



PERFIL LIPÍDICO Y ESTADO REDOX ASOCIADOS AL ESTADO VASO- OCCLUSIVO EN LA ANEMIA DREPANOCÍTICA

Autores: Haydée Cruz Vadell¹, Samuel Rosales Rodríguez², Manuel Lores Guevara³, Celeste Roque Rodríguez⁴, Yannet Rodríguez Legrá⁵.

¹ Licenciada en tecnología de la salud en Laboratorio Clínico, Doctora en Ciencias de la Salud, Máster en enfermedades infecciosas, Profesora Asistente, Investigador Agregado. Departamento de Medios Diagnósticos, Facultad de Enfermería- Tecnología de la Salud, Universidad de Ciencias Médicas, Santiago de Cuba, Cuba. Email: haydeecruzv77@gmail.com

² Especialista en I grado en Hematología, Investigador agregado, Servicio de Hematología, Hospital General "Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso", Santiago de Cuba, Cuba.

³ Ingeniero Físico Nuclear, Dirección Científica, Doctor en Ciencias Técnicas, Profesor Titular, Investigador Titular, Centro de Biofísica Médica, Santiago de Cuba, Cuba.

⁴ Especialista II grado Laboratorio Clínico, Profesora Auxiliar, Departamento Laboratorio Clínico, Hospital General "Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso", Santiago de Cuba, Cuba.

⁵ Especialista de I grado en Estomatología General Integral, Máster en Atención Comunitaria en Salud Bucal, Residente de 3er año en Bioquímica Clínica, Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas, Facultad de Medicina No.1, Universidad de Ciencias Médicas, Santiago de Cuba, Cuba.



Resumen

Introducción: La drepanocitemia es una hemoglobinopatía de alta prevalencia a nivel mundial. La hemólisis de los drepanocitos produce una importante disfunción endotelial por múltiples mecanismos que incluyen un importante estado de estrés oxidativo y dislipidemia acentuados en la crisis vaso-oclusiva.

Objetivo: Caracterizar los estados asintomáticos y en crisis en pacientes drepanocíticos a partir de la evaluación del estado redox y el perfil lipídico.

Métodos: A partir de un estudio analítico transversal se compararon ambos estados, empleando el contraste de medias. Las variables fueron relacionadas con la correlación de *Pearson*.

Resultados: Se observó una diferencia significativa en los grupos en cuanto a los triacilglicéridos ($p=0,003$) y el HDL-Colesterol ($p=0,009$), así como el malonildialdehído ($p=0,001$), el glutation ($p=0,001$) y la catalasa ($p=0,005$). Estuvieron relacionados positivamente los triacilglicéridos y Colesterol, la LDL-colesterol y Colesterol, la LDL-colesterol y triacilglicéridos y, negativamente, el malonildialdehído y HDL-colesterol, el malonildialdehído y catalasa, así como el malonildialdehído y el glutation.

Conclusiones: Durante el estado de crisis vaso-oclusiva, es evidente el acentuado daño oxidativo a lípidos y depresión de mecanismos antioxidantes reflejado en este estudio. El empleo de biomarcadores evaluadores del estado redox permitió una mejor caracterización de los mismos, contribuyendo a una evaluación más completa de los pacientes.

Palabras clave: Anemia drepanocítica, estrés oxidativo, crisis vaso-oclusiva.



INTRODUCCIÓN

La drepanocitemia (Hb SS) es una hemoglobinopatía de alta prevalencia mundial. Está bien documentado que 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 de la β -globina que caracteriza a la hemoglobina S (HbS).⁽¹⁾

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), evento molecular responsable de las manifestaciones clínicas y hematológicas que presentan los enfermos con este tipo de anemia. Las células anormales pierden su plasticidad, por lo que pueden obstruir los vasos sanguíneos pequeños y reducir el flujo de la sangre, produciendo crisis vaso-oclusivas (CVO),⁽²⁾ infecciones bacterianas graves y necrosis.

La prevalencia de esta patología depende de las características genéticas, condiciones ambientales, nivel de salud pública y social, así como de los patrones matrimoniales. En Cuba, es la anemia hemolítica más frecuente y se calcula que el número de portadores es aproximadamente de 300 000 y de enfermos de 4 000. El estado de portador es del 3,08 % en la población general (AS) y del 6 % en el color de piel negra y mestiza, con una marcada incidencia en las provincias orientales (5,5 - 10,6%).⁽³⁾

Junto al mecanismo clásico (falciformación- vasoclusión), se conoce que la hemólisis de los drepanocitos produce una importante disfunción endotelial por múltiples mecanismos que incluyen aumento de la hemoglobina libre, desregulación del metabolismo de la arginina, aumento del *estrés oxidativo*,⁽⁴⁾ disminución local de óxido nítrico y liberación de mediadores inflamatorios (interleukina 1, bradikina, histamina y sustancia P), así como prostaglandina E2 e I2.

En eritrocitos SS se generan cantidades excesivas de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) debido a la presencia de la HbS inestable y la autoxidación espontánea del hierro en el hemo. Por otra parte, la vaso-oclusión (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).^(5,6)

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 ellos.⁽⁷⁾ 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.⁽⁸⁾

En Panamá se muestra un estudio que apoya la existencia del importante estrés oxidativo en pacientes de anemia falciforme y sugieren tres marcadores redox relacionados con la clínica de estos pacientes.⁽⁹⁾ Al-Naama y col⁽¹⁰⁾ también encuentran valores significativamente bajos de enzimas antioxidantes y elevados de MDA en pacientes con anemia drepanocítica con respecto a sujetos aparentemente sanos.

En Cuba, el protocolo médico para el seguimiento de estos pacientes, no incluye la evaluación del estado redox, asociado al perfil lipídico. Por lo que la medición de niveles de malondialdehído (MDA), como indicador de daño oxidativo a lípidos, y la catalasa (CAT) y glutatión reducido (GSH), como indicadores del estado antioxidante en los pacientes, resultaría contribuyente durante el seguimiento de los mismos.

OBJETIVO: El presente estudio propone caracterizar los estados asintomáticos y en crisis en pacientes drepanocíticos a partir del estado redox y el perfil lipídico, como sustento para posteriores estudios basados en la predicción del estado de CVO.



MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio analítico transversal, en el Laboratorio de Ciencias Básicas Biomédicas(LCBB) de la Universidad de Ciencias Médicas en Santiago de Cuba, en pacientes drepanocíticos en estados asintomático y de CVO, atendidos en el Centro Hematológico del Hospital Clínico Quirúrgico "Juan Bruno Zayas Alfonso de Santiago de Cuba, durante el período de Enero-Julio/2020. El criterio de inclusión consideró a un total de 52 pacientes drepanocíticos; los que acudían a la consulta (estado asintomático) y al servicio de urgencias con sintomatología propia del estado VO. Resultaron excluidos aquellos pacientes que padecían de neuropatías, cardiopatías y nefropatías.

Se recogió, bajo la autorización del comité de ética y consejo científico del hospital, el consentimiento informado de los mismos. Se cumplieron estrictamente los principios éticos establecidos en las normas relacionadas con el manejo de información médica. De igual modo, se aplicaron los parámetros que determinan el reglamento ético interno del citado hospital. Los datos de identificación de los pacientes fueron anónimos, siguiendo los principios éticos de la investigación científica con seres humanos. Una entrevista estructurada incluyó sus datos generales, hábitos alimentarios-nutricionales, tóxicos y aspectos clínicos.

Análisis Bioquímicos:

Se tomó una muestra de sangre venosa (5 mL) en ayunas, la cual fue inmediatamente transferida a tubos de 13×100 y centrifugadas (3500 rpm), para la extracción del suero sanguíneo. Una porción de este suero fue conservado en alícuotas a -86 °C para la posterior determinación del malonildialdehído (MDA), mientras que la catalasa (CAT) y el glutatión reducido (GSH) fueron procesados en un tiempo breve a la toma de muestra.

Se cuantificaron los niveles de Triacilglicéridos (TAG), Colesterol total (Coolest), HDL-Colesterol (HDL-C), LDL-Colesterol (LDL-C), CAT, GSH y MDA. Las concentraciones fueron procesadas por el analizador de química sanguínea *HITACHI^R 902*, ubicado en el laboratorio clínico del Hospital General Santiago.



La concentración de GSH se determinó por la lectura en el espectrofotómetro UV-T60 tras la reacción colorimétrica con el ácido 5,5'ditio-bis 2- nitrobenzónico (DTNB) 10^{-2} M, al producir un compuesto que absorbe la luz a 412nm. La concentración se obtuvo mediante una curva patrón con soluciones de referencia de GSH (1,17-10,54nmol/100mL). La CAT se midió indirectamente tras el consumo de peróxido de hidrógeno al absorber la luz a una longitud de onda de 240nm. El daño oxidativo a lípidos (MDA) fue medido espectrofotométricamente a 586nm a partir de la reacción del reactivo cromogénico N-metil-2-fenilindol con una molécula de MDA a 45 °C.

Análisis estadístico

Los datos recogidos se agruparon en la base de datos SPSS (versión 21.0). La normalidad de las principales variables incluidas se examinó según el t-student. Para las comparaciones, se utilizó la técnica de contraste de medias ANOVA, buscando la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos de estudio. La relación entre variables quedó establecida por la correlación de Pearson.

RESULTADOS

Un total de 52 pacientes drepanocíticos fueron estudiados, de los cuales 19 se encontraban en estado de CVO y 33 en estado asintomático. La distribución de ambas poblaciones, acorde al perfil lipídico, se relaciona en Tabla 1. La población en CVO mostró diferencia significativa con los pacientes asintomáticos en cuanto a los niveles de TAG y HDL-C. Por su parte, el colesterol total y LDL-C no mostraron marcada diferencia entre los grupos evaluados.

El incremento de estrés oxidativo en el grupo de pacientes que cursaban con CVO se hizo evidente por los altos niveles de MDA en este grupo con respecto al asintomático (Figura 1). Por otro lado, la defensa antioxidante en los mismos se evidenció en los bajos niveles de GSH y CAT en pacientes en crisis ($p < 0,05$). De manera general, cuando el daño oxidativo fue evidente, apareció un incremento en niveles de MDA, así como una reducción significativa de niveles de GSH y CAT.

La relación entre el perfil lipídico y el estado redox se muestra en la Tabla 2, según correlación de Pearson. Los resultados mostraron una marcada relación ($p < 0.01$)



entre: triacilglicéridos- colesterol total, LDLcolesterol- colesterol total, LDLcolesterol-triacilglicéridos. De la misma manera se correlacionan negativamente: MDA-HDLcolesterol, MDA- CAT y MDA-GSH.

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar los estados asintomáticos y en CVO en pacientes drepanocíticos a partir del estado redox y el perfil lipídico de los mismos. El conocimiento de los diferentes tipos de dislipidemias puede ayudar en la comprensión de las diferentes manifestaciones clínicas en estos pacientes. Esta es una condición que los caracteriza, sobre todo durante la evolución a la VO.

En el estudio se observó una marcada diferencia en cuanto a los niveles de TAG y HDL- colesterol en los grupos evaluados, atribuible a la dislipidemia acentuada en el estado de CVO. Estos resultados concuerdan con los de Moutawakilou y col⁽¹¹⁾ encuentran una prevalencia global de diferentes tipos de dislipidemias en el 82% de los pacientes. Teixeira et al⁽¹²⁾ destacan al cociente TAG/HDL-c como un potencial biomarcador de severidad de la entidad.

El estado inflamatorio crónico presente en estos pacientes está condicionado, en parte, por los altos niveles de LDL-colesterol en circulación. Sin embargo, esta lipoproteína en el estudio no aportó información valiosa al comparar los estados evaluados. Entre las hipótesis relacionadas con la depresión del HDL-colesterol en el paciente drepanocítico se ha reportado que la disminución del volumen de glóbulos rojos incrementa el volumen plasmático y la dilución de sus componentes, como lípidos y lipoproteínas.⁽¹³⁾ Sumado a ello, la depresión de la actividad de la enzima lecitina-colesterol-aciltransferasa (LCAT), quien cataliza la formación de esteres de colesterol a partir del colesterol unido a la HDL, también justifica este hecho.⁽¹⁴⁾

Lo altos niveles de HDL en circulación pueden reducir el riesgo de hemólisis intravascular y disfunción endotelial. Se ha probado que el endotelio en la anemia drepanocítica está activado al mostrar un aumento del número de células endoteliales microvasculares circulantes que expresan factor tisular(FT), VCAM-1, ICAM-1, E-selectina y P-selectina (que representan su fenotipo pro-coagulante, pro-adhesivo y pro-inflamatorio).⁽¹⁵⁾ Estas condiciones generan a nivel del endotelio



un incremento de las ERO, constituyendo una importante fuente de estrés oxidativo. De igual manera, niveles elevados de hemoglobina libre incrementan las reacciones oxidativas, el daño isquemia-reperfusión, el estado proinflamatorio crónico y la autoxidación de hemoglobina S (HbS).⁽⁴⁾

La dislipidemia que caracteriza a estos pacientes, más marcada en el estudio en aquellos que cursan al estado de VO, condiciona un incremento en los niveles de lípidos y ácidos grasos circulantes que constituyen una importante fuente de peroxidación lipídica. Se observó una hipertrigliceridemia marcada en algunos pacientes, que estuvo asociada al estado de peroxidación lipídica acentuado en aquellos que cursan al estado de CVO. Justifica este hecho el incremento en los niveles de MDA en este grupo, como medida del daño oxidativo a lípidos. Resultados similares obtuvieron Nguepkep⁽¹⁶⁾ y Okorie,⁽¹⁷⁾ quienes mostraron valores elevados de este indicador en eritrocitos de pacientes drepanocíticos, pero no fueron evaluados durante las CVO. Se conoce que durante este proceso, el incremento en la producción de ERO puede modificar la respuesta a partir de una variedad de condiciones fisiopatológicas que incluyen inflamación, hipoxia, metabolismo de xenobióticos y déficit de enzimas antioxidantes.⁽⁷⁾

La relación entre el perfil lipídico y el estado redox mostrada en la Tabla 2 es una evidencia de la asociación entre la acumulación de lípidos en el espacio extracelular, el daño oxidativo a los mismos y la depresión de la defensa antioxidante en los pacientes drepanocíticos. La suplementación de ácido fólico pudiera estimular el sistema antioxidante y reducir considerablemente la peroxidación lipídica a causa del incremento de ERO.

En el estudio, el estado antioxidante se mostró deprimido en pacientes que cursaban con CVO a causa de la disminución de CAT y el GSH. En un análisis prospectivo hacia el estado VO en pacientes drepanocíticos, Hierso et al⁽¹⁸⁾ encuentran también una depresión del sistema antioxidante con una marcada disminución de la concentración de GSH. En relación a la CAT, Antwi y col⁽¹⁹⁾ mostraron niveles bajos de este indicador en el grupo de pacientes afectados por CVO, como medida de la severidad del daño oxidativo presente en los mismos, coincidiendo con el presente estudio.



CONCLUSIONES

La evaluación del perfil lipídico y estado redox en la anemia drepanocítica ha demostrado gran valor durante el seguimiento de los pacientes al estado de crisis vaso-oclusiva. Es evidente el acentuado daño oxidativo a lípidos y depresión de mecanismos antioxidantes durante el estado de crisis reflejado en este estudio. El empleo de biomarcadores evaluadores del estado redox permitió una mejor caracterización de los mismos, contribuyendo a la evaluación de los pacientes. Se propone un examen frecuente, que incluya la medición de estos biomarcadores, en vista a brindar un tratamiento profiláctico oportuno hacia futuras crisis. Estudios futuros estarán dirigidos a la predicción del estado de CVO para minimizar el riesgo a desarrollar estas complicaciones.

Declaración de Autores:

Los autores certifican la autenticidad de la autoría declarada, así como la originalidad del texto.



BIBLIOGRAFÍA:

- ¹ Switzer JA, Hess DC, Nichols FT, Adams RJ. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. *The Lancet Neurol* 2006; 5(6): 501–512.
- ² Rojas MA, Calderón E, Vidal MA, Arroyo F, García Hernández R, Torres JM. Crisis drepanocítica y tratamiento del dolor. *Rev Soc Esp Dolor* 2015; 22(4): 165-167.
- ³ Cabrera-Zamora M. Anemia drepanocítica: de los eventos agudos al daño crónico de órganos. *Medisur*. 2016 [acceso: 12-5-2018]; 14(4). Disponible en: http://www.medigraphic.com/pdfs/medisur/msu-2_016/msu164r.pdf
- ⁴ Jagadeeswaran R, Vazquez BA, Thiruppathi M, Ganesh BB, Ibanez V, Cuiet S et al. Pharmacological inhibition of LSD1 and mTOR reduces mitochondrial retention and associated ROS levels in the red blood cells of sickle cell disease. *Exp Hematol* 2017; 50:46–52. doi:10.1016/j.exphem.2017.02.003.
- ⁵ Antwi CB, Campbell AD. Low nitric oxide level is implicated in sickle cell disease and its complications in Ghana. *Vasc Health Risk Manag* 2018; 6: 199–204
- ⁶ Bernard KFC, Cabral BNP, Bernard C, Flora NL, Anatole PC, Donatien G. Electrolytic and oxidative stress profile of sickle cell anaemia patients in Cameroon: The effect of some extrinsic factors. *Asian Hematol Res J* 2018; 1: 1–11.
- ⁷ Voskou S, Aslan M, Fanis P, Phylactides PM, Kleanthous M. Oxidative stress in the thalassemia and sickle cell disease. *Redox. Biol.* 2015; 6: 226–239. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.018>
- ⁸ Ama Moor VJ, Anatole Pieme C, Chetcha Chemegne B, Manonji H, Njinkio Nono BL, Tchoula Mamiafo C et al. Oxidative profile of sickle cell patients in a Cameroonian urban hospital. *BMC Clin. Pathol.* 2016; 16: 15. DOI 10.1186/s12907-016-0037-5
- ⁹ Biswal S, Rizwan H, Pal S, Sabnam S, Parida P, Pal A. Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage and inflammation symptoms of sickle cell disease in children. *Hematol* 2019; 24(1): 1-9, DOI:10.1080/10245332.2018.1498441.



¹⁰ Al-Naama LM, Hassan MK, Mehdi JK. Association of erythrocytes antioxidant enzymes and their cofactors with markers of oxidative stress in patients with sickle cell anemia. *Qatar Medical Journal* 2015;14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5339/qmj.2015.14><http://dx.doi.org/10.5339/qmj.2015.14>

¹¹ Moutawakilou G, Ayedoun M, Salifou T, Aidewou D, Akpona S. Prevalence and factors associated with dyslipidemia in adults with Sickle Cell Disease in Parakou (Benin). *Adv in Bioch* 2020; 8(1): 11-15. DOI: 10.11648/j.ab.20200801.12

¹² Teixeira RS, Arriaga MB, Terse-Ramos R, Ferreira TA, Machado VR, Rissatto-Lago MR et al. Higher values of triglycerides: HDL-cholesterol ratio hall mark disease severity in children and adolescents with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 2019; 52(10): e8833. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20198833>

¹³ Lalanne-Mistrih ML, Connes P, Lamarre Y, Lemonne N, Hardy-Dessources MD, Tarer V et al. Lipid profiles in French West Indies sickle cell disease cohorts and their general population. *Lipids in Health and Disease* 2018; 17(1): 38.

¹⁴ Emokpae MA, Uadia PO, Osadolor HB. Lecithin: cholesterol acyltransferase, lipoprotein lipase and lipoproteins in adult nigerians with sickle cell disease. *Afr J Biochem Res.* 2010; 4:17-20.

¹⁵ Matsui NM, Borsing L, Rosen SD, Yaghamai M, Yarki A, Embury SH. P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. *Blood* 2002; 98:1955-62.

¹⁶ Nguenpkep KL, Cabral Nya BP, Chetcha B, Yanou NN, Jocelyne MAV, Anatole PC. Relationship between higher atherogenic index of plasma and oxidative stress of a group of patients living with sickle cell anemia in Cameroon. *Hindawi Advan in Hematol* 2020; Article ID 9864371: 7. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2020/9864371>

¹⁷ Okorie CP, Nwagha T, Ejezie F. Assessment of some indicators of oxidative stress in Nigerian sickle cell anemic patients. *Ann Afr Med* 2018;17:11-16



¹⁸ Hierso R, Lemonne N, Villaescusa R, Lalanne-Mistrih ML, Charlot K, Etienne-JM et al. Exacerbation of oxidative stress during sickle vaso-occlusive crisis is associated with decreased anti-band 3 autoantibodies rate and increased red blood cell-derived microparticle level: a prospective study. *British Journal of Haematol* 2017; 176: 805–813

¹⁹ Antwi BCh , Dankwah GB, Aryee R, Hayfron-B Ch, Donkor ES, Campbell AD. Oxidative Profile of Patients with Sickle Cell Disease. *Med. Sci.* 2019; 7: 17; doi:10.3390/medsci7020017.

CONFLICTO DE INTERESES:

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.



ANEXOS:

Tabla 1. Distribución de pacientes drepanocíticos en crisis VO y fuera de crisis a partir del perfil lipídico.

| Perfil lipídico | CVO X±DS (n=19) | Fuera de crisis X±DS (n=33) | Sig. |
|---------------------------|-----------------------|--------------------------------------|------|
| Colesterol total(mmol/L) | 3,72±1,12 | 3,49±1,17 | ,505 |
| Triacilglicéridos(mmol/L) | 1,57±0,45 | 1,11±0,53 | ,003 |
| HDL-Colesterol(mmol/L) | 0,87±0,53 | 1,31±0,55 | ,009 |
| LDL-Colesterol(mmol/L) | 2,20±0,66 | 2,33±1,04 | ,625 |

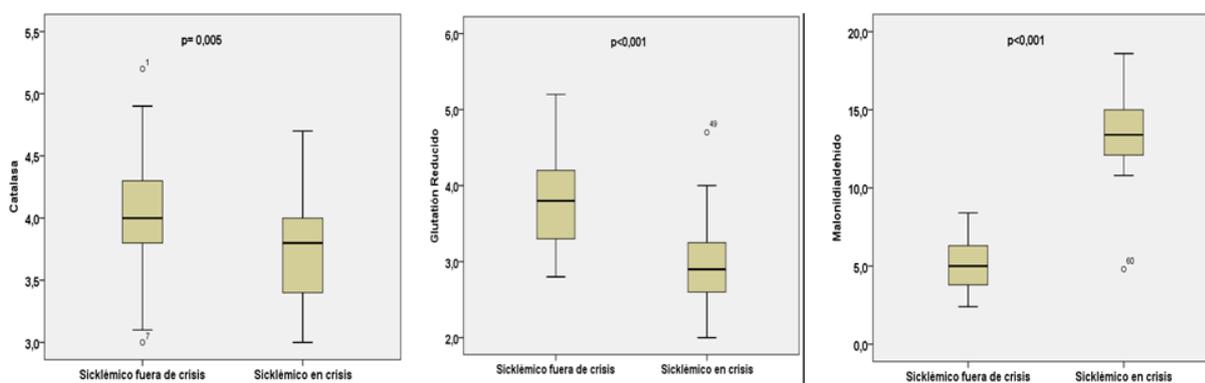


Figura 1. Comparación de marcadores evaluadores del estado redox en pacientes drepanocíticos en CVO y fuera de crisis.



Tabla 2. Correlación entre perfil lipídico y marcadores de estrés oxidativo.

| | COL | TAG | HDL-C | LDL-C | CAT | GSH | MDA |
|-------|--------|--------|---------|-------|---------|---------|-----|
| COL | 1 | | | | | | |
| TAG | ,437** | 1 | | | | | |
| HDL-C | -,003 | -,213 | 1 | | | | |
| LDL-C | ,579** | ,374** | ,070 | 1 | | | |
| CAT | -,057 | -,321* | ,206 | -,152 | 1 | | |
| GSH | -,163 | -,230 | ,147 | -,128 | ,220 | 1 | |
| MDA | ,120 | ,276* | -,396** | -,153 | -,373** | -,374** | 1 |

Se observan niveles significativos de **p <0.01, * p<0,05.