

Centro de Biofísica Médica. Universidad de Oriente  
Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana

## Actividad hemolítica de la ortovainillina y la isovainillina sobre eritrocitos humanos

Yamirka Alonso Geli,<sup>1</sup> Grisel del Toro García,<sup>2</sup> José E. Falcón Dieguez,<sup>3</sup> Yolanda C. Valdés Rodríguez<sup>4</sup>

### Resumen

Los eritrocitos portadores de hemoglobina S ( $\beta^6 \text{glu} \rightarrow \text{val}$ ), son menos flexibles que los eritrocitos normales, lo que los hace más frágiles y se hemolizan con mayor facilidad. La ortovainillina y la isovainillina, isómeros químicos de la vainillina, pueden inhibir la polimerización de la desoxihemoglobina S (actividad antipolimerizante) y evitar la falciformación de los eritrocitos. Se determinó la actividad citotóxica de estos compuestos sobre eritrocitos normales y SS, a razones molares 1:1, 1:4, 1:8 y 1:10, por espectrofotometría midiendo la absorbancia a una longitud de onda  $\lambda=545 \text{ nm}$  de la hemoglobina libre en el sobrenadante, después de incubar la solución de eritrocitos con los compuestos, y se determinó el porcentaje de hemólisis. Los resultados muestran que el porcentaje de hemólisis promedio calculado fue inferior al 1 %. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias por razón molar en una misma clase de eritrocitos ( $p=0,05$ ) ni una dependencia entre la concentración y la actividad hemolítica. Se compararon las medias entre ambos tipos de eritrocitos, para todas las relaciones molares, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Se compararon, además, los resultados de trabajos anteriores sobre la actividad hemolítica de la vainillina con la de sus isómeros estructurales, y se obtuvo que la isovainillina y la ortovainillina provocaron porcentajes de hemólisis inferiores a los provocados por la vainillina. La baja actividad hemolítica de estos aldehídos aromáticos potencia su actividad antipolimerizante.

**Palabras clave:** Actividad hemolítica, eritrocitos SS, hemoglobina S, isovainillina, ortovainillina.

La hemoglobinopatía SS o drepanocitemia afecta al 3,1 % de la población cubana distribuida fundamentalmente en Ciudad de La Habana, Santiago de Cuba y Guantánamo. La presencia en sangre periférica de numerosos eritrocitos semilunares o drepanocitos es la causa de las manifestaciones hematológicas y clínicas de la enfermedad, donde su destrucción o hemólisis ocasiona hipoxia tisular. El evento fisiopatológico primario de la enfermedad es la polimerización de la desoxihemoglobina S,<sup>1,2</sup> por lo que en la búsqueda de un tratamiento efectivo se evalúan compuestos que inhiban la polimerización sin agravar la enfermedad.

Estudios previos demostraron la actividad antipolimerizante de algunos aldehídos aromáticos entre los

que se encontraban la vainillina y sus isómeros, la isovainillina y la ortovainillina que por ser aldehídos aromáticos de estructura sencilla que pueden atravesar con facilidad la membrana eritrocitaria y reaccionar con la hemoglobina (Hb) intracelular para ejercer su acción antipolimerizante.<sup>3,4</sup> Por adición nucleofílica, estos compuestos reaccionan covalentemente con la Hb intracelular, formando una base *schiff* que inhibe los sitios de contacto intermoleculares en el polímero de dHbS.<sup>3-7</sup>

Los aldehídos aromáticos constituyen un grupo relativamente reactivo de compuestos orgánicos caracterizados por la presencia del doble enlace carbono oxígeno; al menos 300 de ellos han sido identificados en más de 300 alimentos diferentes o componentes alimenticios; en el caso de la ortovainillina hay de señalar que es un compuesto que no aparece naturalmente.<sup>8</sup>

La electroforesis y la oximetría mostraron que la ortovainillina es muy activa, a una concentración 5 mM provoca el 55 % de Hb modificada (Hb<sub>mod</sub>), a 3 mM desvía la curva de equilibrio del O<sub>2</sub> hacia la izquierda con el 75 % de cambio de la presión parcial de oxígeno ( $\Delta P_{50}$ ), incrementando la afinidad de la Hb por el O<sub>2</sub>. La isovainillina se mostró activa (30 % Hb<sub>mod</sub> 5 mM; 35 % cambio  $\Delta P_{50}$  3 mM), diferenciándose de la moderada actividad de la vainillina (50 % Hb<sub>mod</sub> 5 mM; 30 % cambio  $\Delta P_{50}$  3 mM).<sup>3</sup> Los efectos tóxicos de estos compuestos han sido estudiados mediante pruebas de mutagénesis que mostraron su actuación como bioantimutágenos, aunque con una actividad menos fuerte que la vainillina.<sup>9,10</sup> Sin embargo, hasta la fecha no se había evaluado su probable efecto citotóxico sobre los eritrocitos, aspecto de suma importancia por cuanto estas células constituyen su blanco de acción farmacológica. Atendiendo a estos criterios y a la anemia hemolítica crónica que caracteriza la enfermedad, se impuso determinar mediante estudios espectrofotométricos *in vitro*, la actividad hemolítica de la ortovainillina y la isovainillina (según el método de Stanley, 1985).<sup>11</sup>

## Métodos

### Reactivos

Etanol (ALFA AESAR); heparina sódica (SIGMA); NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Panreac); isovainillina (3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído) y o-vainillina (2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) (ALDRICH); soluciones Drabkin (Imefa).

Para evaluar la actividad hemolítica de los compuestos descartando la influencia de las propiedades intrínsecas de los eritrocitos SS, se realizaron todas las pruebas simultáneamente en eritrocitos normales. Las muestras de sangre procedentes de pacientes con hemoglobinopatía SS y de donantes voluntarios normales fueron tomadas en el Laboratorio Clínico del Hospital General Santiago, Santiago de Cuba.

### Equipamiento

Centrifuga Tehtnica LC-320c, balanza electrónica ER-182A, espectrofotómetro ULTROSPEC III y monitor de pH Pharmacia LKB.

## Preparación de las muestras

A partir de soluciones hidroalcohólicas (10 % v/v) de los compuestos se obtuvieron las relaciones molares hemoglobina:compuesto (1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:8, 1:10).<sup>7</sup> Para el lavado de las células y la preparación de las soluciones se utilizó el tampón PBS a pH 7,4. La sangre total heparinizada se centrifugó a 3 000 r.p.m, durante 10 min.; el precipitado celular fue sometido a 3 lavados consecutivos con PBS pH=7,4 para obtener el concentrado de eritrocitos lavados y se calculó la concentración de hemoglobina espectrofotométricamente por el método de la cianometahemoglobina.<sup>12,13</sup>

## Determinación de la actividad hemolítica

Para la determinación de la actividad hemolítica se partió del concentrado de eritrocitos lavados, tanto de eritrocitos SS como normales, y se estudiaron las razones molares de los compuestos (isovainillina y ortovainillina) 1:1, 1:4, 1:8, 1:10. Como control positivo se utilizó una solución 0,1 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y como control negativo PBS pH 7,4 al que se añadió la solución vehículo (solución hidroalcohólica al 0,1 % en que se disolvieron los compuestos).<sup>11</sup>

Se tomó 1 mL del concentrado de eritrocitos y se resuspendió en 10 mL de PBS pH=7,4. Para la evaluación de los compuestos se utilizaron 0,2 mL de solución de eritrocitos a los que se le adicionaron 10 µL de la solución de cada compuesto y se enrazó a 10 mL con PBS. El control positivo se evaluó tomando 0,2 mL de la solución de eritrocitos y completando al volumen de 10 mL con NaCO<sub>3</sub> al 0,1 %. Para el control negativo se tomaron 0,2 mL de solución de eritrocitos, se les adicionaron 10 µL del vehículo<sup>13,14</sup> y se completó el volumen con PBS. En cada ensayo se realizaron 2 réplicas de cada relación molar y de cada lectura.

Una vez añadido el compuesto se mezclaron cuidadosamente las muestras y se dejaron reposar 30 min, posteriormente se centrifugaron y se tomó el sobrenadante.

La actividad hemolítica se evaluó en el sobrenadante midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda  $\lambda=545$  nm. Se calculó el porcentaje de Hb liberada o porcentaje de hemólisis (%H) a partir del valor medio de las mediciones de la absorbancia por réplica para cada una de las concentraciones de trabajo:

$$\%H = \frac{DO_M - DO_{CN}}{DO_{CP} - DO_{CN}} \cdot 100$$

donde:

DO = densidad óptica, M = muestra, CN = control negativo, CP = control positivo.

Los valores obtenidos se graficaron en Microsoft Excel 97, se obtuvieron las curvas de actividad

hemolítica por razón molar y la curva promedio para cada prueba. Se compararon las medias (Statgraphics Plus 2.1) con la prueba de rangos múltiples y el análisis de varianza simple (ANOVA) para el 95 % de confiabilidad.

## Resultados

### Determinación de la actividad hemolítica de la isovainillina

Al medir el efecto citotóxico de la isovainillina sobre eritrocitos SS y normales, se obtuvo que para todas las relaciones molares estudiadas el %H calculado no excedía el 1 %, como puede observarse en la figura 1. El cálculo se realizó a partir del valor medio de las mediciones de absorbancia de las réplicas. En las pruebas realizadas sobre eritrocitos SS el máximo valor de %H calculado, 1,1%, se obtuvo para la relación molar 1:10. Se realizaron los correspondientes análisis estadísticos y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las 4 relaciones molares ensayadas para el 95 % de confiabilidad.

Todas las curvas mostraron un comportamiento similar en el rango de valores inferiores al 1 % para ambos tipos de células.

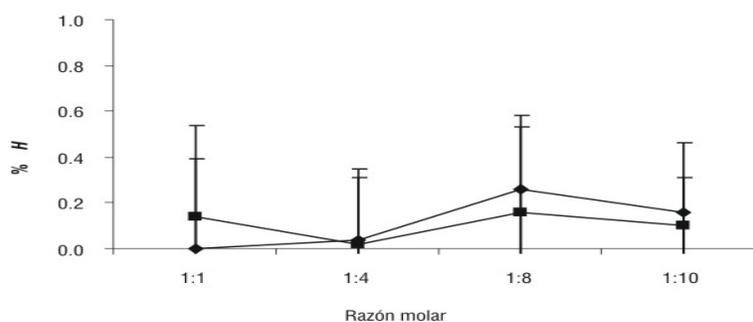


FIG. 1. Relación entre el %H y la razón molar Hb: compuesto para la isovainillina en eritrocitos de pacientes drepanocíticos e individuos no drepanocíticos.

### Determinación de la actividad hemolítica de la ortovainillina

Resultados similares a los mostrados anteriormente para isovainillina fueron obtenidos al determinar la actividad hemolítica de la ortovainillina en eritrocitos de pacientes drepanocíticos e individuos no drepanocíticos.

Como puede observarse en la figura 2, el % H obtenido es inferior al 1 % y no existe una influencia del incremento de la concentración de ortovainillina en la actividad hemolítica.

Al comparar las medias entre ambos compuestos no existieron diferencias estadísticamente significativas para las distintas relaciones molares al realizar la prueba de rangos múltiples. En ningún caso se observó diferencias estadísticamente significativas entre las medias para ambos tipos de

eritrocitos, con el 95 % de significación.

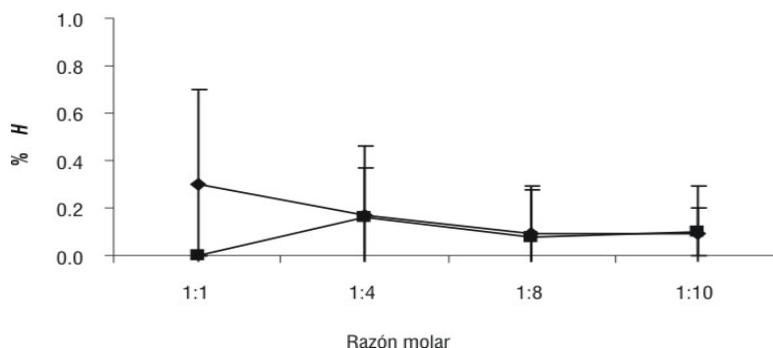


FIG. 2. Relación entre el %H y la razón molar Hb: compuesto para la ortovainillina en eritrocitos de pacientes drepanocíticos e individuos no drepanocíticos.

La vainillina es considerada un potente agente para el tratamiento de la enfermedad, por lo que resultó de nuestro interés comparar su actividad hemolítica con la de sus isómeros, para ello los %H por razón molar obtenidos para la isovainillina y la ortovainillina fueron comparados con los resultados obtenidos para la vainillina en estudios previos.<sup>13</sup> Como se muestra en la figura 3, la vainillina desarrolló sobre los eritrocitos una actividad hemolítica no significativa inferior al 3 %.

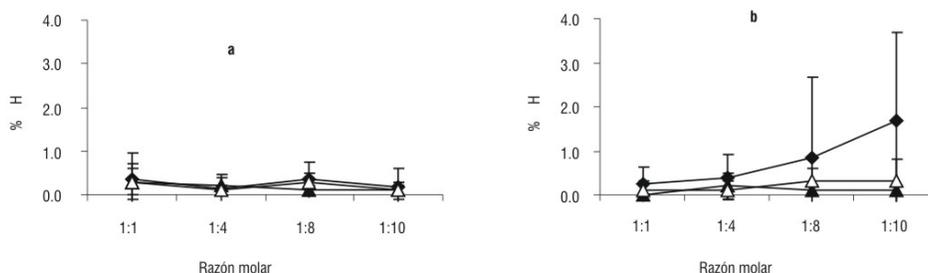


FIG. 3. Efecto hemolítico de la vainillina,<sup>21,22</sup> la ortovainillina y la isovainillina sobre los eritrocitos no drepanocíticos (a) y drepanocíticos (b).

## Discusión

Una de las principales manifestaciones clínicas de la hemoglobinopatía SS es la anemia hemolítica crónica, por lo que hay que tener en cuenta que, compuestos que exacerben la hemólisis o modifiquen las propiedades reológicas de la sangre, tendrán una marcada incidencia negativa en la evolución de la enfermedad; estos factores han sido considerados al estudiar el efecto hemolítico de los compuestos con actividad antipolimerizante: isovainillina y ortovainillina.

Como muestran los resultados, con ambos compuestos los valores de %H obtenidos son inferiores al 10 %, valor máximo permisible para considerar que un compuesto con actividad biológica probada sea inocuo en este sentido, teniendo en cuenta que la hemólisis en los pacientes drepanocíticos puede alcanzar valores de hasta el 40 % por las características propias de la enfermedad.

Al incrementar la concentración de los compuestos no se observa un aumento significativo de la hemólisis, lo que demuestra que no existe una dependencia directa de estos factores; todas las curvas mostraron un comportamiento similar dentro de un rango de valores inferiores al 1 %. Al comparar los resultados obtenidos en eritrocitos de pacientes drepanocíticos e individuos no drepanocíticos, se obtuvieron resultados similares a pesar de que los eritrocitos SS son más frágiles y rígidos que los normales, por estar sometidos a cambios intracorporales que causan pérdida de su elasticidad,<sup>15,16</sup> lo que demuestra que el efecto de la isovainillina y la ortovainillina corresponde a una hemólisis basal.

Por otra parte, no se puede dejar de considerar que cada muestra posee características reológicas propias y que el cuadro clínico y hematológico en esta enfermedad varía de un paciente a otro, por lo que los cambios morfológicos, celulares y la resistencia a factores externos también son variables y dependientes de las características individuales,<sup>17</sup> factores estos que influyen en las variaciones observadas en los resultados para los diferentes pacientes.

La vainillina es considerada un potente agente para el tratamiento de la enfermedad, por lo que se comparó su actividad hemolítica, determinada en trabajos anteriores,<sup>13</sup> con la de sus isómeros estructurales, obteniéndose que la isovainillina y la ortovainillina provocaron %H inferiores a los provocados por la vainillina, que fue menor del 3 % (fig. 3).

Por los resultados obtenidos se sugiere la ausencia de efectos citotóxicos de estos agentes antipolimerizante sobre los eritrocitos, su blanco de acción farmacológica.

Teniendo en consideración las condiciones experimentales del estudio se puede concluir que la actividad hemolítica de la isovainillina y la ortovainillina, sobre los eritrocitos normales y los SS, no es significativa; no existe dependencia entre el %H y la concentración para ambos tipos de eritrocitos; y no se presentan diferencias significativas en el comportamiento de los eritrocitos SS y normales al ser tratados con ambos compuestos.

La baja actividad hemolítica de los aldehídos aromáticos, isovainillina y ortovainillina, sobre hemáties SS y normales, potencia la actividad antipolimerizante reportada para estos compuestos.

## **Agradecimientos**

Los autores agradecen al Laboratorio Clínico del Hospital General Santiago por su colaboración en el suministro de las muestras de sangre; al Departamento de Biofísica del Centro de Biofísica Médica por su aporte en la discusión y análisis de los resultados; al Departamento de Neurofísica del Centro de Neurociencias de Cuba y al diseñador gráfico Hubert Delestre por su colaboración.

## **Summary**

### **Haemolytic activity of orthovanillin and isovanillin on human erythrocytes**

The erythrocytes carriers of haemoglobin S ( $\beta^6 \text{glu} \rightarrow \text{val}$ ) are less flexible than the normal erythrocytes, which makes them more fragile and allow them to haemolyse easier. The orthovanillin and the isovanillin, chemical isomers of vanillin, may inhibit the polymerisation of desoxohaemoglobin S (antipolymerizing activity) and prevent the falciformation of erythrocytes. The cytotoxic activity of these compounds on normal erythrocytes and SS was determined at molar ratios 1:1, 1:4, 1:8 and 1:10 by spectrophotometry, measuring the absorbance at a wave longitude  $\lambda=545$  nm of the free haemoglobin in the supernatant, after incubating the solution of erythrocytes with the compounds. The percentage of haemolysis was determined and the results showed that the average percentage of haemolysis calculated was under 1 %. No statistically significant differences were found among the means for molar ratio in a same class of erythrocytes ( $p = 0,05$ ). There was not a dependence between the concentration and the haemolytic activity. The means between both types of erythrocytes were compared for all the molar ratios and there were no statistically significant differences. The results of previous papers on the haemolytic activity of vanillin were compared with that of its structural isomers, and it was observed that isovanillin and orthovanillin produced percentages of haemolysis lower than the ones caused by vanillin. The low haemolytic activity of these aromatic aldehydes potentiates their antipolymerizing activity.

**Key words:** Haemolytic activity, erythrocytes SS, haemoglobin S, isovanillin, orthovanillin.

## Referencias Bibliográficas

1. 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. Monografías en CD-Room, 2001.
2. Serjeant GR. Sickle cell disease. 2 ed. Oxford; Oxford Medical Publications; 1992. p. 56, 61, 71-7, 120-366.
3. Zaugg RM, Walder JA, Klotz IM. Schiff base aducts of hemoglobin. J Biol Chem. 1977;252 (53):8542-8.
4. Beddell CR, Kneen G, White RD. The antisickling activity of a series of aromatic aldehydes. Br J Pharmacol. 1979;66:70.
5. 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):1334-41.
6. 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 Cubana Quim. 1996;8 (2):3-10.
7. 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 Quim. 2002;14(1):59-64.
8. USP XVIII. The United States Pharmacopoeia. 18 ed. The US Pharmacopoeial Convention. Easton: Mack Printing; 1970.
9. 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 Cheml.

1988;52:1041.

10. Ohta T. Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives. *Critical Rev Toxicol.* 1993;23(2):127-46.
11. Stanley HR. Toxicity testing of dental materials. Boca Ratón: CRC Press; 1985.
12. Fernández A, Falcón JE, Del Toro G, Pozo AR. Caracterización de los buffer fosfatos utilizados en la preparación de solución de hemoglobina a pH controlado. *Rev Cubana Quim.* 2001;13(3):87-96.
13. Del Toro G, Falcón JE, Alonso Y. Estudio de la actividad hemolítica del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído en hematíes SS. *Rev Cubana Farm.* 2002;36 (Supl Esp1):54-64.
14. Del Toro G, Falcón JE., Alonso Y, Valdés Y, Cabal C. Estudio de la vainillina como agente inhibidor de la polimerización de la hemoglobina S. *Bioquímica.* 2003;4(28):4-10.
15. Eaton WA, Hofrichter J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood.* 1987;70:1245-66.
16. Milner PF. Los trastornos drepanocíticos. *Clínica Hematológica. Hemoglobinas anormales 2/2.* Barcelona: Salvat; 1976. p. 72-107.
17. Statius van Eps LW, De Jong, PE. Sickle Cell Disease. In *Diseases of the Kidney.* 6 ed. Volumen 1. Schrier RW, Gottschalk, CW. (eds.). Boston: 1997. p. 2201-19.

Recibido: 20 de diciembre de 2004. Aprobado: 8 de enero de 2005.

Lic. *Yamirka Alonso Geli*. Centro de Biofísica Médica. Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n, 90500, Santiago de Cuba, Cuba. Correo electrónico: [yalonso@cbm.uo.edu.cu](mailto:yalonso@cbm.uo.edu.cu)

<sup>1</sup> **Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora.**

<sup>2</sup> **Licenciada en Radioquímica. Investigadora Agregada.**

<sup>3</sup> **Licenciado en Química. Aspirante a Investigador.**

<sup>4</sup> **Doctora en Ciencias Biológicas. Profesora Titular**