

Bioquimia

Volumen 30
Volume

Número 4
Number

Octubre-Diciembre 2005
October-December

Artículo:

Efecto *in vitro* de los 1-O-
alquilgliceroles sintéticos en la
falciformación y en la hemólisis de los
eritrocitos SS

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*

Efecto *in vitro* de los 1-O-alkilgliceroles sintéticos en la falciformación y en la hemólisis de los eritrocitos SS

Amarilys Torres-Domínguez,* Grisel del Toro-García,** Yolanda C. Valdés-Rodríguez,**
José Luis León,* Francisco Merchán*

RESUMEN

La drepanocitemia es una enfermedad hereditaria que se expresa mediante la sustitución de ácido glutámico por valina en la posición seis en las cadenas- β de la hemoglobina originando la hemoglobina S (HbS). Los 1-O-alkilgliceroles son precursores biosintéticos o catabolitos de los 1-O-alkilglicerofosfolípidos de las membranas celulares. En estudios previos de los 1-O-alkilgliceroles naturales y sintéticos se encontró que inhiben la actividad de la fosfolipasa 2, Ca^{2+} -ATPasa y $Na^+ K^+$ -ATPasa de la membrana de eritrocitos humanos, relacionados con las propiedades surfactantes de estos compuestos, los cuales son responsables de los efectos sobre la transformación equinogénica de la membrana eritrocitaria. En este trabajo se analiza mediante microscopía óptica y resonancia magnética nuclear la acción de los 1-O-alkilgliceroles sintéticos C10 y C12 sobre eritrocitos de pacientes con drepanocitemia. Además, se evaluó la actividad hemolítica de los compuestos sobre eritrocitos SS y normales. Las microfotografías evidenciaron que estos compuestos, a las relaciones molares 1:1 y 1:5, inhibieron la transformación drepanocitaria de los eritrocitos homocigotos para hemoglobina S, favoreciendo la transformación equinogénica, aunque el mecanismo implicado en este efecto no está relacionado con la inhibición de la polimerización de la hemoglobina S. No hubo diferencia significativa en el porcentaje de hemólisis entre los eritrocitos con HbAA y los de HbSS. Se concluye que los 1-O-alkilgliceroles de C10 y C12 inhiben la falciformación de los eritrocitos SS, posiblemente por interacción de los mismos con la membrana de los eritrocitos.

Palabras clave: drepanocitemia, alquilgliceroles RMN, eritrocitos, hemólisis.

ABSTRACT

Sickle cell disease is a hereditary illness that is expressed by the substitution of the rest of glutamic acid for valin in the six position in those β chain of the hemoglobin, originating the sickle hemoglobin (HbS). The 1-O-alkylglycerols are biosynthetic precursory of 1-O-alkylglycerophospholipids of the cellular membranes. In previous studies of the effects of those natural and synthetic 1-O-alkylglycerols it was found that they inhibit the 2-phospholipase activity, Ca^{2+} -ATPase and $Na^+ K^+$ -ATPase of the human erythrocyte membrane, related with the surfactant properties of these compounds those which are responsible for the effects on the echinogenic transformation of the erythrocyte membrane. In this work is presented a study by of Optic Microscopy and Nuclear Magnetic Resonance with the objective of analyzing the action of those synthetic 1-O-alkylglycerols C10 and C12 on the erythrocyte of patient with sickle cell disease. Beside is presented a spectrophotometric study of the hemolytic activity of the C12 and C10 on sickle and normal erythrocytes. The microphotographs evidenced that these made up to the molars relationships 1:1 and 1:5, the same as other members of this family of compounds, inhibited the transformation of the sickle erythrocyte, favoring the echinogenic transformation, although the mechanism implied in this effect is not related with the inhibition of the HbS polymerization. There was no significant difference in hemolysis percentage between erythrocytes with Hb AA and HBSS. In the present work we demonstrated that 1-O-alkylglycerols inhibited the transformation of sickle erythrocytes, probably by the interaction of 1-O-alkylglycerols with erythrocyte membrane.

Key words: Sickle cell, alkylglycerols, RMN, sickle cell disease, hemolysis, red cells.

* Departamento de Química Básica. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. San Lázaro y L, Ciudad Habana, Cuba.

** Departamento de Biofísica, Centro de Biofísica Médica, Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n, 90500, Santiago de Cuba, Cuba.

*** Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. Calle 222 y 23 No. 250, La Coronela, Lisa, Ciudad Habana, Cuba.

Correspondencia:

MSc. Amarilys Torres-Domínguez. Departamento de Química Básica. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. San Lázaro y L, Ciudad Habana, Cuba. e-mail: amarilys@ifal.uh.cu, amarilys3@yahoo.es

Recibido: 12-05-2005

Aceptado: 05-10-2005

INTRODUCCIÓN

La drepanocitemia es una anemia hemolítica hereditaria determinada por una mutación en el gen que codifica para la cadena β de la molécula de la hemoglobina. Esta mutación se expresa mediante la sustitución de ácido glutámico (Glu) por valina (Val) en la posición 6, dando lugar a la formación de hemoglobina S (HbS).¹⁻⁵ Las moléculas de hemoglobina S cuando se desoxigenan (dHbS) se polimerizan formando agregados moleculares en forma de estructuras microtubulares elongadas que disminuyen su solubilidad, adquiriendo rigidez estructural y distorsionando el glóbulo rojo (forma de hoz o media luna). Esto provoca una disminución de su flexibilidad, lo que trae como consecuencia hemólisis e hipercoagulabilidad de la sangre, y por tanto, vasooclusión. La hipoxia tisular causada por la vasooclusión en la microcirculación y el consiguiente daño de los órganos, constituye la primera causa de morbilidad y mortalidad en esta enfermedad.^{2,3,6-12}

La drepanocitemia afecta a millones de personas en todo el mundo. En Estados Unidos aproximadamente el 8% de los afroamericanos portan la mutación y la frecuencia es aproximadamente 1 de cada 500 afroamericanos nacidos vivos y 1 de cada 1,000 hispanoamericanos, cerca de 72,000 personas.^{6,13} Es una enfermedad común en Cuba y una de las patologías hematológicas de carácter genético que constituye todavía un problema social y de salud pública. El 3.0% de la población general es portadora de la HbS. La incidencia de portadores en las provincias orientales está entre 6% y 11%, y en las provincias occidentales se sitúa entre 2% y 3%.¹⁴

Los 1-O-alkilglicérols presentan en su estructura una función éter alquilo en la posición 1 del glicérol que caracteriza a los glicérolfosfolípidos y a cuya presencia se le atribuyen los efectos biológicos que posee esta familia de éteres lipídicos.^{15,16} Fueron aislados por primera vez por Tsujimoto y Toyama, en 1921, del aceite de hígado de peces y posteriormente han sido obtenidos de distintas especies de invertebrados marinos,¹⁷⁻¹⁹ y tejidos de vertebrados,²⁰ siendo particularmente abundantes en el aceite de hígado de tiburón.²¹⁻²³ Estos compuestos se presentan en forma de mezclas no racémicas de diferentes longitudes de cadena de 12, 14, 16 y 18 átomos de carbono.²⁴

Por más de 30 años, se han estudiado los efectos biológicos y médicos de los alquilglicérols y sus mecanismos de acción constituyen temas actuales de investigación. Los estudios han demostrado que estos compuestos tienen varias funciones. Presentan propiedades bactericidas, fungicidas, antitumorales, antiinflamatorias y promotoras de la absorción.²⁵⁻³²

Una de las características más comunes de estos compuestos es su interacción e incorporación a las membranas celulares, probable origen de los múltiples efectos observados. Hasta la fecha se ha demostrado que tanto los 1-O-alkilglicérols naturales como los análogos sintéticos de cadenas de 16 y 18 átomos de carbono inhiben la transformación de los eritrocitos a células falciformes, 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*.²⁴ Teniendo en cuenta las propiedades surfactantes de estos compuestos,²⁷ y los resultados de los estudios previos de la acción de los mismos sobre la membrana eritrocitaria y otros componentes celulares de la sangre²⁴ se determinaron los efectos *in vitro* de los 1-O-alkilglicérols sintéticos de cadenas de 10 (C10) y 12 (C12) átomos de carbono sobre eritrocitos homocigotos para HbS (SS), mediante microscopía óptica y sobre el proceso de polimerización de la HbS mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Además se evaluó la actividad hemolítica de los compuestos sobre eritrocitos portadores de hemoglobina S y portadores de hemoglobina A, mediante espectrofotometría.¹⁶

MATERIAL Y MÉTODOS

Para los estudios se utilizó sangre total procedente de 8 pacientes adultos con drepanocitemia, suministradas por el Laboratorio Clínico del Instituto Nacional de Hematología e Inmunología de Ciudad de La Habana y el Laboratorio Clínico del Hospital General Santiago, Santiago de Cuba, y sangre total de 8 voluntarios sanos, suministrada por el banco de sangre, previo consentimiento informado. Se excluyeron de los ensayos las embarazadas, pacientes bajo tratamiento con hidroxiurea y los que fueron sometidos a transfusión en un plazo de 2 meses.

Preparación de las muestras

La sangre total heparinizada se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min (Hettich-Zentrifugen, España); el precipitado celular fue sometido a tres lavados consecutivos con tampón fosfato (PBS, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ [Panreac, España]) pH 7.4 para obtener los glóbulos rojos. Seguidamente se determinó la concentración de hemoglobina (Hb) según el método de la cianometahemoglobina en un espectrofotómetro ULTROSPEC-III-Plus (Pharmacia, LKB).^{33,34}

A partir de la concentración de Hb en la muestra se calculó la cantidad de 1-O-alkilglicérol C10 y C12

necesaria para obtener relaciones molares de 1:1, 1:5 y 1:10 entre la Hb y los compuestos. Se prepararon en soluciones hidroalcohólicas diluyendo en 100 μL de etanol absoluto (Alfa Aesar, Alemania) y 900 μL de PBS para obtener un volumen final de 1 mL.

Determinación de la actividad hemolítica

A partir de la solución de glóbulos rojos lavados se tomó 1 mL y se resuspendió en 9 mL de PBS. A partir de esta solución se tomaron 0.2 mL y se adicionaron a cada una de las soluciones. Se prepararon tres réplicas de todas las soluciones por paciente, un control positivo de actividad hemolítica (0.1% de Na_2CO_3 (Panreac, España) sin adición de 1-O-alkilglicerol), un control negativo (PBS, sin adición de 1-O-alkilglicerol) y un control negativo (*) al que se añadió la solución vehículo (10% etanol absoluto/PBS sin adición de 1-O-alkilglicerol).³⁵

Se añadieron los compuestos a las relaciones molares 1:1, 1:5 y 1:10, se agitaron las muestras y se dejaron reposar durante 30 min., posteriormente se centrifugaron y se tomó el sobrenadante. La hemólisis se evaluó en el sobrenadante mediante el cálculo del porcentaje de hemoglobina liberada a partir de la determinación de la absorbancia ($\lambda = 545 \text{ nm}$). El porcentaje de hemólisis se determinó mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{Hemólisis} = \frac{\text{DO}_M - \text{DO}_{\text{CN}}}{\text{DO}_{\text{CP}} - \text{DO}_{\text{CN}}} \times 100$$

Donde:

DO = Densidad óptica

M = Muestra

CN = Control negativo

CP = Control positivo

Efecto del C10 y C12 sobre eritrocitos SS por MO

Para la valoración del efecto de los alkilgliceroles sobre los eritrocitos SS por microscopía óptica, se partió de 5 mL de sangre total, procedente de cada una de 8 pacientes con drepanocitemia. Se utilizó bisulfito de sodio al 1% (Sigma, Francia) para lograr las condiciones anoxigénicas del medio de reacción. Posteriormente se adicionó en un vial, 200 μL de solución de glóbulos rojos más 200 μL de bisulfito de sodio más 200 μL de la solución de alkilgliceroles para cada relación molar. Los viales fueron sellados con papel parafinado para garantizar las condiciones anoxigénicas.

Las mezclas de reacción fueron preparadas por duplicado, utilizando en cada caso dos controles positivos y dos controles negativos.

A las 24 h y 48 h, se extrajeron 10 μL de cada vial, y se realizaron frotis. Las láminas con los glóbulos rojos fueron contrastadas con hematoxilina eosina y fijadas con Cytoseal™ 60 (Richard-Allan Scientific). Las observaciones y las fotos fueron tomadas en un microscopio óptico LaborLux S Leitz con cámara digital (Panasonic Súper DYNAMIC) acoplada con el programa ATI Play. Para cada frotis se determinó un campo de observación de 200 células y se calculó la frecuencia de drepanocitos en porcentaje en el mismo.

Estudio del efecto del C10 y C12 sobre la polimerización de la HbS por RMN

Para el estudio sobre la polimerización de la HbS por RMN se partió de 2 concentrados de eritrocitos SS obtenidos a partir de sangre total de 5 a 7 pacientes para cada una. Éstos fueron hemolizados mediante un ciclo de congelación y centrifugación (3,000 rpm, 10 min). Las soluciones de C12 y C10 fueron preparadas en 20% etanol absoluto/PBS a las relaciones molares 1:1 y 1:5. Para cada prueba se empleó un patrón de solución vehículo. Las muestras de 500 μL fueron depositadas en las ampulas de RMN y mantenidas a 36°C durante el curso de las mediciones.

Las mediciones se realizaron en un relaxómetro Giromag 01®, diseñado y construido por el Centro de Biofísica Médica de Santiago de Cuba con la serie de impulsos 90°- τ -180° (Hahn) a la frecuencia 4 MHz siguiendo el procedimiento descrito por Cabal y cols.^{34,36} Los datos se graficaron utilizando el *Microcal Origin*. La curva sigmoidal de la variación temporal de T2 que describe la cinética del proceso de polimerización fue ajustada y normalizada en un rango de 0 a 1 para facilitar la diferenciación del tiempo de demora (td) entre las muestras. Se realizó un ajuste por regresión lineal y se determinó el valor del td en minutos, a partir del cual se ha informado el inicio del crecimiento rápido e irreversible de los polímeros.

La influencia de la concentración del compuesto 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).

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

donde: %Vtd = Variación de td
 rm = relación molar
 pat = patrón
 td = tiempo de demora

De esta forma se evaluó el intervalo de tiempo que da inicio al proceso de polimerización irreversible, dicho intervalo de tiempo se conoce como td. Cada paciente posee un valor de td característico ya que inicialmente se poseen parámetros anatomofisiológicos propios entre los que podemos señalar: valores de saturación de oxígeno, pH, concentración de HbS y HbF diferentes.³⁶

Análisis estadístico

Se calculó la media y la desviación estándar para cada grupo experimental. Se compararon las medias de los controles positivos y los controles negativos contra los grupos tratados con la prueba de comparación múltiples de Duncan, el análisis de varianza simple (ANOVA), la prueba de Kruskal-Wallis para variables con un comportamiento no paramétrico y t de Student para comparación dos grupos, considerando significativo un valor de $p < 0.05$. El análisis estadístico fue procesado mediante el programa SPSS para Windows, versión 10.0 (SPSS Inc. Corp., 1999, Michigan, IL, USA).

RESULTADOS

Determinación de la actividad hemolítica

En el estudio realizado con sangre procedente de donantes voluntarios se obtuvieron porcentajes de hemólisis por debajo del 3% para el C10 y el C12. Al comparar las razones molares estudiadas según el porcentaje de hemólisis promedio no se observó diferencia estadísticamente significativa entre ellas en ambos compuestos ($p > 0.05$). Sobre eritrocitos con HbS el comportamiento fue similar a lo observado para los individuos normales. Tampoco se observó diferencia estadísticamente significativa entre las relaciones molares del C12 ($p > 0.05$), pero en C10 sí se encontró entre la relación 1:1 y 1:10 ($p < 0.05$) (Figuras 1 y 2). Estos valores reflejan una actividad hemolítica de los alquilgliceroles baja, teniendo en cuenta el valor de referencia (10%) para la técnica utilizada. Estadísticamente los resultados entre relaciones molares para cada tipo de muestra (HbA y HbS) reportaron diferencias no significativas entre ellas ($p > 0.05$), por lo que no se aprecia una tendencia a la hemólisis por acción del C10 y el C12.

Efecto del C10 y C12 sobre eritrocitos SS por MO

En los resultados del estudio al microscopio óptico se observaron variaciones morfológicas a los dos intervalos de tiempos evaluados. Mediante el conteo del número de drepanocitos bajo condiciones anoxigénicas, las cuales favorecen la polimerización de la hemoglobina y la falciformación, se observó una inhibición de la drepanocitosis para ambos compuestos a las relaciones molares estudiadas (Cuadro I). Los controles positivos y negativos mostraron aumento de drepanocitos a las 48 horas, mientras que en las muestras tratadas se observa una tendencia a la inhibición muy marcada, comparada con los controles. Esta tendencia presenta un comportamiento muy si-

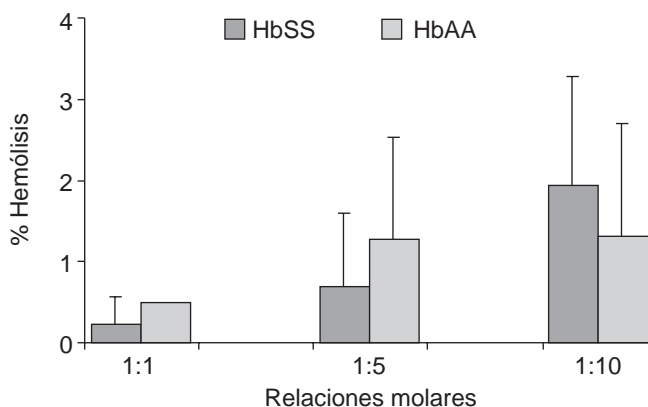


Figura 1. Promedio (barras) y desviación estándar (barras de error) del porcentaje de hemólisis de los eritrocitos con HbAA y HbSS tratados con 1-O-alquilgliceroles C10 a diferentes relaciones molares.

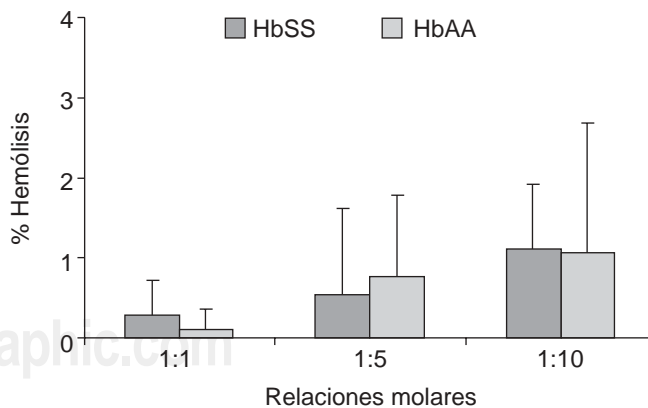


Figura 2. Promedio (barras) y desviación estándar (barras de error) del porcentaje de hemólisis de los eritrocitos con HbAA y HbSS tratados con 1-O-alquilgliceroles C12 a diferentes relaciones molares.

Cuadro I. Promedio \pm desviación estándar del % de drepanocitos en los 8 pacientes con hemoglobina SS y en los controles.

Tratamiento	24 horas	48 horas
Controles positivos	35.3 \pm 16.16	75.8 \pm 12.15
Controles negativos	26.8 \pm 14.55	60.8 \pm 20.04
C10 1:1	6.8 \pm 5.13*	5.2 \pm 3.88*
C10 1:5	6.5 \pm 0*	4.0 \pm 5.07*
C12 1:1	8.3 \pm 5.47*	5.2 \pm 4.16*
C12 1:5	5.2 \pm 2.71*	2.2 \pm 2.25*

Se comparó el control positivo y negativo con las muestras tratadas con el C10 y C12 a las relaciones molares 1:1 y 1:5. * $p < 0.05$

milar para ambos compuestos y para las dos relaciones molares. Entre el control positivo y el negativo no se observó diferencia ($p = 0.11$). Al comparar el control positivo a las 24 horas con el C10 y C12 a las dos relaciones molares estudiadas, se encontró una diferencia significativa entre ellas ($p < 0.05$), lo mismo que a las 48 horas de incubación.

Se comparó, además, el comportamiento entre los dos intervalos de tiempo, observándose una tendencia al aumento de la drepanocitosis para el control positivo a las 24 horas y las 48 horas ($p = 0.0004$). De igual forma se comportaron los controles negativos ($p = 0.04$); sin embargo, los alquilglicerolos aparentemente mostraron tendencia a la inhibición en los dos intervalos de tiempo ($p > 0.05$) independientemente de las concentraciones empleadas.

En las microfotografías tomadas al microscopio óptico del control positivo puede apreciarse la presencia de gran cantidad de drepanocitos. Este efecto es más

marcado a las 48 horas y aparecen además formas equinogénicas en ambos grupos (*Figura 3*).

Por el contrario, si comparamos los controles con el C10 a la relación molar 1:1 a las 24 horas se observó una disminución del número de drepanocitos e incremento en el número de equinocitos (*Figura 4*). A las 48 horas de incubación se observó que casi todos los eritrocitos se habían transformado en equinocitos y algunos glóbulos rojos en forma bicóncava. A la relación molar 1:5 el C10 mostró el mismo comportamiento.

Igualmente al comparar los controles con el C12 1:1 y 1:5 se observó una disminución de drepanocitos a las 24 horas, así como un marcado aumento del número de equinocitos a las 48 horas (*Figura 5*).

Efectos del C12 y C10 sobre la polimerización de la HbS por RMN.

Todas las muestras estudiadas reprodujeron la curva sigmoidal de variación temporal de T2 (*Figura 6*). En la misma se pueden apreciar tres etapas de la HbS en el medio. La primera etapa corresponde a las moléculas de hemoglobina en su estado de disolución predominante, la segunda caracteriza el equilibrio existente entre las moléculas de hemoglobina en solución y las que se encuentran formando el polímero (nucleación) y en la tercera etapa se encuentran predominantemente las moléculas de hemoglobina en el polímero.

Los patrones y las muestras tratadas mostraron un comportamiento diferencial del td entre las repeticiones de un mismo ensayo y una misma relación molar, lo cual puede estar relacionado con las carac-

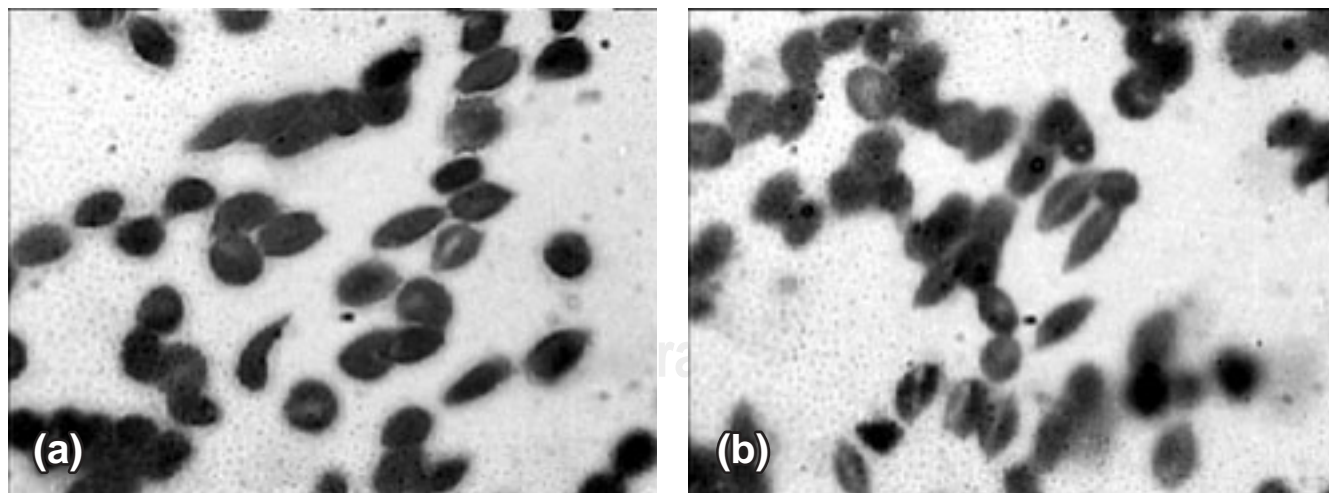


Figura 3. Microfotografía de los eritrocitos del control positivo incubados con 1-O-alkilglicerol a las 24 h (a) y 48 h (b).

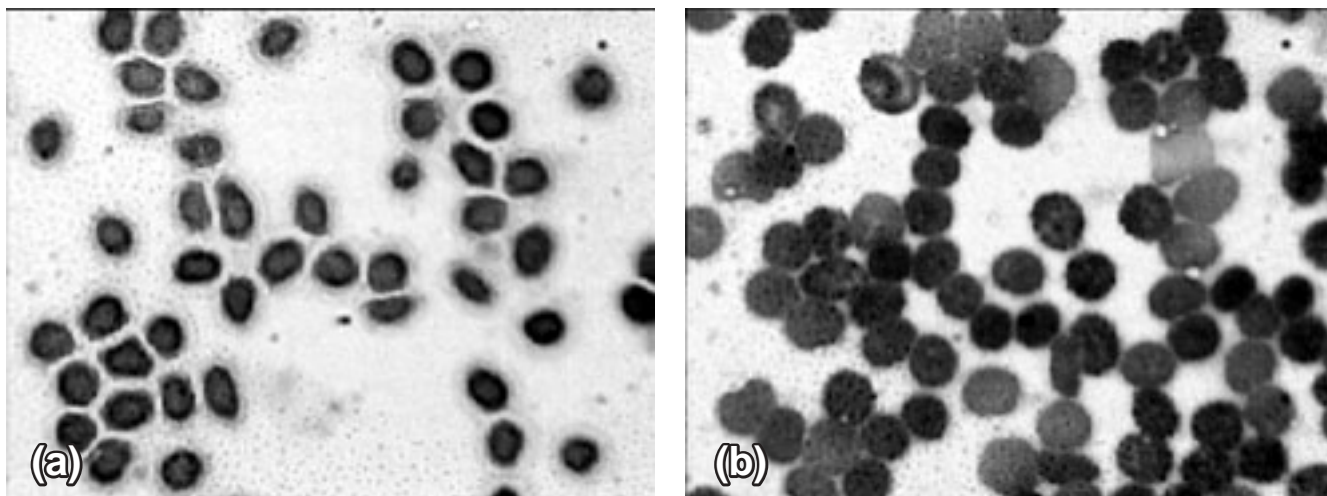


Figura 4. Microfotografías de los eritrocitos de paciente con HbSS incubados con 1-O-alkilglicerol C10 en relación molar 1:1 durante 24 h (a) y 48 h (b). (Ver texto).

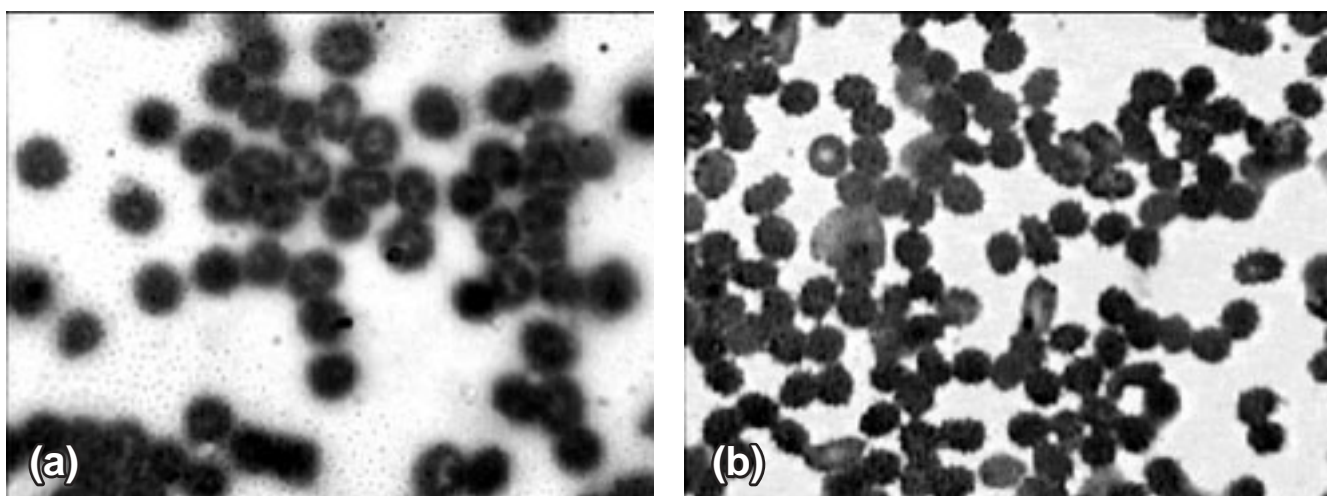


Figura 5. Microfotografías de los eritrocitos de paciente con HbSS incubados con 1-O-alkilglicerol C12 en relación molar 1:1 durante 24 h (a) y 48 h (b). (Ver texto).

terísticas propias de cada paciente inherente a la enfermedad. Las muestras tratadas con C10, relación molar 1:1, mostraron un incremento no significativo del td ($p > 0.05$); mientras que para 1:5 y para C12 no se obtuvo ningún efecto. No se encontró relación entre el td y el aumento de la concentración de los compuestos. La prueba de comparaciones múltiples no reportó diferencia significativa entre las medias para las relaciones molares estudiadas ($p > 0.05$), aun cuando se obtuvo tendencia al comparar 1:1 con 1:5 para el C10.

A partir de los valores medios del td se calculó el %Vtd obteniéndose para la relación molar 1:1 del

C10 resultados más significativos en tres pruebas (0.8%, 6% y 9%), para 1:5 y para el C12 no se obtuvo un porcentaje de variación del td con relación a los controles.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos corroboran estudios previos realizados con 1-O-alkilglicerol naturales de origen marino y el C16 y C18 sintéticos, en los cuales se demostró que esta familia de compuestos provoca cambios equinogénicos en los eritrocitos sin incrementar los eventos hemolíticos.²⁴

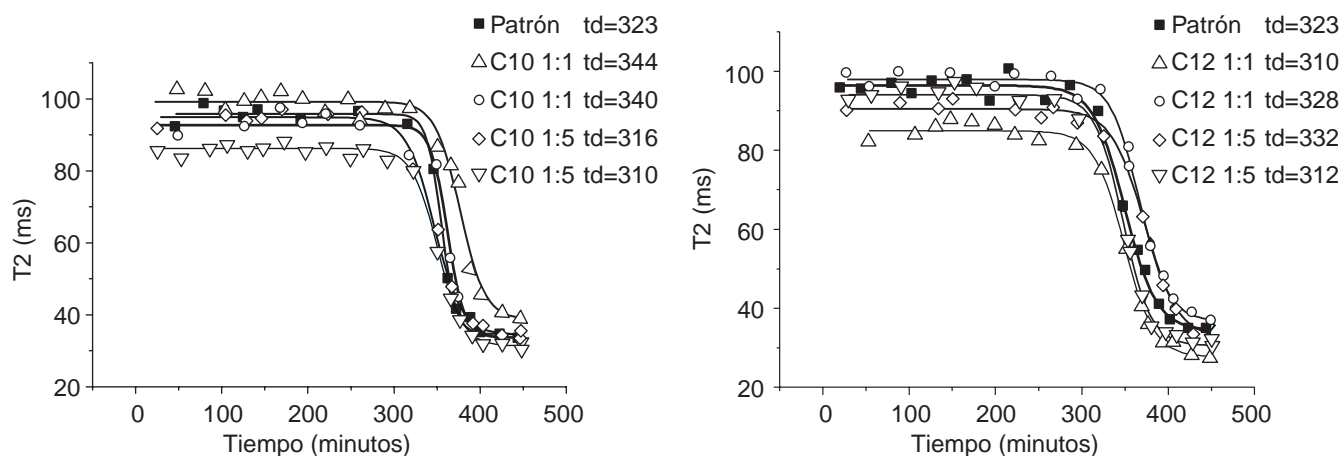


Figura 6. Curvas de la polimerización de la HbS para los patrones y las muestras tratadas con 1-O-alkilgliceroles C10 y C12.

Una prueba de utilidad en el estudio y desarrollo de un fármaco es precisamente la determinación de su actividad hemolítica. Un candidato a fármaco debe atravesar la membrana celular e interactuar con la hemoglobina intracelular evitando que en este proceso se afecten la proteína y el glóbulo rojo, estructural y funcionalmente. Atendiendo a estos criterios y a la anemia hemolítica crónica que caracteriza la enfermedad es necesario determinar la actividad hemolítica de aquellos compuestos que poseen actividad anti-drepanocitaria *in vitro*.

Las variaciones observadas sobre el efecto hemolítico entre las diferentes pruebas para una misma relación molar pueden tener su causa en la no homogeneidad de las muestras utilizadas, ya que cada una se realizó con sangre total procedente de individuos diferentes donde no se tuvo en cuenta factores hematológicos ni fisiológicos. Un agente químico extraño, en dependencia de su concentración, puede alterar el equilibrio iónico del medio, provocar la deshidratación, aumentar la fragilidad y la destrucción celular. Además cada muestra posee características reológicas propias, como por ejemplo el envejecimiento celular. El tiempo de vida medio de los glóbulos rojos normales es de 120 días y se conoce que en el torrente sanguíneo circulan células con variabilidad en la edad, de las cuales las más próximas al tiempo de vida medio son las más propensas al daño y la lisis celular.³⁷

Los eritrocitos SS son más frágiles y rígidos que los normales debido a la polimerización de la desoxihemoglobina, que los somete a cambios intracorporales que causan pérdida de su elasticidad. Su destrucción consiste en la lisis intravascular debida a la

fragilidad mecánica aumentada, y la extracción por retención y fagocitosis en el sistema reticuloendotelial, con un tiempo de vida medio de aproximadamente 60 días.³⁸ Es por esto que compuestos que exacerben o incidan en sus propiedades reológicas tendrán una marcada incidencia negativa en esta enfermedad.

Por tanto, la acción de los 1-O-alkilgliceroles C10 y C12 sobre los eritrocitos SS se corresponde con una actividad hemolítica basal con un porcentaje de hemólisis $\leq 3.0\%$ para ambos compuestos, teniendo en cuenta que la hemólisis en los pacientes drepanocíticos puede alcanzar valores de hasta el 40% por las características propias de la enfermedad.

La transformación equinogénica es una propiedad de las membranas eritrocitarias, que está determinada por factores hereditarios o ambientales.³⁹⁻⁴¹

Esta transformación sigue una sola dirección, de discocito a esferoquinocito. Este proceso, por lo general, es reversible siempre que se elimine el factor equinogénico desencadenante.³⁹

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. 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.²⁴ Las variaciones equinogénicas son reversibles y más flexibles que los drepanocitos.

En las microfotografías se observa para ambos compuestos una disminución del número de drepanocitos e incremento en el número de equinocitos. Este

efecto es más marcado a las 48 horas de incubación, donde casi todos los eritrocitos se transforman en equinocitos y aparecen algunos glóbulos rojos en forma bicóncava. Considerando que los 1-O-alkilgliceroles poseen la estructura básica de los éteres de glicerofosfolípidos¹⁵ y los lisofosfolípidos como la 2-lisofosfatidilcolina, cuyos efectos equinogénicos han sido demostrados por diferentes grupos de investigadores,²⁴ pudiéramos interpretar los cambios morfológicos producidos por el C10 y el C12 como resultado de la alteración del estado micelar crítico de la estructura molecular de la membrana celular, probablemente asociados a las propiedades surfactantes que se atribuyen a estos compuestos.²⁷

Teniendo en cuenta que el número de células irreversiblemente falciformes circulantes determina el componente hemolítico, estos cambios morfológicos provocarían la recuperación de la elasticidad y la disminución de la fragilidad mecánica de los eritrocitos, mejorando por tanto las manifestaciones clínicas que se presentan en la enfermedad y por consiguiente, la calidad de vida de estos pacientes.⁴²

Por otra parte, la inhibición o retardo de la velocidad de la falciformación puede estar relacionada también con el bloqueo de la polimerización de la HbS, por acción directa con la hemoglobina, similar a la acción de la vainillina (agente antidrepanocítico), que retarda la polimerización de la HbS, inhibiendo a su vez la transformación de los glóbulos rojos hacia la forma de drepanocito,^{34,36,42} atendiendo a esto, evaluamos los efectos de estos compuestos sobre la polimerización de la HbS por RMN. Mediante esta técnica se determina la cinética de polimerización de la HbS. Un incremento del td está relacionado con la interacción directa del compuesto con sitios específicos de la hemoglobina que provocarían una interrupción de la polimerización. Como consecuencia, el proceso se hace más lento; las moléculas de HbS permanecen por un tiempo mayor en estado soluble, de esta forma aumenta la solubilidad de la Hb y su afinidad por el oxígeno.³⁶

El C10 y C12 no mostraron un aumento significativo del td comparado con la muestra control, por lo que al evaluar los resultados obtenidos en este estudio tomando como referencia los ensayos^{36,42} con la vainillina, sugerimos que los alquilgliceroles C10 y C12 inhiben la falciformación de los hematíes SS pero su modo de acción no es precisamente a través de la inhibición de la polimerización de la HbS por interacción directa con la Hb, sino que está relacionado con la interacción de los mismos con la membrana de los eritrocitos, como ha sido demostrado por otros auto-

res en la evaluación de los alquilgliceroles naturales y los sintéticos C16 y C18.^{19,24}

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los técnicos y enfermeras del Laboratorio Clínico del Instituto Nacional de Hematología e Inmunología de Ciudad de La Habana, el Banco de Sangre y el Hospital General Santiago y a los investigadores del Departamento de Biofísica del Centro de Biofísica Médica, en Santiago de Cuba y del Centro de Estudios para las Investigaciones y las Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos.

REFERENCIAS

1. Dean J, Schechter AN. Sick cell anemia: molecular and cellular bases of therapeutic approaches. *New Engl J Med* 1978; 299: 752-763, 804-811, 863-870.
2. Serjeant GR. *Sickle cell disease*. 2nd ed. Great Britain: Oxford Medical Publications; 1992: 56, 61, 71-77, 120-366.
3. Serjeant GR. Sick cell disease. *Lancet* 1997; 350: 725-730.
4. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *New Engl J Med* 1997; 337: 762-769.
5. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *New Engl J Med* 1999; 340: 1021-1030.
6. Davies SC, Oni L. Management of patients with sickle cell disease. *BMJ* 1997; 315: 656-660.
7. Brugnara C. Sickle cell disease: from membrane pathophysiology to novel therapies for prevention of erythrocyte dehydration. *J Pediatr Haematol Oncol* 2003; 25: 927-933.
8. Marlowe KF, Chicella MF. Treatment of sickle cell pain. *Pharmacotherapy* 2002; 22: 484-491.
9. 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: 1955-1982.
10. Provan D, Weatherall D. Red cells II: acquired anaemias and polycythaemia. *Lancet* 2000; 355: 1260-1268.
11. Lubin BH. Sick cell disease and the endothelium. *New Engl J Med* 1997; 337:1623-1625.
12. Lew VL, Etzion Z, Bookchin RM. Dehydration response of sickle cells to sickling-induced Ca⁺⁺ permeabilization. *Blood* 2002; 99: 2578-2585.
13. NIH Publication. *Public Health Service*. National Institutes of Health National Heart, Lung, and Blood Institute. 1998; 98: 4086.
14. Espinosa-Martínez E, Svarch E, Martínez-Antuña G, Hernández-Ramírez P. La anemia drepanocítica en Cuba. Experiencia de 30 años Instituto de Hematología e Inmunología Ciudad de La Habana, Cuba. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1997; 12: 97-105.
15. Mangold HK, Weber N. Biosynthesis and biotransformation of ether lipids. *Lipids* 1987; 22: 789-799.
16. Braquet P. Biologically active ether lipids. *Prog Biochem Pharmacol* 1988; 22: 48-57.
17. Tsujimoto M, Toyama AS. Studies on unsaponifiable fractions from some fish liver oil. *Ann Rep Tokyo Inst Technol* 1921; 16: 471-510.
18. Spener FY, Mangold HK. The alkyl-moieties in wax esters and alkyl-diacylglycerols of sharks. *J Lipid Res* 1971; 12: 12-16.

19. Sedeño C, Prun B, Ángeles M, Enríquez RD. Estudios químicos de las Gorgonias cubanas. XIV. Gliceril éteres presentes en 5 especies de Gorgonias. *Rev Cub Farm* 1985; 84: 237-243.
20. Snyder F, Wood R. Alkyl and alk-1-enyl-ethers of glycerol in lipids from normal and neoplastic human tissue. *Cancer Res* 1969; 29: 251-257.
21. Hallgren B, Larson S. The glycerol ether in the liver oil of elasmobranch fish. *Lipids Res* 1962; 3: 31-38.
22. Bordier CG, Sellier N, Foucault AP, Le Goffic F. Purification and characterization of deep sea shark *Centrophorus squamosus* liver oil 1-O-alkylglycerol ether lipids. *Lipids* 1996; 31: 521-528.
23. Sotomayor H. Efectos antitumorales *in vivo* de los 1-O-alkilglicerol del aceite de hígado del tiburón *Galeocerdo cuvieris* y del 1-O-hexadecilglicerol sintético. *Tesis para optar por el título de Maestro en Ciencias*. Universidad de La Habana. 1998.
24. Valdés Y. Propiedades biológicas de los 1-O-alkilglicerol de origen marino. *Tesis Doctoral*. Universidad de La Habana. 1997.
25. Munder P, Weltzein H, Modolle M. Lysolecithin analogues: new class of immunopotentiators in immunopathology. *Proc VII Int Symp, PA Miescher*; 1976: 411-424.
26. Lin HJ, Ho FC, Lee CL. Abnormal distribution of O-alkyl groups in the neutral glycerolipids from human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1978; 38: 946-949.
27. Ando K, Kodama K, Kato A, Tamura G, Arima K. Antitumor activity of glyceryl ethers. *Cancer Res* 1972; 32: 125-129.
28. Weber N, Mangold HK. Radioactivity label ether lipids by biotransformation of symmetrical alkylglycerols in cell suspension cultures of rape. *FEBS Lett* 1987; 211: 225-228.
29. Weber N. Biological effects of alkylglycerols. *Prog Biochem Pharmacol* 1988; 22: 48-57.
30. Pugliese PT, Jordan K, Cederberg H, Brohulth J. Some biological action of alkylglycerols from shark liver oil. *J Altern Complement Med* 1998; 4: 87-99.
31. Bilbao M, León JL, Sotomayor H, Valdés Y, Merchán F. Síntesis química y caracterización del 1-O-octadecilglicerol. Sus efectos antiinflamatorios. *Memorias Joven Ciencia* 1998: 115.
32. Hernández M. Caracterización del efecto de los 1-O-alkilglicerol sobre la línea celular N2a. *Tesis Maestría*. Universidad de La Habana. 2001.
33. Fernández AA, Falcón JE, Del Toro G, Pozo AR. Caracterización de los buffer fosfatos utilizados en la preparación de solución de hemoglobina (Hb) a pH controlado. *Rev Cub Quím* 2001; 13: 87-96.
34. Del Toro G, Falcón JE, Alonso Y. Estudio de la actividad hemolítica del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído en hematíes SS. *Rev Cub Farm* 2002; 36 Supl 1: 54-58.
35. Stanley HR. *Toxicity testing of dental materials*. 1a. ed. Florida: CRC Press Inc; 1985: 17-22.
36. Del Toro-García G, Falcón-Díeguez JE, Alonso-Geli Y, Valdés-Rodríguez YC, Cabal-Mirabal CA. Vainillina: agente inhibidor de la polimerización de la hemoglobina S. *Bioquímica* 2003; 28: 4-10.
37. Junqueira LC, Carneiro J. *Histología Básica*. 4ª. ed. España: Masson; 1996.
38. Ballas S, Smith ED. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. *Blood* 1992; 79: 2154-2163.
39. Bessis M. La forme et la déformabilité des érythrocytes normaux et dans certaines anémies hémolytiques congénitales. *Nouv Rev Fr Hematol* 1977; 18: 75-94.
40. Lebland P. The discocyte-echinocyte transformation or the human red cell: deformability characteristics. *Nouv Rev Fr Hematol* 1972; 12: 815-816.
41. Clark MR, Mohandas N, Feo C, Jacobs MS, Shohet SB. Separate mechanism of deformability loss in ATP-depleted and Ca-loaded erythrocytes. *J Clin Invest* 1981; 67: 531-539.
42. Del Toro G, Valdés YC, Graell 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: 5-10.

