Hematol* 1997; 4: 104-111.
 116. Pollack ChV, Sanders DY, Severance HW. Emergency department analgesia without narcotics for adults with acute Sickle Cell Pain Crisis: Case report and review of crisis management. *J Emerg Med* 1991; 9: 445-452.
 117. Yaster M, Tobin JR, Billet C, Casella J and Dover G. Epidural analgesia in the management of severe vaso-occlusive sickle cell crisis. *Pediatr* 1994; 93 (2): 310-315.
 118. Griffin TC, McIntire D, Buchanan GR. High-Dose intravenous methylprednisolone therapy for pain in children and adolescents with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 1994; 330 (11): 733-737.
 119. Elander J, Lusher J, Bevan D, Telfer P, Burton B. Understanding the Causes of Problematic Pain Management in Sickle Cell Disease: Evidence That Pseudoaddiction Plays a More Important Role Than Genuine Analgesic Dependence. *J Pain Symptom Management* 2004; 27 (2): 156-169.
 120. Wilimas JA, Flynn PM, Harris S, Day SW, Smith R, Chesney PJ y col. A randomized study of outpatient treatment with ceftriaxone for selected febrile children with sickle cell disease. *N Engl J Med* 1993; 329: 472-476.
 121. Rogers Z, Buchanan R. Bacteremia in children with sickle hemoglobin C disease and sickle beta⁺-thalassemia: Is prophylactic penicillin necessary?. *J Pediatr* 1995; 127 (3): 348-354.
 122. Bjornson AB, Falletta JM, Verter JI, Buchanan GR, Miller ST, Pegellow CH y col. Serotype-specific immunoglobulin G antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in children with sickle cell anemia: Effects of continued penicillin prophylaxis. *J Pediatr* 1996; 129 (6): 828-835.
 123. Campbell LC, Burton GV, Holcombe RF. Transfusion therapy in sickle cell disease patients. *J La State Med Soc* 1993: 515-521.
 124. Walder JA, Walder RY, Arnone A. Development of antisickling compounds that chemically modify hemoglobin S within the 2,3-diphosphoglycerate binding site. *J Mol Biol* 1980; 141: 195-216.

-
125. Russu IM, Lin AK, Yang ChP, Ho Ch. Molecular basis for the antisickling activity of aromatic amino acids and related compounds: A proton nuclear magnetic resonance investigation. *Biochemistry* 1986; 25: 808-815.
 126. Votano JR, Altman J, Wilchek M, Gorecki M, Rich A. Potential use of bioaromatic L-phenylalanyl derivatives as therapeutic agents in the treatment of sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3190-3194.
 127. Gorecki M, Votano JR, Rich A. Peptide inhibitors of sickle hemoglobin aggregation: Effect of hydrophobicity. *Biochemistry* 1980; 19: 1564-1568.
 128. Christakis J, Bare GH, Balcerzak SP, Alben JO, Bromberg PA. Mechanism of inhibition of hemoglobin S polymerization by cyanate. *J Lab Clin Med* 1977; 89 (5): 992-1001.
 129. Abraham DJ, Mehanna AS, Williams FL. Design, synthesis, and testing of potential antisickling agents. 1. Halogenated benzyloxy and phenoxy acids. *J Med Chem* 1982; 25: 1015-1017.
 130. Kennedy PE, Williams FL, Abraham DJ. Design, synthesis, and testing of potential antisickling agents. 3. Ethacrynic acid. *J Med Chem* 1984; 27 (2): 103-105.
 131. Abraham DJ, Kennedy PE, Mehanna AS, Patwa DC, Williams FL. Design, synthesis, and testing of potential antisickling agents. 4. Structure-activity relationships of benzyloxy and phenoxy acids. *J Med Chem* 1984; 27: 967-978.
 132. Merrett M, Stammers DK, White RD, Wootton R and Kneen G. Characterization of the binding of the anti-sickling compound, BW12C, to haemoglobin. *Biochem J* 1986; 239: 387-92.
 133. Fatope MO and Abraham DJ. Design, synthesis, and testing of potential antisickling agents. 10. (2,2-Dimethylchroman-6-yl) alcanoic acids. *J Med Chem* 1987; 30: 1973-77.
 134. 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.
 135. Abraham DJ, Perutz MF and Phillips EV. Physiological and x-ray studies of potential antisickling agents. *Biochemistry* 1993; 80: 324-328.

-
136. de Franceschi L, Saadane N, Trudel M, Alper SL, Brugnara C and Beuzard Y. Treatment with oral clotrimazole blocks Ca^{2+} -dependent K^{+} transport and reverses erythrocyte dehydration in transgenic SAD mice. *J Clin Invest* 1994; 93: 1670-1676.
 137. Rifai N, Sakamoto M, Law T, Mikati M, Armsby CC and Brugnara C. HPLC measurement, blood distribution, and pharmacokinetics of oral clotrimazole, potentially useful antisickling agent. *Clin Chem* 1995; 41 (3): 387-91.
 138. Brugnara C, Armsby CC, Sakamoto M, Rifai N, Alper SL and Platt O. Oral administration of clotrimazole and blockade of human erythrocyte Ca^{++} -activated K^{+} channel: The imidazole ring is not required for inhibitory activity. *J Pharmacol and Experimental Therapeutics* 1995; 273: 266-72.
 139. Saleh N, Gharaibeh Al-R and Al-Sheyyab M. Inhibition of K^{+} transport in human sickle erythrocytes by okadaic acid and sodium fluoride. *Clin Exp Pha Phy* 1997; 24: 841-43.
 140. De Franceschi L, Bachir D, Galacteros F, Tchernia G, Cynober T, Alper S y col. Oral magnesium supplements reduce erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest* 1997; 100 (7): 1847-52.
 141. Gibson JS, Stewart GW and Ellory JC. Effect of dimethyl adipimidate on K^{+} transport and shape change in red blood cells from sickle cell patients. *FEBS Lett* 480 2000: 179-83.
 142. Romero JR, Suzuka SM, Nagel RL and Fabry ME. Arginine supplementation of sickle transgenic mice reduces red cell density and Gardos channel activity. *Blood* 2002; 99 (4): 1103-08.
 143. Stocker JW, De Franceschi L, McNaughton-Smith GA, Corrocher R, Beuzard Y and Brugnara C. ICA-17043, a novel Gardos channel blocker, prevents sickled red blood cell dehydration in vitro and in vivo in SAD mice. *Blood* 2003; 101 (6): 2412-2424.
 144. Brugnara C. Sickle cell disease: From membrane pathophysiology to novel therapies for prevention of erythrocyte dehydration. *J Pediatric Hematol/Oncol* 2003; 25 (12): 927-933.
 145. Ley TJ y col. 5-Azacytidine increases γ -globin synthesis and reduces the proportion of dense cells in patients with sickle cell anemia. *Blood* 1983; 62 (2): 370-380.
 146. Charache S, Dover GJ, Moyer MA and Moore JW. Hydroxyurea-induced augmentation of fetal hemoglobin production in patients with sickle cell anemia. *Blood* 1987; 69 (1): 109-116.

-
147. Goldberg MA y col. Treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea and erythropoietin. *N Engl J Medic* 1990; 323: 366-372.
 148. Charache S y col. Hydroxyurea: Effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood* 1992; 79 (10): 2555-2565.
 149. Orringer EP and Parker JC. Hydroxyurea and sickle cell disease. *Hematologic Pathology* 1992; 6 (4): 171-178.
 150. Charache S. y col. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Medic* 1995; 332: 1317-1322.
 151. Kaufman RE. Hydroxyurea: Specific therapy for sickle cell snemia. *Blood* 1992; 79 (10): 21-25.
 152. Adragna NC, Fonseca P and Lauf PK. Hydroxyurea affects cell morphology, cation transport, and red blood cell adhesion in cultured vascular endothelial cells. *Blood* 1994; 83 (2): 553-560.
 153. Saleh AW y col. Cytokines and soluble adhesion molecules in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta Haematol* 1998; 100: 26-31.
 154. Saleh AW, Hillen HFP and Duits AJ. Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta haematol* 1999; 102: 31-37.
 155. Roa D, Kopsombut P, Aguinaga MdP and Turner EA. Hydroxyurea-induced denaturation of normal and sickle hemoglobins in vitro. *J Clin Lab Anal* 1997; 11: 208-213.
 156. de Montalembert M y col. Three-Year Follow-up of hydroxyurea treatment in severely l11 children with sickle cell disease. *J Pediatric Hematol/Oncol* 1997; 19 (4): 313-318.
 157. Charache S. Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. *Semin Hematol* 1997; 34 (3): 15-21.
 158. Vichinsky EP. Hydroxyurea in children: Present and future. *Semin Hematol* 1997; 34 (3): 22-29.
 159. Ohene-Frempong K and Smith-Whitley K. Use of hydroxyurea in children with sickle cell disease: What comes next?. *Semin Hematol* 1997; 34 (3): 30-41.
 160. Rogers ZR. Hydroxyurea therapy for diverse pediatric populations with sickle cell disease. *Semin Hematol* 1997; 34 Suppl 3 (3): 42-47.

-
161. Steinberg MH y col. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Determinants of response to hydroxyurea. *Blood* 1997; 89 (3): 1078-1088.
 162. Olivieri NF and Vichinsky EP. Hydroxyurea in children with sickle cell disease: Impact on splenic function and compliance with therapy. *J Pediatric Hematol/Oncol* 1998; 20 (1): 26-31.
 163. Griffin PR. Pharmacological therapy. *Bailliere's Clin Haematol* 1998; 11 (1): 239-255.
 164. Kim-Shapiro DB y col. Time resolved absorption study of the reaction of hydroxyurea with sickle cell hemoglobin. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1380: 64-74.
 165. Kim-Shapiro DB y col. The reaction of deoxy-sickle cell hemoglobin with hydroxyurea. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1428: 381-387.
 166. Rupon JW y col. The reactions of myoglobin, normal adult hemoglobin, sickle cell hemoglobin and hemin with hydroxyurea. *Biophys Chem* 2000; 84: 1-11.
 167. Ballas SK, Marcolina MJ, Dover GJ and Barton FB. Erythropietic activity in patients with sickle cell anaemia before and after treatment with hydroxyurea. *Br J Haematol* 1999; 105: 491-496.
 168. Rotter M, Aprelev A, Adachi K and Ferrone F. Molecular crowding limits the role of fetal hemoglobin in therapy for sickle cell disease. *J Mol Biol* 2005; 347: 1015–1023.
 169. Bruce SK. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radical Biol Med* 2004; 37 (6): 737–744.
 170. Shirahama K, Kubota S, Yang JT. Do amino acids reverse the sickling of erythrocytes containing hemoglobin S. *Hemoglobin* 1980; 4 (2): 149-155.
 171. Thompson AA, Cormelius AS, Asakura T, Horiuchi K. Comparative studies of phenothiazine derivatives for their effects on swelling of normal and sickle erythrocytes. *Gen Pharmacol* 1993; 24 (4): 999-1006.
 172. Cornelius AS, Reilly MP, Suzuki M, Asakura T and Horiuchi K. The mechanism of chlorpromazine induced red blood cell swelling. *Gen Pharmacol* 1994; 25 (1): 205-210.
 173. Acquaye CTA, Young JD, Ellory JC, Gorecki M, Wilchek M. Mode of transport and possible mechanism of action of L-phenylalanine benzyl esters as an antisickling agent. *Biochim Biophys Acta* 1982; 693: 407-416.
 174. Braquet P. Biologically active ether lipids. *Prog Biochem Pharmacol* 1988; 22: 48-57.

-
175. Weber N and Mangold HK. Radioactivity labeled ether lipids by biotransformation of symmetrical alkylglycerols in cell suspension cultures of rape. *Febbs Letters* 1987; 211 (2): 225-228.
 176. Valdés YC, Pignol B, Coulomb H, Cedeño C and Braquet P. Efecto de los 1-O-alkilglicerol sobre la producción de citoquinas por monocitos humanos. (Abstract). *J Biomed* 1991; sup11 (10).
 177. Brohult AJ, Brohult T, Brohult S and Joelsson I. Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols. *Acta Obstret Gynecol* 1986; 65: 779-785.
 178. Houlihan WJ, Lohmeyer M, Workman P and Cheon S. Phospholipid antitumor agents. *Medic Res Rev* 1995; 15 (3): 157-223.
 179. Berdel WE, Egger B, Fink U, Munder PG y col. Inhibition by alkyl-lysophospholipids of tritiated thymidine uptake in cells of human malignant urologic tumors. *J Nat Cancer Inst* 1981; 66: 813-17.
 180. Berdel WE, Greigner E, Fink U y col. Alkyl-lysophospholipids incubated human macrophages inhibit the growth autologous solid tumors in vitro. *Exp Hematol Copenh* 1981; 9 (9): 29.
 181. Berdel WE, Andreesen R and Munder PG. Synthetic alkylphospholipid analogues: a new class of antitumor agents. En: *Phospholipid and cellular regulation*. Vol II. JF Kuo (ed). Boca Ratón (Florida): CRC Press; 1986. p. 41-73.
 182. Weber N. Metabolism of orally administered rac-1-O- [$^{11-14}\text{C}$] dodecylglycerol and nutritional effects of dietary rac-1-O-dodecylglycerol in mice. *J Lipid Res* 1985; 26 (12): 1412-1420.
 183. Yamamoto N, St Claire DA, Jr Homma S and Ngwenga BZ. Activation of mouse macrophages by alkylglycerols, inflammation products of cancerous tissues. *Cancer Res* 1988; 48 (21): 6044-6049.
 184. Yamamoto N, Willett NP and Lindsay DD. Participation of serum proteins in the inflammation-primed activation of macrophages. *J Inflammation* 1994; 18 (3): 311-322.
 185. Ngwenga BZ, Fiavey NP and Mogashoa MM. Activation of peritoneal macrophages by orally administered ether analogues of lysophospholipids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 197 (1): 91-97.
 186. Ved HS, Gustow E and Pieringer RA. Regulation of neuronal differentiation in neuron-enriched primary cultures from embryonic rat cerebra by platelet activating factor and the structurally related glycerol ether lipid, dodecylglycerol. *J Neurosci Res* 1991; 30 (2): 353-358.

-
187. Ved HS, Gustow E, Mahadevan V and Pieringer RA. Dodecylglycerol. A new type of antibacterial agent which stimulates autolysin activity in streptococcus faecium ATCC 9790. J Biol Chem 1984; 259 (13): 8115-8121.
 188. Haynes MP, Buckley HR, Higgins ML and Pieringer RA. Synergism between the antifungal agents amphotericin B alkylglycerol ethers. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38 (7): 1523-1529.
 189. Mentzer WC y col. Availability of related donors for bone marrow transplantation in sickle cell anemia. Am J Pediatric Hematol/Oncol 1994; 16 (1): 27-29.
 190. Kalinyak KA y col. Bone marrow transplantation in a young child with sickle cell anemia. Am J Hematol 1995; 48: 256-261.
 191. Glorioso J. Gene therapy 1995: developments on the horizon. Gene Therapy 2 1985: 81-83.
 192. Persons D, Nienhuis A. Gene therapy for the hemoglobin disorders: Past, present and future. PNAS 2000; 97 (10): 5022-5024.
 193. Reik A, Milner J, Ryan T, Gregory P, Townes T, Case C. Transactivation of fetal hemoglobin genes by engineered zinc-finger protein transcription factors for the treatment of sickle cell disease. Mol Therapy 2004; 9 (Supl 1): S344.
 194. 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 (3): 87-96.
 195. Stanley HR. Toxicity testing of dental materials. 1ed. Boca Raton (Florida): CRC Press Inc; 1987.
 196. Del Toro G, Falcón JE, Alonso Y, Valdéz Y. Estudio de la actividad hemolítica del 4H3MBA en hematíes SS. Rev Cubana Farm 2002; 36 (Supl Esp 1): 54-58.
 197. 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 (1): 63-66.
 198. Fernández AA. Cinética de la polimerización de la HbS estudiada por Resonancia Magnética. Contribución a la evaluación y tratamiento de la drepanocitemia, Editorial Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, 2002.

-
199. Lores Manuel. Estudio de los procesos de interacción magnética y la movilidad molecular durante la polimerización de la HbS con métodos de resonancia magnética. [Tesis Doctoral]. Santiago de Cuba: Universidad de Oriente; 2005.
 200. LKB Multiphor II Electrophoresis System. Laboratory Users Manual. Manual. LKB Producter. Sweden 1986.
 201. Rucknagel DL. The biochemical genetics of Sickle Cell Anemia and related hemoglobinopathies. Inc. New York, San Francisco: Academic Press; 1975.
 202. Quatttrochi OA, de Andrizzi SA, Laba RF. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica 1992.
 203. Del Toro G, Valdés YC, de la Rosa MC, Falcón V, Cabal CA. Actividad antidrepanocítica de la vainillina sobre hematíes de un paciente con drepanocitemia por microscopía electrónica de transmisión. *Bioquímica* 2004; 29 (1): 5-10.
 204. Gil L, Martínez G, Tápanes R, Castro O, González D y col. Oxidative stress in adult dengue patients. *Am J Tropical Med & Hyg* 2004; 71(5): 652-657.
 205. Martínez G, Popov I, Al-Dalaen S, Horwat-Delaporte R, Giuliani A, León OS. Contribution to characterization of oxidative stress in diabetic patients. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 2005; 24 (2): 197-203.
 206. Luján L, Gil L, Martínez G, Giuliani A, González I, Tarinas A y col. Effects of increase micronutrients intake on oxidative stress indicators in HIV/AIDS patients. *Int J Vit Nut Res* 2005; 75 (1): 19-27.
 207. Ecobichon DJ. Glutathione depletion and resynthesys in laboratory animals. *Drug Chem Toxicol* 1984; 7 (4): 345-365.
 208. Boehringer M. *Biochimica Information. A revised biochemical reference source. Enzymes for outline.* 1st ed, Germany; 1987: 15-16.
 209. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehyd lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth Enzymol* 1990; 186: 407-421.
 210. Junqueira LC, Carneiro J. *Histología básica.* 4ta. Ed. España: Masson S.A.; 1996.

-
211. Ballas S and Smith ED. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. *Blood* 1992; 79: 2154-2163.
 212. 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.
 213. Asakura T, Hirota T, Nelson AT, Reilly MP, Ohene-Frempong K. Percentage of reversibly and irreversibly sickled cells are altered by the method of blood drawing and storage conditions. *Blood Cells Mol Diseases* 1996; 22 (24): 297-306.
 214. Estrada M, Molina G, Gutiérrez A. Enzimas de la biosíntesis del glutatión reducido (GSH). Valores normales y estudio de un paciente con deficiencia de GSH. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1999; 15 (1): 35-41.
 215. Roth EF, Schulman S, Vanderberg J. Pathways for the reduction of oxidized glutathione in the plasmodium falciparum infected erythrocytes can parasite enzymes replace host red cell Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase. *Blood* 1986; 67: 827.
 216. Gebicki JM. Protein hydroperoxide as new reactive oxygen species. *Redox Report* 1997; 3 (2): 99-110.
 217. Uyesaka N, Hasegawa S, Ishioka N, Ishioka R, Shio H and Schechter A. Effects of superoxide anions on red cell deformability and membrane proteins. *Biorheology* 1992; 29: 217-229.
 218. Céspedes EM, Hernández I, Llopiz N. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 1996; 15 (2): 12-15.
 219. Santosh S, Priyadarsini K, Sainis K. Free radical scavenging activity of vanillin and o-vanillin using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. *Redox Report* 2002; 7 (1): 35-40.
 220. Tamai K, Tezuka H and Kuroda Y. Different modifications by vanillin in cytotoxicity and genetic changes induced by EMS and H₂O₂ in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 1992; 231-268.

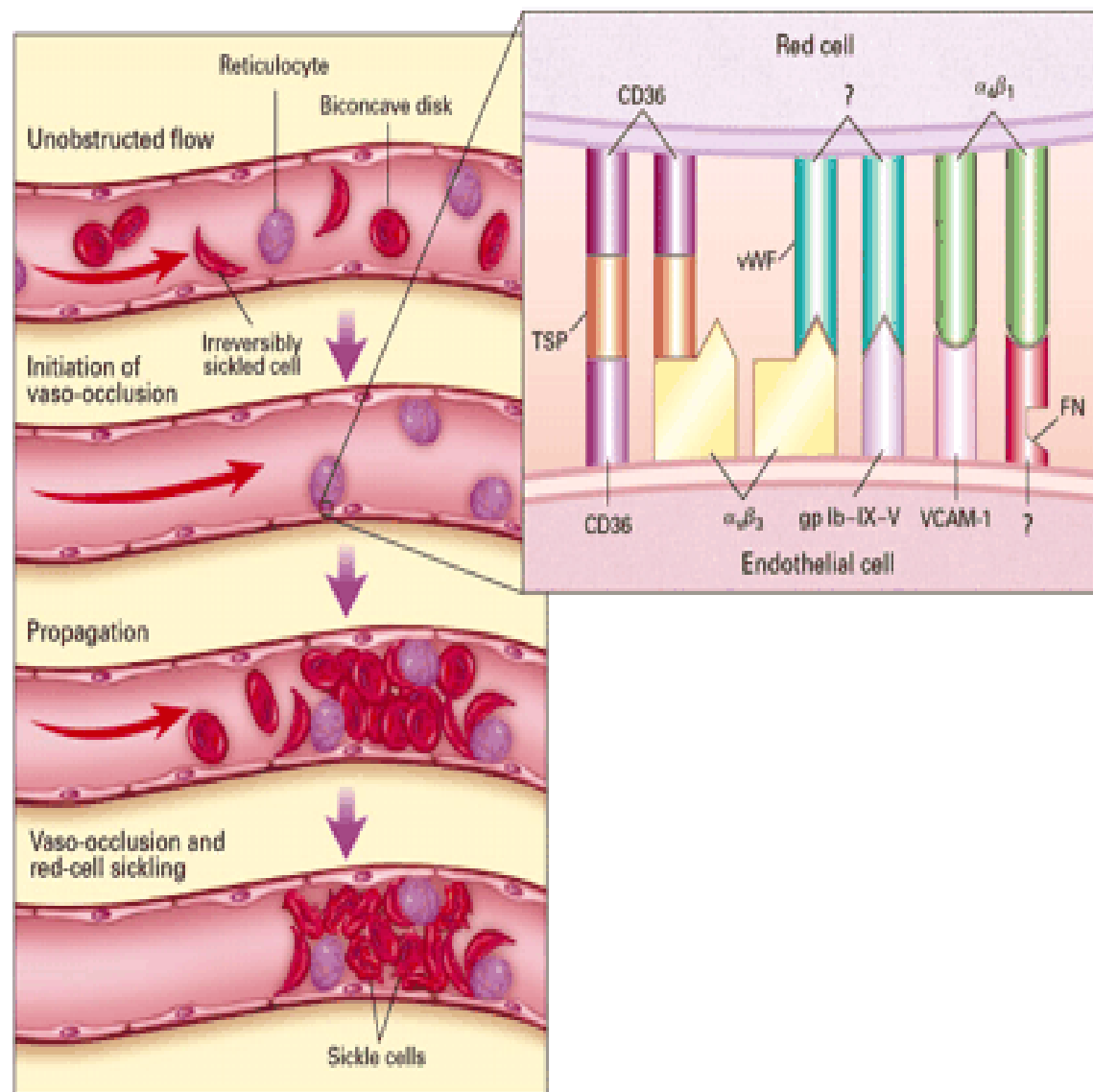
GLOSARIO DE TÉRMINOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ben	Benin
Cam	Camerún
CAM	Moléculas de adhesión celular
CAR	República Centroafricana
CAT	Catalasa
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
CVO	Crisis vasooclusivas
C10	Decilglicerol
C12	Dodecilglicerol
DO	Densidad óptica
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
EIE	Enfoque Isoeléctrico
ERO	Especie reactiva de oxígeno
FNT α	Factor de necrosis tumoral alfa
Glu-6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GSH	Glutation reducido
GSH-Px	Glutation peroxidasa
Hb	Hemoglobina
%H	Porcentaje de hemólisis
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HU	Hidroxiurea
IC	Intercambio catiónico
IL-1 β	Interleucina 1 beta
MDA	Malonildialdehído
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MO	Microscopía Óptica
NH _{2t}	Grupo amino terminal
NF- κ B	Factor de transcripción NF kappa B
NO	Óxido nítrico
NOSi	Óxido nítrico sintasa inducible
4-NQO	1-óxido-4-nitroquinolina

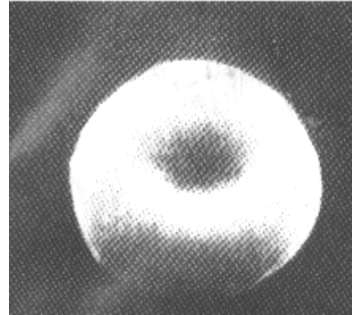
O ₂	Oxígeno
O ₂ ^{-·}	Radical anión superóxido
·OH	Radical hidroxilo
PE	Fosfatidil etanolamina
PC	Fosfatidil colina
pI	Punto isoeléctrico
pO ₂	Presión parcial de oxígeno
PS	Fosfatidil serina
RM- ¹ H	Resonancia Magnética Protónica
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Sen	Senegal
SOD	Superóxido dismutasa
SUMA	Sistema ultraanalítico
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
T2	Tiempo de relajación magnética espín-espín
td	Tiempo de demora
TMO	Transplante de médula ósea
TR	Tiempo de retención
TSP	Trombospondina
%Vtd	Porcentaje de variación del tiempo de demora
VCAM-1	Molécula 1 de adhesión celular vascular
VCM	Volumen corpuscular medio
VO	Vasooclusión
vWF	Factor von Willebrand
XO	Xantina oxidasa

ANEXOS

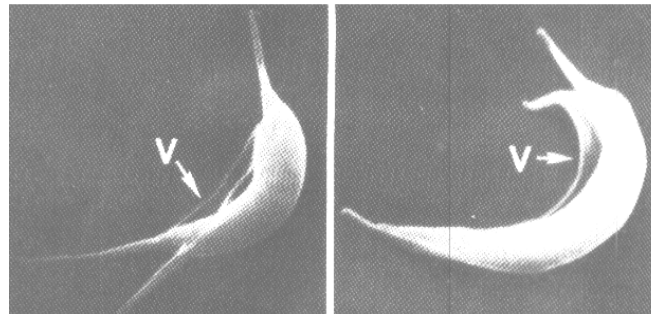
Anexo I. Mecanismos de adhesión celular, entre los reticulocitos SS y las células endoteliales activadas, involucrados en los fenómenos vasooclusivos en enfermos con drepanocitemia (Hebbel, 1997).⁷⁵



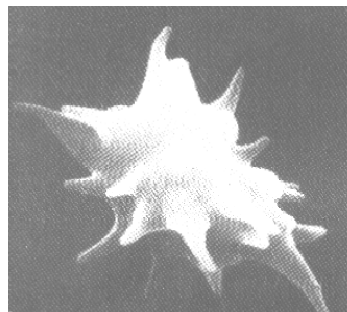
Anexo II. Formas asumidas por los eritrocitos SS como consecuencia de la velocidad de desoxigenación y la concentración intracelular de la HbS (Rodgers, 1994).⁴⁷



Eritrocito oxigenado



Drepanocito o célula en forma de hoz



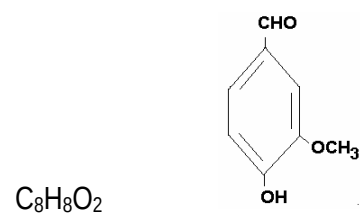
Equinocito

Anexo III. Fórmula molecular, estructural y nomenclatura aprobada para la vainillina y los 1-O-
alquilglicerol.¹⁶

Nombre trivial: vainillina

IUPAC (nomenclatura sistemática): 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído

Enciclopedia farmacéutica: aldehído metil protocatéquico, éster monometílico del aldehído
protocatéquico.



Masa molar: 152,15 g/mol

Grupo carbonilo: C=O

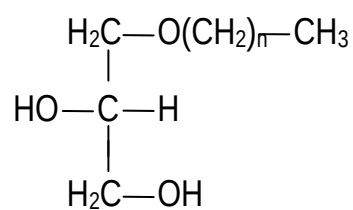
Grupo formilo: HC=O

Grupo funcional: compuesto carbonilo, aldehído (alcohol deshidrogenado).

Grupo enlazado al formilo: compuesto aromático.

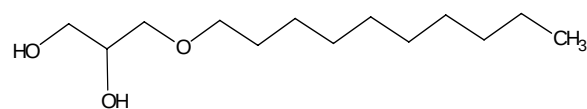
Por una de las rutas de síntesis empleadas en su producción es considerado un derivado aldehídico de
los fenoles polihídricos.

1-O-alquilglicerol: éter de glicerolípido (una función éter alquilo como resultado de la eterificación de un
alcohol graso de cadena larga, en la posición 1 del glicerol).



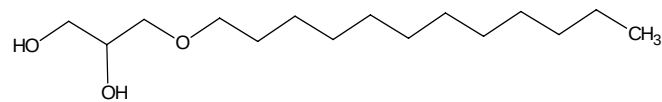
1-O-decilglicerol (n= 9)

Masa molar: 232 g/mol

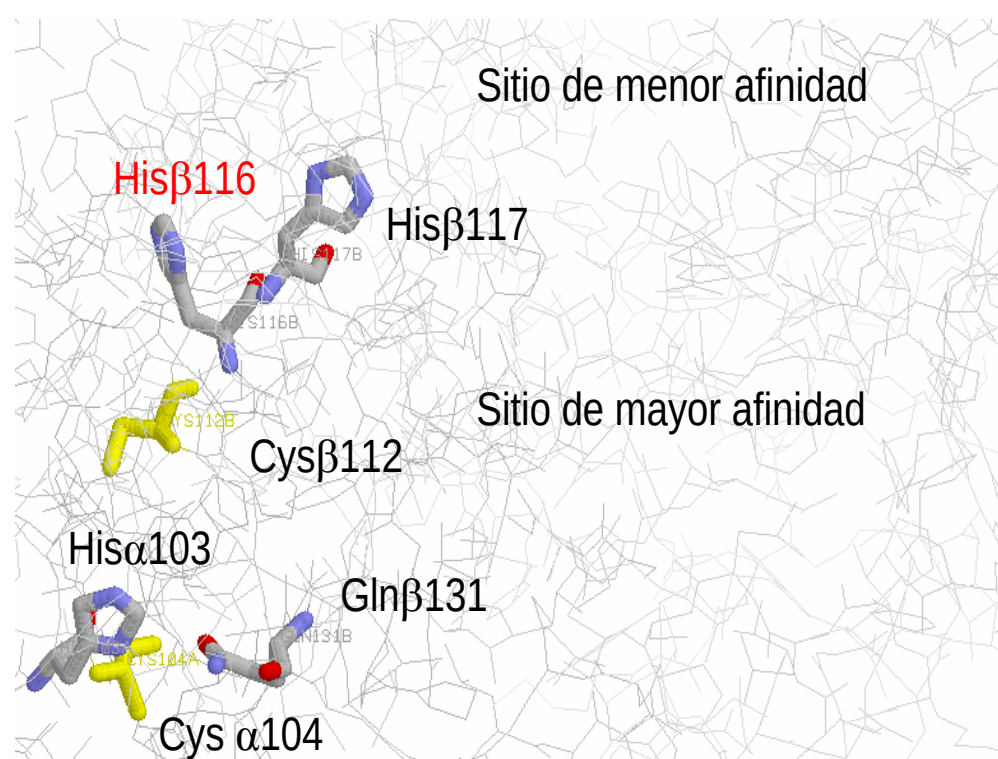


1-O-dodecilglicerol (n= 11)

Masa molar: 260 g/mol



Anexo IV. Sitios de mayor y menor afinidad en la interacción de la vainillina con la Hb mostrado por cristalografía de R-X (Abraham, 1990).²³



Anexo V. Consentimiento informado.

Yo, _____ ejerciendo mi libre poder de elección, por este medio, doy mi consentimiento para participar en el estudio sobre evaluación de compuestos con actividad antidrepanocitaria, comprometiéndome a asistir al laboratorio de hematología para la extracción de sangre.

He leído y comprendido la Hoja de Información que me ha sido entregada, donde se me explica los objetivos de la investigación y los beneficios potenciales de los compuestos en estudio.

He podido hacer todas las preguntas que me preocupaban sobre el estudio.

He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

Comprendo que mi participación en el estudio es voluntaria y que se respetará la confidencialidad referente a mi persona.

Comprendo y tengo el derecho a retirarme del estudio:

- Cuando yo lo desee.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Para otorgar este consentimiento, he recibido una amplia explicación de _____, quien me ha informado la metodología del estudio y las características del medicamento.

Y para expresar libremente mi conformidad de participar en el estudio firmo este Modelo.

Firma del Paciente: _____

Fechado por el paciente: |__|/|__|/|__| (Día/Mes/Año)

Firma del Investigador Responsable: _____

Fechado por el Investigador Responsable: |__|/|__|/|__| (Día/Mes/Año)