

ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIDREPANOCÍTICA DE LA O-VAINILLINA EN ERITROCITOS HUMANOS

Lic. Yamisleydi Alonso-Moreno¹, Lic. Yamirka Alonso-Geli¹, M.Sc. Silena Herold², 

Lic. Pedro Marrero-Fernández², Dr. Adolfo Fernández-García²

alonso1975@yahoo.es, yamisleydi.alonso@cbiomed.cu

¹Centro de Biofísica Medica, Universidad de Oriente, Cuba, ²Facultad de Matemática y Computación, Universidad de Oriente, Cuba

● Resumen

La anemia drepanocítica (AD) constituye un problema de salud mundial, y en Cuba afecta al 3,1 % de la población. Las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad se basan en la forma y propiedades físicas del eritrocito SS. En la búsqueda de tratamientos mundialmente aceptados, se ha estudiado una serie de aldehídos aromáticos con actividad antipolimerizante. Se presenta un estudio en el cual, a través de la prueba directa de falciformación al microscopio óptico y el empleo de un sistema de análisis de imágenes, se determina el efecto de la o-vainillina en la morfología de los eritrocitos SS a dos relaciones molares, mediante la observación y cuantificación de las variaciones morfológicas de los mismos. Se verificó que la o-vainillina inhibe la formación de drepanocitos a las dos relaciones molares analizadas; al incubar 24 horas los glóbulos con o-vainillina a ambas relaciones, aumenta el por ciento de glóbulos rojos normales respecto al control, y disminuyen los por cientos en forma de equinocitos y drepanocitos.

Palabras clave: anemia drepanocítica, o-vainillina, prueba de falciformación.

● Abstract

The sickle cell disease is a global health problem, in Cuba affects 3,1 % of the population. The main clinical manifestations of this disease are based on the shape and physical properties of SS erythrocytes. In the search for treatments globally accepted has been studied a series of aromatic aldehydes with antipolymerizing activity. We present a study in which through direct evidence of sickling under an optical microscope and using an image analysis system, determine the effect of o-vanillin in the morphology of SS erythrocytes for to two molar ratios, through observation and quantification of morphological variations. It was verified that o-vanillin inhibits the formation of sickle cells at 2 molar ratios, by incubating the cells 24 hours with o-vanillin both molar ratios increases the percentage of normal red blood cells compared to control and reduce the percentages as echinocytes and sickle cell.

Key words: sickle cell disease, o-vanillin, direct evidence of sickling.

● Introducción

La (AD), o hemoglobinopatía SS, constituye un problema de salud pública a escala global. En Cuba afecta al 3,1 % de la población, y se distribuye principalmente en Ciudad de La Habana, Santiago de Cuba y Guantánamo; en Estados Unidos al 10 % de la población y a más del 40 % en algunas poblaciones del continente africano /1, 2/.

Esta enfermedad está determinada por una alteración en la cadena α de la hemoglobina (Hb). El gen mutante autosómico produce el cambio de ácido glutámico por valina, lo que conlleva a que cambien las propiedades físicas de la hemoglobina S (HbS) y polimerice en condiciones de desoxigenación, produciendo cambios fisicoquímicos y biológicos en las membranas /3/, deformación de los glóbulos rojos, cambios de la permeabilidad y elasticidad y

modificaciones en la reología de la sangre, que producen múltiples procesos patológicos en el organismo /4/.

Las principales manifestaciones fisiopatológicas de la enfermedad se basan en la forma y propiedades físicas del eritrocito SS, que a su vez están directamente relacionadas con la membrana celular /3/ de ahí la importancia de estudiar la relación de compuestos antipolimerizantes con los cambios de formas de los eritocitos en condiciones de desoxigenación espontánea.

Estudios previos han evaluado la actividad antipolimerizante de una serie de aldehídos aromáticos, y se estableció el siguiente orden en reactividad: isovainillina \approx o-vainillina > 3-hidroxibenzaldehído > 4-hidroxibenzaldehído > vainillina /5/.

En este trabajo se propone el estudio del efecto de la o-vainillina en los cambios morfológicos del glóbulo rojo drepanocítico. Este compuesto presenta baja actividad hemolítica sobre hematíes SS y normales /6/, y se ha comprobado su baja toxicidad según el test de clasificación toxicológica de la OECD (Organización para el Desarrollo y cooperación Económica) /7/.

Para la evaluación morfológica de los eritrocitos se emplea un sistema de análisis de imágenes asistido por computadora /8/, que permite obtener, con un 90 % de efectividad, una clasificación de los eritrocitos en normales, drepanocitos o con otras deformaciones, y contribuye a minimizar el alto costo de tiempo y personal capacitado para realizar el trabajo.

Materiales y métodos

Preparación de las muestras

Las muestras de sangre total heparinizada fueron obtenidas por venipunción de la vena antecubital de pacientes adultos con hemoglobinopatía SS, que reciben tratamiento periódico en el Hospital General "Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso" de Santiago de Cuba, previo consentimiento informado de los mismos.

Los pacientes incluidos en el estudio, no mostraban signos de crisis vasooclusivas, ni recibieron transfusiones de sangre en los tres meses precedentes.

Para minimizar la deformación de los glóbulos, la sangre se extrajo después de liberar el torniquete.

Las muestras se centrifugaron a 3 000 r.p.m durante 5 min; el precipitado celular se sometió a tres lavados consecutivos con solución amortiguadora PBS con pH 7,4, para obtener un concentrado de eritrocitos, al que se le determinó la concentración de Hb según el método de la cianometahemoglobina /9/.

Prueba de falciformación

Se mezclaron 200 μ L de solución de glóbulos lavados al 25 % con 20 μ L de una solución hidroalcohólica de o-vainillina, a las relaciones molares 1:4, 1:8.

Se depositaron 10 μ L de la muestra en un portaobjetos, se cubrió y selló con parafina, y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 24 h para lograr condiciones anoxigénicas espontáneas.

Se empleó en cada caso un grupo control (solución de eritrocitos sin o-vainillina) y un grupo experimental (solución de eritrocitos con o-vainillina).

Análisis morfológico

Se tomaron microfotografías de las muestras y controles de la prueba de falciformación observadas bajo un microscopio Nikon (100 X), empleando una cámara Kodak (10,2 megapíxel), las que fueron examinadas mediante el sistema de análisis de imágenes asistido por computadora.

Este sistema determina el porcentaje de células SS con diferentes morfologías a través de la medición del área, perímetro y relación entre ejes corto y largo de cada célula, además de obtener el Factor de Forma Circular (CSF) y Factor de Forma Elíptico (ESF).

EL CSF representa la desviación respecto a la forma circular, y el ESF expresa la magnitud de la elongación. Si la célula es perfectamente circular, ambos valores serán 1,0. Mientras menores sean los valores de CSF y ESF, mayor será la desviación respecto al círculo perfecto.

El sistema permite una medición rápida y precisa de los factores de forma de muchas células, y

representa los patrones morfológicos como gráficas de dispersión donde cada punto corresponde a una célula. Las células con valores de $ESF < 0,5$ fueron consideradas drepanocitos. Las células con valores de $CSF < 0,8$ y $ESF > 0,5$ fueron consideradas equinocitos, y las células con valores de $CSF > 0,8$ y $ESF > 0,5$ fueron consideradas normales (glóbulo rojo normal). En cada muestra son medidas más de 200 células para calcular los factores de forma.

En la figura 1 se muestra la representación esquemática de los resultados de CSF-ESF. Los puntos en la zona superior derecha corresponden a la presencia de eritrocitos normales, en la superior izquierda a equinocitos y los puntos en la zona inferior izquierda corresponden a la presencia de drepanocitos.

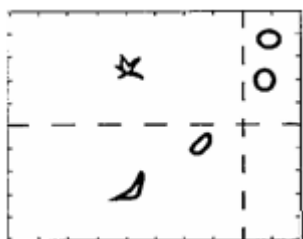


Fig. 1 Representación esquemática de las variaciones morfológicas.

● Resultados y discusión

Los glóbulos rojos de pacientes con AD pueden observarse comúnmente en forma de equinocitos, drepanocitos y discocitos (glóbulos rojos normales). Los drepanocitos se caracterizan por tener contornos puntiagudos y los equinocitos por prolongaciones distribuidas regularmente en su superficie, razón por lo que también se denominan células en erizo o crenocitos /10/. El sistema de análisis de imágenes empleado logra discriminar las diferencias morfológicas con un 90 % de efectividad.

La figura 2 muestra microfotografías de glóbulos rojos en una de las muestras tratadas (a) y uno de los controles (b). Pueden observarse las variaciones morfológicas que se presentan en los eritrocitos: forma de discocitos o normales, equinocitos y drepanocitos. En el grupo control se observó mayor cantidad de drepanocitos que en el experimental.

En la figura 3 se muestra un ejemplo para una de las muestras valoradas de la relación entre los valores

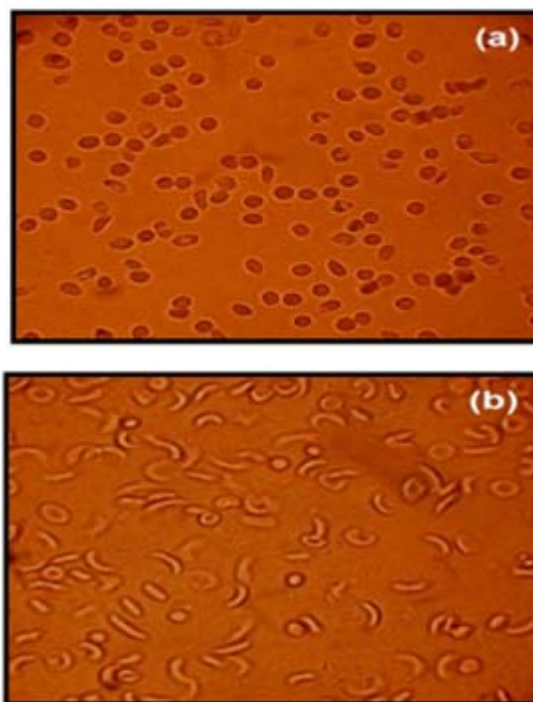


Fig. 2 Microfotografías tomadas a un grupo tratado con o-vainillina (a) y a un grupo control (b) a las 24 h de incubación.

de CSF/ESF para las células SS de los controles (A) y las muestras a la relación molar hemoglobina: o-vainillina de 1:4 (B).

Tras la incubación con o-vainillina el número de drepanocitos o células falciformes disminuyó, demostrándose por la disminución de los puntos en la zona inferior izquierda según el análisis cuantitativo revelado por el sistema de análisis de imágenes.

Tras la incubación con o-vainillina, el número de drepanocitos o células falciformes disminuyó, demostrándose por la disminución de los puntos en la zona inferior izquierda según el análisis cuantitativo revelado por el sistema de análisis de imágenes.

En la figura 4 se observa el comportamiento de los diferentes tipos de células muestras control y en muestras incubadas con o-vainillina a la relación molar hemoglobina compuesto de 1:4. En el caso de la muestra con o-vainillina, se observó un 24 % más de glóbulos rojos con forma discoidal que respecto al control, así como se observa una disminución de las células en forma de equinocitos y drepanocitos en un 13 y 12 %, respectivamente.

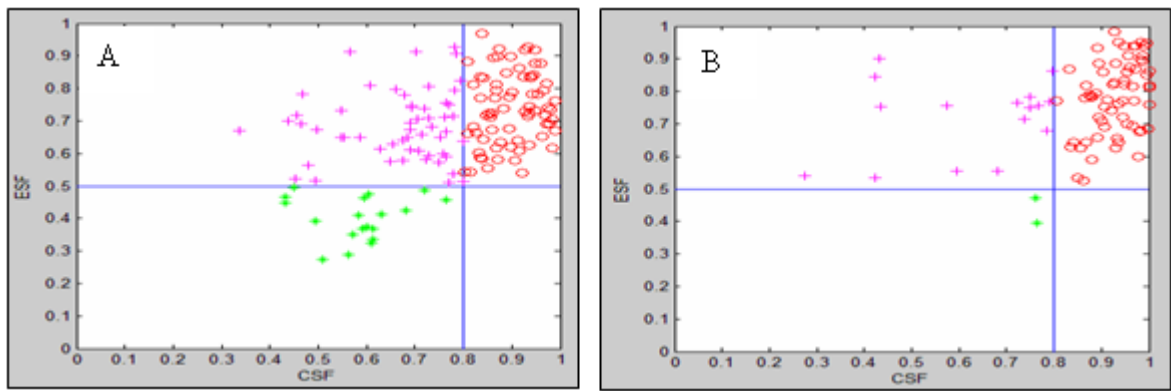


Fig. 3 Relación CSF/ESF para las células SS observadas a las 24 h de incubación, según el sistema de análisis de imágenes. (A) grupo control y (B) muestra.

La o-vainillina reacciona con los grupos amino libres de la Hb intracelular para formar la base de Schiff, e incrementa la afinidad de la Hb por el oxígeno/11/, modificando la curva de disociación de oxígeno. Por otra parte, este complejo reduce la pérdida de K⁺ y H₂O, por lo que disminuye la contracción celular/12/. Se puede interpretar entonces

que los cambios morfológicos observados son producidos por la o-vainillina como resultado de la unión con la Hb, con lo cual puede propiciar la recuperación de la elasticidad y la disminución de la fragilidad mecánica de los eritrocitos, y por tanto, mejorar las manifestaciones clínicas que se presentan en la enfermedad, y con ello la calidad de vida de estos pacientes.

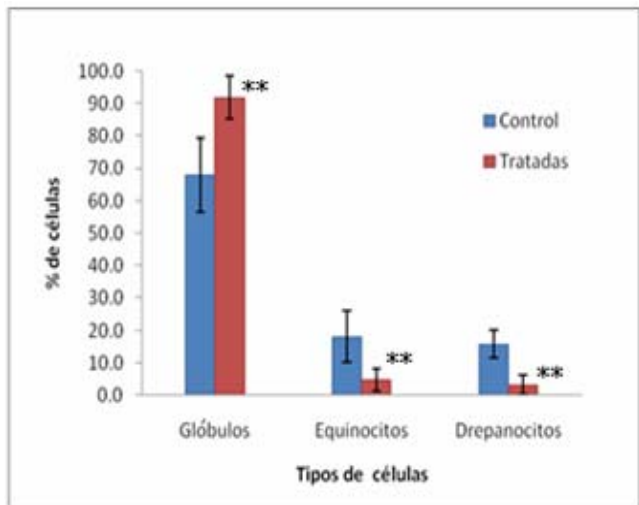


Fig. 4 Por cientos de tipos de células en muestra incubadas con o-vainillina a relación molar 1:4. (**) representa diferencias estadísticamente significativas para un $\alpha=0,01$.

En la figura 5 se muestra un ejemplo para una de las muestras valoradas de la relación entre los valores de CSF/ESF para las células SS del control (C) y la muestra a la relación molar hemoglobina: o-vainillina de 1:8 (D). Tras la incubación con o-vainillina, al igual

que en la molar hemoglobina:o-vainillina de 1:4, el número de drepanocitos o células falciformes disminuyó, demostrándose por la disminución de los puntos en la zona inferior izquierda según el análisis cuantitativo mostrado por el sistema de análisis de imágenes.

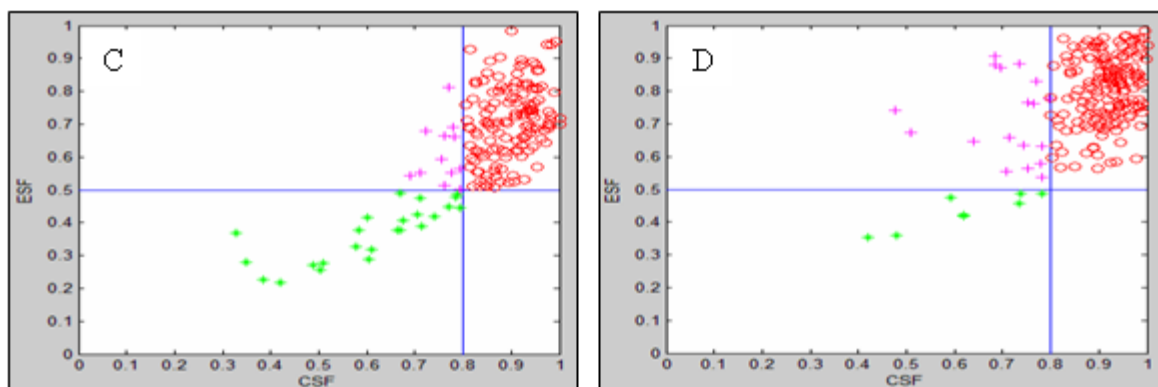


Fig. 5 Relación CSF/ESF para las células SS observadas a las 24 h de incubación, según el sistema de análisis de imágenes. (C) grupo control y (D) muestra.

Al incubar las muestras con o-vainillina a la relación molar hemoglobina compuesto de 1:8, se observa (figura 6) un efecto similar que con 1:4; aumentan los glóbulos normales en la muestra respecto al control en un 25 %, y disminuyen las células en

forma de equinocitos y drepanocitos en un 18 y 7 %, respectivamente. En todos los casos, existen diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0,01$) entre el por ciento de células de cada morfología en las muestras respecto a los controles.

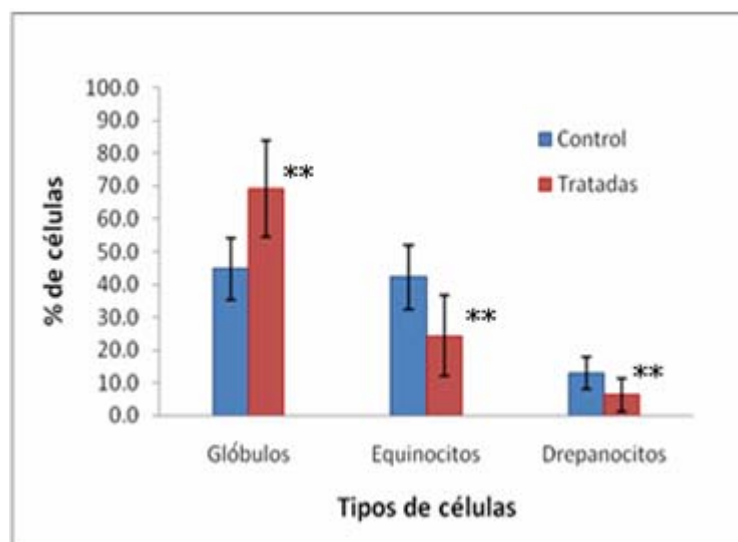


Fig. 6 Por cientos de tipos en muestras incubadas con o-vainillina a reacción molar 1:8. (**) representa diferencias estadísticamente significativas para un $\alpha=0,01$.

La inhibición o retardo de la velocidad de la falciformación está relacionada con el bloqueo de la polimerización de la HbS por acción directa con la hemoglobina, inhibiendo la transformación de los glóbulos rojos hacia la forma de drepanocito. Puede estar relacionada también con la disfuncionalidad de la membrana lipídica, en la drepanocitosis hay una pérdida de la asimetría de la membrana con

exposición de aminofosfolípidos (fosfatidilserina) en la superficie /4/.

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.

Para que un compuesto inhiba la falciformación de los eritrocitos el porcentaje de drepanocitos, debe disminuir con relación a la muestra control /10/.

En este trabajo se concluye que la o-vainillina presenta actividad antidrepanocítica evaluada a través de la prueba directa de falciformación por microscopía óptica y el empleo de un sistema de procesamiento de imágenes asistido por computadora.

En las muestras con o-vainillina se observó un mayor porcentaje de glóbulos rojos con forma discoidal respecto al control, así como una disminución de las células en forma de equinocitos y drepanocitos.



Bibliografía

1. ESPINOSA, E.; E. SVARCH, G. MARTÍNEZ. "La Anemia Drepanocítica en Cuba. Experiencia de 30 años." *Revista Cubana Hematol Inmunol Hemos* 1996;12 (2):97-105.
2. CANTALEJOLÓPEZ, M. A. "Protocolo de anemia de células falciformes o drepanocitosis." *Bol. S Vasco-Nav Pediatr. Artículo Especial* 2005;38(1):20-38.
3. FALCÓN DIEGUEZ J. E.; P. RODI; Manuel A. LORES-GUEVARA; Ana María GENNARO. "Evaluación de la interacción hemoglobina-membrana durante la polimerización de la hemoglobina S." *Bioquímica* 2009; 34(1):13-20.
4. SVARCH, Eva. "Fisiopatología de la drepanocitosis." *Revista Cubana Hematol. Inmunol. Hemot.* 2009;25(1).
5. BEDDELL, C. R.; G. KNEEN, R. D. WHITE. "The Antisickling Activity of a Series of Aromatic Aldehydes." *Br J Pharmacol.* 1979;66:70.
6. ALONSO GELI, Y.; G. DEL TORO GARCÍA, J. E. FALCÓN DIEGUEZ; Y. VALDÉS RODRÍGUEZ. "Actividad hemolítica de la o-vainillina y la isovainillina sobre eritrocitos humanos." *Revista Cubana de Farmacia.* 2005; 39 (1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000100004&lng=es&nrm=iso
7. Y. ALONSO MORENO; Y. TRAPERO QUINTANA; M. GUERRA SARDIÑAS. "Toxicidad aguda oral de la o-vainillina." *Revista Cubana Farm.* 2008;42(1). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol42_1_08/far06108.htm
8. ESCOBEDO, Miriela. *Conteo automatizado de eritrocitos en muestras de sangre. VIII Congreso Internacional de Informática en la Salud. Memorias de Informática 2011. Cuba. Febrero 2011. ISBN: 978-959-16-1287-8.*
9. FERNÁNDEZ, A.; J. E. FALCÓN; G. DEL TORO, A. R. POZO. "Caracterización de los buffer fosfatos utilizados en la preparación de solución de hemoglobina (Hb) a pH controlado." *Revista Cubana de Química.* 2001;13(3): 87-96.
10. COLOMBO, B.; E. GUERCHICOFF, G. MARTÍNEZ. *Genética y clínica de las hemoglobinas humanas.* 1a ed. Habana. Editorial Pueblo y Educación, 1993.
11. ZAUGG, R. M.; J. A. WALDER; I. M. KLOTZ. "Schiff Base Adducts of Hemoglobin." *J. Biol. Chem.* 1977;252:8542-8548.
12. ABRAHAM, D. J. *et al.* Vanillin, a Potential Agent for the Treatment of Sickle Cell Anemia, *Blood* 1991;77:1334-1341.