

ACIDO SIALICO SERICO, CARGA ANIONICA Y AGREGACION ERITROCITARIA
EN PACIENTES DIABETICOS E HIPERTENSOSNATALIA LEBENSOHN¹, ANDREA RE¹, LARISA CARRERA², LILIANA BARBERENA²,
MABEL D'ARRIGO¹, PATRICIA FORESTO¹¹Laboratorio Inmunohematología y Hemorreología, Departamento Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, ²Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Resumen El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación del ácido siálico sérico (AS) y la carga aniónica eritrocitaria (CAE) con la agregación eritrocitaria en dos grupos de pacientes: diabéticos (DBT n= 20) e hipertensos (HTA n= 21), comparados con un grupo control (n= 20). Se trabajó con sangre anticoagulada con EDTA y suero. La agregación eritrocitaria se estudió por observación microscópica de los agregados y cuantificación a través de un parámetro de forma denominado ASP (*Aggregation Shape Parameter*). La CAE se determinó por unión a colorante *alcian blue* y el AS por método espectrofotométrico con reactivo de Erlich. Los valores de ASP y AS resultaron significativamente aumentados en los HTA y DBT respecto de los normales. Los HTA y DBT presentaron agregados amorfos, lo que se refleja en los valores alterados de ASP, significativamente mayores ($p < 0.005$) respecto de los individuos normales. Los valores de CAE resultaron significativamente inferiores en los HTA y DBT respecto del grupo control ($p < 0.0001$). En este trabajo se demostraron anomalías en la agregación eritrocitaria, detectadas por los valores de ASP, CAE y AS que podrían estar involucradas en las complicaciones vasculares de vasculopatías como la hipertensión y la diabetes.

Palabras clave: agregación eritrocitaria, ácido siálico, diabetes, hipertensión

Abstract *Serum sialic acid, cellular anionic charge and erythrocyte aggregation in diabetic and hypertensive patients.* The aim of this work was to study the relationship between serum sialic acid (SSA) and erythrocyte anionic charge (EAC) with erythrocyte aggregation in two groups: diabetic (DBT, n=20) and hypertensive (HT, n=21) patients, compared to a control group (n=20). We worked with anticoagulated blood with EDTA and serum. The erythrocyte aggregation was studied by microscopically observing and quantifying aggregates using an ASP (*Aggregate Shape Parameter*). The EAC was determined by binding an Alcian blue dye to the membrane sialic acid and SSA was determined by spectrophotometric method with an Erlich reactant. The values of ASP and SSA increased significantly in HT and DBT patients compared to the control group. The HT and DBT groups showed amorphous aggregates, evident in an alteration in the values of ASP, which were significantly higher ($p < 0.005$) than in healthy patients. The EAC values were much lower in HT and DBT patients than in the control group ($p < 0.0001$). In this work, abnormalities in the erythrocyte aggregation could be detected by the values of ASP, EAC and SSA, which might be involved in vascular disorders of diseases such as hypertension and diabetes.

Key words: erythrocyte aggregation, sialic acid, hypertension, diabetes

Durante las últimas décadas hubo un incremento en el interés de las ciencias básicas y clínicas por las posibles asociaciones entre parámetros hemorreológicos y el desarrollo de complicaciones en vasculopatías como la hipertensión y la diabetes.

La agregación eritrocitaria, el factor celular más importante en la determinación de la viscosidad sanguínea a bajas velocidades de flujo, refleja un delicado balance

entre las fuerzas de adhesión celular (debidas a la adsorción de macromoléculas y a la creación de puentes entre los eritrocitos) y el efecto de las fuerzas de desagregación (como las fuerzas de cizallamiento mecánico, la repulsión electrostática entre las células, entre otros). Cuando la velocidad de deslizamiento de los eritrocitos disminuye, éstos se agregan formando "pilas de moneda" o "rouleaux". Tal fenómeno se observa en los territorios donde la circulación sanguínea es lenta y puede revertirse con el cambio de las condiciones circulatorias; esto es, con el aumento de la velocidad del flujo sanguíneo.

En la hipertensión arterial pueden producirse anomalías de distinto tipo, que ocasionan disfunción endotelial,

Recibido: 26-IX-2008

Aceptado: 12-II-2009

Dirección postal: Dra. Patricia Foresto, Dorrego 2366, 2000 Rosario, Santa Fe, Argentina
Fax: (54-0341) 480-4593

e-mail: pgforesto@yahoo.com.ar

modificación en la liberación de mediadores químicos, aumento de la resistencia y modificaciones en la perfusión de órganos. Es clásico definir a la hipertensión como el producto del gasto cardíaco por la resistencia periférica total (RPT). Esta última surge como consecuencia de la viscosidad sanguínea y la dificultad que la cambiante geometría vascular opone al flujo sanguíneo. Analizando la RPT, es fácil entender entonces el papel decisivo de los factores hemorreológicos a nivel de la microcirculación¹.

En resumen, en la hipertensión y en la diabetes se generarían cambios hemorreológicos en toda la extensión del aparato cardiovascular, quedando por definir si ellos son causa o consecuencia de los mismos.

El ácido siálico (AS) forma parte de oligosacáridos unidos a proteínas de membranas celulares eritrocitarias. Aproximadamente el 80% del ácido siálico en suero humano es N-acetil neuramínico (Neu5Ac; NANA)^{2, 3}.

Algunas de las funciones atribuidas al ácido siálico son: 1) ser constituyente mayoritario de la carga electronegativa de la superficie celular eritrocitaria (CAE), (la carga negativa contribuye a la repulsión celular, por efecto antiagregante, participando en la estabilización de glicoproteínas en circulación e impidiendo las interacciones célula-célula); 2) proteger del ataque proteolítico por sialización de glicoproteínas; 3) participar en el reconocimiento e interacción de mensajeros químicos en tejidos y fluidos biológicos; 4) ser componente de receptores de superficie celular^{4, 5}.

Numerosos trabajos demuestran la relación del ácido siálico sérico con el desarrollo de complicaciones en enfermedades cardiovasculares (ECV). Es considerado como un marcador de riesgo cardiovascular y predictor a largo plazo de ECV⁶⁻⁹.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación del ácido siálico sérico y la carga aniónica con la agregación eritrocitaria, en dos grupos de pacientes: diabéticos e hipertensos, comparados con un grupo control.

Materiales y métodos

Se estudiaron 21 pacientes hipertensos sin tratamiento, no diabéticos, provenientes del Servicio de Clínica Médica del Hospital Provincial del Centenario, entre 32 y 72 años de edad, 20 pacientes diabéticos y 20 individuos normales (la composición de ambos grupos, fue similar en cuanto a sexo y edades). Se realizó una detallada historia clínica y examen físico de los pacientes, incluyendo estudios de laboratorio. Las muestras de sangre fueron extraídas por punción venosa, se trabajó con muestra anticoagulada con EDTA/Na₂ para los estudios hemorreológicos y suero para las determinaciones de AS y CAE. Los hematíes fueron separados por centrifugación y resuspendidos a la concentración requerida para cada estudio. Las determinaciones fueron realizadas en el Laboratorio de Inmunohematología, Hemorreología e Inmunogenética del Hospital Provincial Centenario de Rosario. La presión sanguínea fue medida a la mañana luego de 5 mi-

nutos de reposo, aplicando la técnica tradicional con manómetro de mercurio acorde con la *American Heart Association* y el *British Hypertension Society Standards*.

La estimación cuantitativa de la morfología de los agregados eritrocitarios fue realizada con la técnica denominada ASP (*Agregate Shape Parameter* o parámetro de forma de los agregados). Tal parámetro es definido por la siguiente ecuación:

$$ASP = \frac{4 \cdot \pi \cdot A}{P^2}$$

Donde A es el área proyectada del agregado y P es el perímetro de la imagen proyectada del agregado. Los valores de ASP varían de 0 a 1. En tales condiciones, una esfera, cuya imagen proyectada es un círculo, tendrá un valor máximo de ASP = 1, mientras que un cilindro, cuya área proyectada es un rectángulo, presenta valores de ASP < 1.

El estudio de la morfología de los agregados eritrocitarios, se realizó por análisis de las imágenes digitalizadas de suspensiones eritrocitarias al 1% en plasma autólogo. Se estudió la morfología de los agregados con un microscopio óptico invertido (*Union Optical*, Tokio), las imágenes fueron captadas y registradas por una video-cámara (CCD SONY XC-75), las microfotografías captadas por la videocámara fueron procesadas con un software IPP PLUS 2.1, a través del cual se pudo medir el área y el perímetro de cada agregado. Los valores de ASP calculados se expresaron como el promedio correspondiente a los agregados observados en 20 campos distintos¹⁰⁻¹².

Las determinaciones de AS fueron realizadas mediante método colorimétrico, aplicando hidrólisis ácida del suero en presencia de reactivo de Erlich. La CAE se realizó por unión al colorante catiónico *Alcian Blue*.

El estudio de la asociación de los parámetros ASP, AS y CAE, fue realizado por el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados

La comparación de los valores de las presiones sistólica y diastólica de los individuos hipertensos (156 ± 3 – 101 ± 2 mm Hg) con los controles normotensos (120 ± 2 – 78 ± 2 mm Hg), fue estadísticamente significativa (p < 0.001). Los resultados correspondientes a ASP, AS sérico y la CAE para los grupos estudiados se presentan en la Tabla 1.

Ambos grupos de pacientes presentaron valores de ASP y AS superiores respecto a los normales, cuyas probabilidades fueron p = 0.0048 y p = 0.05 (Tabla 1) respectivamente; mientras que para CAE, los pacientes hipertensos y diabéticos mostraron valores significativamente disminuidos respecto de los controles normales (p = 0.0001). La correlación del ASP con AS y CAE para cada grupo de pacientes resultó significativa.

En la Fig. 1 se pueden observar los patrones de agregación eritrocitaria, resultantes de la observación de las imágenes digitalizadas de los agregados eritrocitarios en ambos grupos, normal y con vasculopatía (hipertensos y diabéticos). En individuos normales, los agregados adoptan la forma de *rouleaux* (apilamiento de discocitos

TABLA 1.— Valores de ASP (Aggregate Shape Parameter), CAE (carga aniónica eritrocitaria) y AS (ácido siálico sérico) en individuos hipertensos, diabéticos y controles normales

Parámetro	ASP	AS (μmol/l)	CAE (%)
Hipertensos	0.69 ± 0.19*	7.62 ± 0.45*	59 ± 3*
Diabéticos	0.65 ± 0.09*	6.80 ± 1.40*	49 ± 2*
Normales	0.28 ± 0.15	5.90 ± 0.50	98 ± 1

Expresados como el promedio ± un desvío estándar

* p < 0.05 respecto al control.

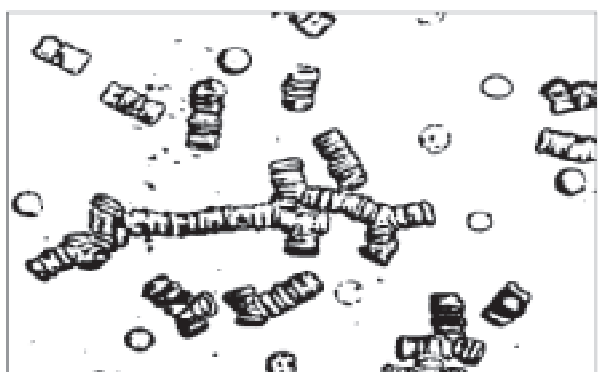
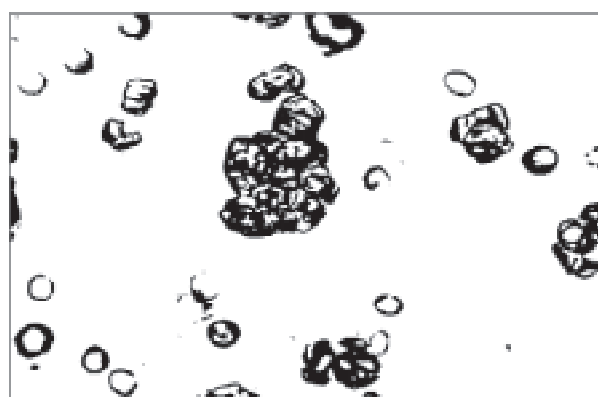


Fig. 1.— Imagen inferior: Patrón normal de agregación eritrocitaria. Imagen superior: Patrón de agregación típico de pacientes con vasculopatías (diabetes e hipertensión)

bicóncavos) que al enlazarse lateralmente se convierten en redes filamentosas más o menos reticuladas. En los pacientes con vasculopatías, los agregados son amorfos, irregulares y se los conoce como *clusters* (agrupamiento de eritrocitos en forma desordenada y globular) lo que refleja una anormal interacción célula-célula.

Discusión

Los mecanismos propuestos de elevación del ácido siálico sérico en pacientes hipertensos y diabéticos no están muy claros, algunas de las hipótesis en la bibliografía plantean que podrían ser por el incremento de proteínas reactivas de fase aguda, influencia de la actividad de la sialil-transferasa, desialización, glicosilación no enzimática de proteínas de membrana¹³⁻¹⁶. Tanto la desialización como la glicosilación no enzimática de proteínas llevarían a una reducción de la carga electronegativa eritrocitaria y esto a una disminución de la repulsión con un incremento en la agregación celular, contribuyendo a alteraciones del flujo microvascular¹⁷⁻¹⁹.

En los diabéticos, la formación de *rouleaux* resulta alterada, produciéndose grandes agregados que se atribuyen a una falla en la dispersión de los mismos y que podrían determinar, como consecuencia, obstrucciones capilares^{20, 21}.

El enlentecimiento del flujo sanguíneo disminuye las fuerzas desagregantes, y la mayor agregación eritrocitaria observada en esta enfermedad dificulta aún más dicho flujo, provocando una situación de retroalimentación que lleva a un aumento de la viscosidad sanguínea.

En hipertensión arterial se supone la existencia de distintas vías y mecanismos que modifican los parámetros hemorreológicos e influyen en la resistencia periférica. En esto, además del diámetro de los vasos, la sangre y sus componentes juegan un papel preponderante a través de la viscosidad sanguínea, las anomalías de deformabilidad y la agregación eritrocitaria. De acuerdo a los resultados obtenidos, se podría pensar que en la hipertensión arterial los eritrocitos estarían sometidos a un mayor contacto y agresión con el endotelio, favoreciendo la desialización de su membrana.

La viscosidad de la sangre a bajas velocidades de corte depende fundamentalmente de la agregabilidad eritrocitaria. Es ésta participan factores plasmáticos (proteínas plasmáticas, como el fibrinógeno) y las características propias de las células que interaccionan entre sí (deformabilidad, agregación celular).

En este trabajo se advierten diferencias estadísticamente significativas en los valores de ASP y de ácido siálico sérico y de membrana, por lo que se puede suponer que las alteraciones hemorreológicas observadas se deban a factores celulares eritrocitarios. Se podría pensar en alteraciones de membranas eritrocitarias con pérdida de ácido siálico y la consiguiente disminución de carga neta de superficie, lo que llevaría a una mayor interacción entre eritrocitos, que se pone de manifiesto por alteraciones en el patrón de agregación y consecuentemente en los valores de ASP. El ASP es un parámetro microrreológico que valora la agregación eritrocitaria, en la que juegan un papel primordial los capilares, cuyos

diámetros pueden llegar al orden del tamaño de los eritrocitos. Cuando se forman agregados irregulares, *clusters*, sus diámetros pueden superar a los de los capilares generando obstrucciones y complicaciones microvasculares²².

Por otra parte, debido al limitado acceso *in vivo* para el análisis del mecanismo de la formación de agregados, el ASP provee una herramienta útil para medir desviaciones en la morfología de los agregados eritrocitarios. A partir de los resultados obtenidos, esta metodología podría contribuir a estudiar y comprender, en parte, los mecanismos involucrados en las alteraciones de agregación eritrocitaria demostrada en los pacientes hipertensos y diabéticos bajo mal control metabólico.

Bibliografía

1. Foresto P, D'Arrigo M, Filippini F, Gallo R, Valverde J, Rasia R. Comparative analysis of aggregate shapes by digitized microscopic images. Application to hypertension. *Clinic Hemorheol Microcirc* 2002; 26: 137-44.
2. Sillanauke P, Ponnio M, Jaaskelainen IP. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eu J Clin Invest* 1999; 29: 413-25.
3. Haverkamp J, Schauer R, Wember M. Neuraminic acid derivatrives newly discovered in humans. Hoppe Seyler's Z. *Physiol Chem* 1976; 357: 1699-705.
4. Schauer R. Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1982; 40:131-234.
5. Kelm S, Schauer R. Sialic acids in molecular and cellular interaction. *Int Rev Cytol* 1997; 175: 137-240.
6. Lindberg G, Eklund GA, Gullberg B, Rastam L. Serum sialic acid concentration and cardiovascular mortality. *Br Med J* 1991; 302: 143-6.
7. Lindbreg G, Rastam L, Gullberg B, Eklund GA. Serum sialic acid concentration predicts both coronary heart disease and stroke mortality: multivariate analysis including 54 385 men and women during 20.5 years of follow up. *Int J Epidemiol* 1992; 21: 253-7.
8. Allain P, Olivier E, Le Bouil A, Benoit C, Geslin P, Tadei A. Increase of sialic acid concentration in the plasma of patients with coronary disease. *Presse Med* 1996; 25: 96-8.
9. Knuiman MW, Watts GF, Divitini ML. Is sialic acid an independent risk factor for cardiovascular disease? A 17-year follow up study in Busselton, Western Australia. *Ann Epidemiol* 2004; 14: 627-32
10. Foresto P, D'Arrigo M, Filippini F, et al. Evaluación de alteraciones hemorreológicas en pacientes hipertensos. *Medicina (Buenos Aires)* 2005; 65: 121-5.
11. Carrera L, Etchepare R, D'Arrigo M, D'Ottavio A, Valverde J, Foresto P. Microangiopatía diabética: modelo discriminante lineal. *Lab Ciencia* 2006; 3: 28-32
12. Foresto P, D'Arrigo M, Filippini F, Gallo R, Valverde J, Rasia R. Comparative analysis of aggregate shapes by digitized microscopic images. Application to hypertension. *Clinic Hemorheol Microcirc* 2002; 26: 137-44.
13. Haq. M, Haq S, Tutt, P, Crook M. Serum total and lipid-associated sialic acid in normal individuals and patient with myocardial infarction and their relationship to acute phase proteins. *Ann Clinic Biochem* 1993; 30: 383-.
14. Nigam PK, Narain VS, Chandra N, et al. Serum and platelet sialic acid in acute myocardial infarction. *Ind J Clinic Biochem* 1995; 10: 106-9.
15. Taniuchi K, Chifu K, Hayastri N, et al. A new enzymatic method for the determination of Sialic acid in serum and its application for a marker for acute phase reactants. *Kobe J Med Sci* 1981; 27: 91-102.
16. Flynn MD, Corral RJM, Waters PJ, Pennock CA. Sialic acid and cardiovascular mortality. *Br Med J* 1991; 302: 533-4.
17. Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G. The role of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem* 1971; 246: 1461-7.
18. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15: 74-80.
19. Lindberg G, Rastom L, Nilsson-Ehle P, et al. Serum sialic acid and asialoglycoproteins in asymptomatic carotid artery atherosclerosis, ARIC Investigators, Atherosclerosis Risk in Communities. *Atherosclerosis* 1999; 146: 65-9.
20. Alet A, Chiesa MA, Racca L, et al. Hemorreología comparativa. Estudios en diabéticos e hipertensos. *Acta Bioq Clínic Latinoam* 2001; 1: 63-8.
21. Carrera L, Etchepare R, Foresto P, D'Arrigo M, D'Ottavio A, Valverde J. La agregación eritrocitaria en la fisiopatogenia de las lesiones cutáneas microangiopáticas diabéticas. *Endocrinol Nutric* 2006; 53: 242-5.
22. Nigam P, Narain V, Kumar A. Sialic acid in cardiovascular diseases. *Ind J Clinic Bioc* 2006; 21: 54-61.

Las dificultades también pasan, como todo pasa, sin dificultad.

Antonio Porchia (1886-1968)

Voces, 2da Edición, Buenos Aires: Hachette, 1979, p 62