

R.23.490

T.D.
R/139



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



**FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANA ERITROCITARIA Y
VISCOSIDAD SANGUINEA EN
HIPERCOLESTEROLEMIAS**

A handwritten signature in black ink, appearing to be "M. Rico Corral".

AUTOR:

FDO.: Miguel Angel Rico Corral

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Antonio Arenal Martin".

DIRECTOR:

FDO.: PROF. DR. ANTONIO ARENAL MARTIN

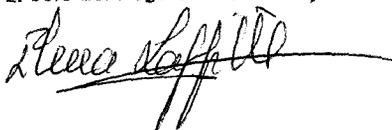
Sevilla, 1995

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 208 número 236 del libro
correspondiente. 11 OCT. 1995

Sevilla, _____

El Jefe del Negociado de Tesis,



ANEXO 14

IMPRESO DE PRESENTACION DE LA TESIS DOCTORAL

APELLIDOS RICO CORRAL NOMBRE MIGUEL ANGEL

PROGRAMA DE DOCTORADO MEDICINA

DEPARTAMENTO EN QUE HA REALIZADO LA TESIS MEDICINA

TITULO DE LA TESIS FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANA ERITROCITARIA Y VISCOSIDAD SANGUINEA EN HIPERCOLESTEROLEMIAS

D./DÑA ANTONIO AZNAR MARTIN, PROF. TITULAR

del Departamento de MEDICINA

, como Director de la Tesis de referencia autoriza su presentación.

Firma: [Handwritten signature]

Sevilla 7 de JULIO de 19.95

D./DÑA

(1) del Departamento de

, como Director de la Tesis/Tutor (2) del alumno de referencia autoriza su presentación.

Firma:

Sevilla de de 19

El Departamento de Medicina

con fecha 11-7-95 autoriza la presentación de la Tesis de referencia.

El Director del Departamento UNIVERSIDAD DE SEVILLA Departamento de Medicina

DIRECCION Firmado: Dr. Ramón Pérez Cano Prof. Dr. R. Pérez Cano

Sevilla 11 de Julio de 19.95

(1) Catedrático, Profesor Titular, Catedrático E.U., etc. (2) Táchese lo que no proceda. Este apartado se rellenará sólo en el caso de ser dos los Directores de Tesis, o de que el Director de la Tesis no sea Profesor del Departamento responsable.

A mi abuela

A mi madre

A Lola, mi mujer

A mi hija Mercedes

AGRADECIMIENTOS:

Al Profesor Dr. Antonio Aznar Martín, por sus ideas y dirección a lo largo de la realización de este trabajo.

A los Doctores Juan Manuel de la Vega Vázquez y Carlos Holgado Silva, a los que considero, junto con el Dr. Aznar Martín, mis maestros.

Al Profesor Dr. Eduardo Zamora Madarúa, Jefe de Servicio de Medicina Interna del Hospital Virgen Macarena, por su dirección durante mi formación como Especialista y su apoyo en mi actividad profesional.

A D. Antonio Raya Muñoz, Enfermero, Supervisor de Enfermería en nuestro Servicio de Medicina Interna del Hospital Virgen Macarena, por su paciencia y profesionalidad.

A todo el resto del personal de nuestro Servicio de Medicina Interna, por su amable y permanente colaboración.

A los Servicios de Hematología y Bioquímica del Hospital Virgen Macarena, por su ayuda con el proceso de las muestras y en la recopilación de datos.

Al personal del Departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología de la Universidad de Sevilla, por su cooperación y amistad.

Mi agradecimiento más ferviente está destinado al Profesor del Departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología de la Universidad de Sevilla Dr. Francisco Javier Miñano Sánchez, de quien obtuve en todo momento apoyo cordial y un imprescindible asesoramiento científico a lo largo de la multitud de problemas que se plantearon durante la realización del presente trabajo. Su tenacidad en el trabajo diario y su rigurosidad intelectual, junto con su paciencia y sencillez me han sido útiles para vislumbrar las dificultades y sobre todo, las grandezas del verdadero trabajo científico.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
1) Concepto de arterioesclerosis.....	1
2) Patogénesis de la arterioesclerosis.....	2
A) Alteraciones a nivel molecular.....	2
B) Alteraciones hemorreológicas.....	5
B-1) Concepto de hemorreología.....	5
B-2) Viscosidad sanguínea y conceptos relacionados.....	6
B-3) Arterioesclerosis y viscosidad sanguínea.....	9
B-4) Viscosidad sanguínea e hiperlipemia.....	10
3) La membrana celular eritrocitaria.....	11
A) Composición.....	11
B) Estructura macromolecular.....	13
4) Fosfolípidos de membrana.....	17
5) Lípidos de membrana eritrocitaria y su papel en el proceso arterioesclerótico: Conocimientos actuales.....	21
 HIPOTESIS	 26
MATERIAL Y METODOS.....	27
1) Material.....	27
A) Material fungible.....	27
B) Reactivos.....	27
C) Aparatos y sistemas.....	28
2) Población de estudio.....	29
A) Casos.....	29

B) Controles.....	30
3) Métodos.....	30
A) Medición de la viscosidad sanguínea.....	30
B) Medición de fosfolípidos de membrana.....	32
1) Extracción.....	32
2) Análisis HPLC.....	34
RESULTADOS.....	36
A) Análisis comparativo.....	36
1) Viscosidad sanguínea.....	40
2) Fosfolípidos de membrana eritrocitaria.....	43
B) Estudio de correlaciones.....	46
1) Controles sanos.....	46
2) Hipercolesterolemia.....	56
DISCUSION.....	59
CONCLUSIONES.....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	72

INTRODUCCION

1) CONCEPTO DE ARTERIOESCLEROSIS:

La arterioesclerosis es la principal causa de morbimortalidad en los países Occidentales. Hasta el momento, se ha considerado que la base fundamental para el desarrollo de esta enfermedad es la obstrucción progresiva de los vasos sanguíneos motivada específicamente por la placa de ateroma. Se conocen varios factores que influyen de forma positiva en la aparición y crecimiento de dicha placa, como son el tabaquismo, la Hipertensión arterial, la Diabetes Mellitus y las Hiperlipemias. Con respecto a éstas últimas, se ha comprobado que tanto hipertrigliceridemias como hipercolesterolemias son situaciones predisponentes al desarrollo de arterioesclerosis, si bien el efecto es más evidente y rápido en las hiperlipemias relacionadas con un exceso de Colesterol plasmático, en concreto aquellas en las que la fracción de Colesterol incrementada corresponde a la denominada de Baja Densidad (LDL).

Si atendemos a la clasificación de Friedrikson de las hiperlipemias en relación al fenotipo expresado, las situaciones de mayor riesgo aterogénico, por implicar aumentos séricos de la fracción LDL-Colesterol, son las correspondientes a los fenotipos denominados IIa y IIb. En la hipercolesterolemia fenotipo IIa tiene lugar exclusivamente un incremento de la fracción LDL, mientras que en la IIb se añade una hipertrigliceridemia que se refleja en un incremento de la fracción de Colesterol de Muy Baja Densidad (VLDL).

Ahora bien, las más recientes investigaciones están concediendo una importancia creciente al papel de dos tipos de fenómenos inherentes a la circulación sanguínea en el desarrollo del proceso aterogénico:

Por un lado, las alteraciones que tienen lugar a nivel molecular en todos los elementos implicados en la microcirculación, es decir, el propio plasma, las células endoteliales y las células sanguíneas.

Por el otro, las alteraciones hemorreológicas, esto es, variaciones patológicas de las propiedades físicas de la circulación de la sangre, como un fluido complejo que es.

Estos dos grupos de fenómenos hacia los que se orientan las nuevas líneas de investigación en arterioesclerosis en los últimos años no se refieren a situaciones pro-aterogénicas en sí mismas, sino que más bien parece tratarse de procesos relacionados entre sí y comunes a muchas de las entidades que sí son pro-aterogénicas, y que por tanto pueden ayudarnos a comprender más profundamente la génesis de este trastorno circulatorio.

En consecuencia, revisaremos a continuación el estado de los conocimientos actuales sobre estos fenómenos y su relación con la hipercolesterolemia, motivo de nuestro estudio.

2) PATOGENESIS DE LA ARTERIOESCLEROSIS:

A) ALTERACIONES A NIVEL MOLECULAR:

El modelo más recientemente publicado acerca de la influencia a nivel molecular del Colesterol plasmático en el desarrollo de la placa de ateroma es el siguiente (1):

En la génesis de la lesión arterioesclerótica participan 4 tipos celulares diferentes: Las células endoteliales, el músculo liso vascular, macrófagos y linfocitos. Todas ellas tienen una capacidad de acción oxidante sobre la LDL circulante. Dicho proceso de oxidación es un fenómeno local de la lesión aterosclerótica y se debe a la acción de los radicales libres. En este sentido, Halliwell (2) comenta la participación del Oxido Nitroso (NO), secretado por la propia célula endotelial. Conocemos que esta sustancia, cuando se encuentra en pequeñas concentraciones, participa en la destrucción de organismos extracelulares fagocitados y es mediador de algunos efectos de la inflamación aguda. Por el contrario, a altas concentraciones se le atribuye un claro efecto citotóxico. Hasta el momento, no disponemos de datos ciertos acerca de su posible papel en la arterioesclerosis.

En el lado opuesto, existen sustancias con poder anti-oxidante que podrían contribuir a contrarrestar este fenómeno. Por ejemplo, se ha demostrado este efecto en primates con la Vitamina C.

El proceso habitual consiste en una internalización de la LDL por el macrófago, que por este mecanismo se transforma en una célula espumosa. Ahora bien, en este punto puede tener lugar la participación de la denominada LDL-débilmente oxidada:

Esta sustancia es capaz de activar los genes para el Factor Quimiotáctico de Monocitos-1, tanto en células endoteliales como en músculo liso y además favorece la unión directa de Monocitos a células endoteliales. Posiblemente, ésta es la causa de que sean precisamente los magnitudes las primeras células que penetran en la pared arterial al inicio de la lesión arterioesclerótica. Una vez localizados en este lugar, los propios magnitudes

transforman esta LDL-débilmente oxidada en LDL altamente oxidada, la cual es posteriormente captada por los receptores scavengers de los macrófagos previamente a su transformación en células espumosas.

Este papel del mecanismo de oxidación en el proceso aterosclerótico explica igualmente el conocido efecto anti-aterógeno de la fracción de Alta Densidad (HDL) del Colesterol, ya que los lípidos incluidos en dicha lipoproteína son más rápidamente susceptibles de oxidación que los de la LDL (3), lo que contribuye a una disminución en la producción de LDL oxidada. Además, este efecto se ve reforzado por la acción de la HDL de estimular la secreción macrofágica de Prostaciclina, sustancia de conocido poder antiagregante y vasodilatador, mientras que similar efecto tiene la fracción LDL con el Tromboxano, sustancia que por el contrario tiene efecto vasoconstrictor y proagregante (4).

Tras este proceso metabólico inicial, tiene lugar un proceso proliferativo, con abundante participación de factores quimiotácticos y mitógenos (5), entre los cuales se han comunicado los siguientes: Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), Factor Alfa de Crecimiento y Transformación (TGF-Alfa) y también su forma Beta, aunque de ésta se ha descrito también la acción contraria anti-mitótica, el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF-Alfa) y el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PGDF).

El producto final estos procesos bioquímicos es el desarrollo proliferativo de una placa en la pared vascular en la que se ven involucradas las cuatro líneas celulares mencionadas, que en estadios más avanzados puede llegar a sufrir una calcificación que incluso puede afectar a la pared vascular adyacente libre de ateroma, como parte del proceso

degenerativo, y que con su crecimiento facilitará la obstrucción del vaso afecto.

B) ALTERACIONES HEMORREOLOGICAS:

Desde los primeros trabajos de Ditenfass en 1968 (6) y los siguientes (7, 8, 9, 10) sabemos que existen fenómenos intrínsecamente sanguíneos, aparte los propiamente vasculares, que pueden tener influencia en las alteraciones de la dinámica circulatoria. Dichos fenómenos se engloban bajo el concepto de la hemorreología.

B-1) CONCEPTO DE HEMORREOLOGIA:

Debemos a Copley la introducción de este término, definido como "la ciencia concerniente a la deformación y a las propiedades del flujo celular y plasmático de la sangre, en sus dimensiones macroscópicas, microscópicas y submicroscópicas y a las propiedades reológicas de la estructura de los vasos con los cuales la sangre entra en contacto directo".

De las múltiples observaciones de que el flujo sanguíneo depende, no sólo de la fuerza bombeante del miocardio y de la resistencia al mismo que realiza el árbol vascular, sino además de la propia resistencia al flujo de la sangre, deriva el creciente interés actual por la Hemorreología.

De las principales características hemorreológicas de la sangre susceptibles de ser estudiadas en un laboratorio y con mayor interés clínico, a saber, agregabilidad, deformabilidad y filtrabilidad eritrocitarias y viscosidad sanguínea, es ésta última, por su

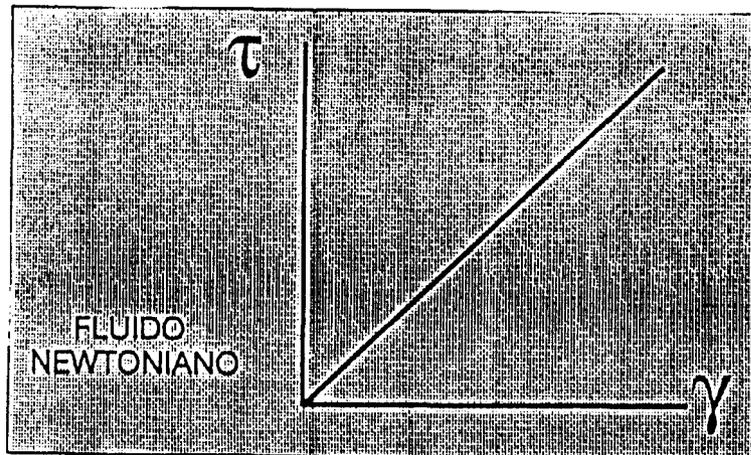
importancia y facilidad de medición, la que ha centrado nuestro estudio.

B-2) VISCOSIDAD SANGUINEA Y CONCEPTOS RELACIONADOS:

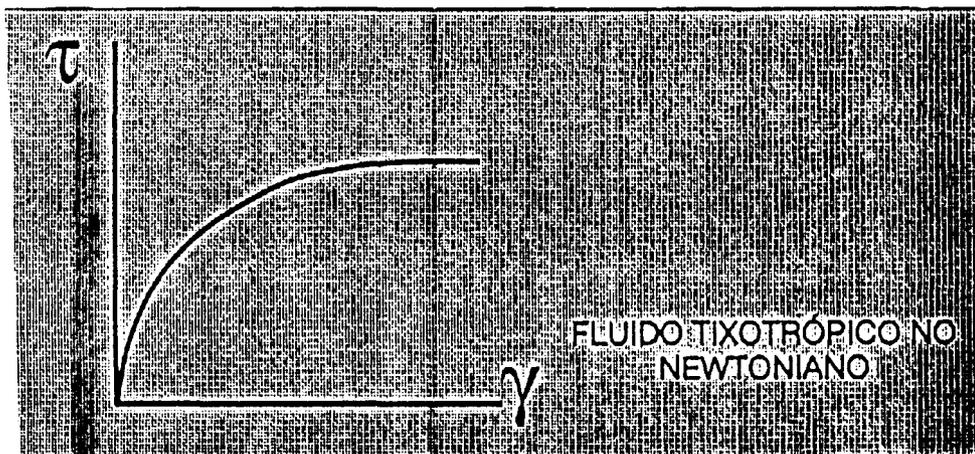
La viscosidad de un fluido se define como la resistencia de un sistema de conducción a la fricción entre dos capas adyacentes del mismo. Más concretamente, se define como la relación entre la llamada Fuerza de Cizallamiento o Shear Stress (SS o Tau en el esquema) y la Tasa de Cizallamiento o Shear Rate (SR o Gamma en el esquema) (Figura 1). La unidad de viscosidad es el Poise, aunque para usos prácticos se emplea el Centipoise (cps).

Se define un fluido como newtoniano cuando la relación entre SS y SR a una presión y una temperatura determinadas es constante. Por el contrario, un fluido se considera no newtoniano o tixotrópico cuando dicha relación no es constante. El plasma tiene un comportamiento newtoniano. La sangre, por la sumación de células, fundamentalmente los eritrocitos, y el plasma, se considera un fluido no newtoniano, y ello se pone de manifiesto fundamentalmente con bajas tasas de cizallamiento.

En Hemorreología es fundamental el denominado fenómeno de Fahraeus-Lindqvist, que consiste en que la viscosidad de la sangre a nivel capilar disminuye de forma progresiva a medida que también disminuye el diámetro del vaso, hasta un dintel del mismo de 5 micras, punto por debajo del cual tiene lugar un aumento exponencial de la viscosidad, lo que ha dado en denominarse Fenómeno de Inversión. Son posibles cambios en la viscosidad interna del eritrocito los que explicarían dicho fenómeno.



A



B

Figura 1.- A: Relación entre Fuerza y Tasa de Cizallamiento en un fluido newtoniano. B: Relación entre Tasa y Fuerza de Cizallamiento en un fluido no newtoniano.

En cuanto a la medición de la viscosidad sanguínea, las lecturas más aproximadas a la situación *in vivo* pueden obtenerse en la actualidad con los sistemas de viscosimetría rotacional cono-placa introducidos en 1961 por Wells, Denton y Merrill. Los factores que afectan a la viscosidad sanguínea pueden clasificarse en macro y microrreológicos:

-FACTORES MACRORREOLOGICOS: Se incluyen el valor hematocrito, la concentración de proteínas plasmáticas, fundamentalmente globulinas y fibrinógeno y la concentración de lípidos plasmáticos.

-FACTORES MICRORREOLOGICOS: Se consideran dos factores referidos al hematíe: la deformabilidad y la agregabilidad eritrocitarias.

La deformabilidad eritrocitaria es esencial para la circulación de estas células a través de los capilares, ya que el diámetro de los capilares más finos oscila entre 3 y 5 micras, mientras que el del hematíe es de 7-8 micras; esto implica la adopción por parte del eritrocito de peculiares formas para su deformación, lo que garantiza el comportamiento de la sangre en estos territorios vasculares como un fluido simple, a menos que exista un trastorno en el contenido del hematíe o en su membrana que altere esta deformabilidad. Esto es todavía más importante si consideramos que a estos niveles del árbol vascular no existen fibras musculares lisas que pueden regular el tono del vaso, por lo que la circulación depende exclusivamente de las características físico-químicas de la sangre. De este modo, el grado de deformabilidad eritrocitaria es un factor clave para un adecuado aporte de oxígeno a los tejidos.



En cuanto a la agregación eritrocitaria, se trata de un fenómeno fisiológico y reversible que se favorece sobre todo en la microcirculación, donde existen bajas fuerzas de cizallamiento y que debe distinguirse del fenómeno de aglutinación, que no es fisiológico ni reversible. Esto da lugar a los denominados rouleaux o agrupamientos de hematíes en forma de tirabuzones o apilamientos de monedas, mediante la formación de puentes intercelulares constituidos por fibrinógeno y globulinas. Muchas enfermedades circulatorias que originan éstasis sanguínea favorecen este fenómeno de agregación eritrocitaria, el cual a su vez da lugar a un incremento en la viscosidad sanguínea, originándose de esta forma un círculo vicioso, ya que la hiperviscosidad de la sangre acentúa aún más el enlentecimiento de la circulación.

B-3) ARTERIOESCLEROSIS Y VISCOSIDAD SANGUINEA:

Sobre la viscosidad sanguínea influyen las características del árbol vascular, ya que el diámetro del vaso influye directamente en la velocidad del flujo. Cualquier enlentecimiento del mismo, por ejemplo por ateromatosis que produzca una disminución de la luz vascular, favorece un aumento de la viscosidad sanguínea, lo que a su vez favorecerá la isquemia tisular. Esto obliga a los tejidos a activar su metabolismo anaeróbico, cuyo resultado final es una hiperproducción de los Ácidos Láctico y Pirúvico y de Iones Potasio. Esto lleva directamente a una situación de acidosis e hiperosmolaridad, la cual empeora aún más la capacidad de deformación eritrocitaria, cerrándose de esta forma un círculo patológico cuyo resultado final es la muerte del tejido afecto.

De este modo, comprobamos que todo deterioro hemorreológico tiene una gran

importancia en la fisiopatología de la arterioesclerosis, mientras que la placa de ateroma por sí misma sería la desencadenante del proceso.

En este sentido, han sido publicados múltiples trabajos que relacionan estados de aumento de la viscosidad sanguínea con accidentes obstructivos vasculares, especialmente en los territorios cerebral y miocárdico, y especialmente durante la fase aguda de los mismos (11, 12, 13).

B-4) VISCOSIDAD SANGUINEA E HIPERLIPEMIAS:

Así como en otra situación pro-aterogénica como es la Hipertensión Arterial sí ha sido ampliamente estudiada su relación con estados de hiperviscosidad sanguínea (14, 15, 16), no disponemos de tan amplia variedad de datos en situaciones de hiperlipemias.

Se han comunicado situaciones de hiperviscosidad sanguínea en situaciones de hipertrigliceridemia (17, 18), fundamentalmente las secundarias, y de forma particular en la asociada a Diabetes Mellitus. Del mismo modo, también se han descrito aumentos de la viscosidad sanguínea en la hiperlipemia fenotipo II, existiendo datos controvertidos acerca del papel que puede jugar aquí una disminución de la deformabilidad eritrocitaria. En este sentido, Poredos (19) descubre una relación independiente entre el aumento del Colesterol plasmático y la hiperviscosidad sanguínea, encontrando una correlación negativa entre viscosidad sanguínea y la tasa de HDL-Colesterol. Esta hiperviscosidad puede reflejar el aumento del hematocrito y/o del fibrinógeno que suelen acompañar a la hipercolesterolemia, o incluso el propio exceso de lípidos circulantes, pero es factible suponer que debe existir

además un trastorno microrreológico añadido, aún por determinar.

Una vez establecidas las bases de la participación del eritrocito en la regulación de la viscosidad sanguínea y su relación con el proceso aterosclerótico, es fundamental conocer la fisiología del órgano celular básico responsable del comportamiento microrreológico de esta célula, que es la membrana celular.

3) LA MEMBRANA CELULAR ERITROCITARIA:

A) COMPOSICION:

En base a estudios sobre "ghosts", o eritrocitos vaciados de su contenido por medios osmóticos, de los que se conserva intacta su membrana celular (20), podemos afirmar que la composición porcentual básica de la membrana eritrocitaria es la siguiente (21, 22):

-LIPIDOS: Constituyen entre el 30 y el 50% de la composición total. Podemos distinguir los siguientes constituyentes fundamentales:

-COLESTEROL: Representa el 25-30% del total. Predomina en la capa externa de la membrana. Se interpreta su papel como el de una molécula rellena de cavidades, en equilibrio con el medio y con influencia en la permeabilidad al agua y solutos.

-GLICOLIPIDOS: Constituyen el 10% del contenido lipídico total.

-FOSFOLIPIDOS: Representan la fracción lipídica más importante, con un 60% del total. Cuantitativamente, existe un predominio de la Fosfatidil-Colina (PC), que tiende a situarse, junto con la Esfingomielina (SPH), en la capa externa de la membrana. Por contra, los Aminofosfátidos tienden a colocarse en el lado interno.

Se ha establecido que el rango de normalidad del cociente entre Colesterol y Fosfolípidos totales es 0.8-1.2.

-ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS: En su cuantía existen variaciones individuales. Su grado de saturación parece estar en relación con el aumento de la concentración de SPH y Glicolípidos.

-PROTEINAS: Incluyen proteínas estructurales, como la Estromatina, y proteínas contráctiles.

-CARBOHIDRATOS: Destacan la Hexosamina y el Acido Siálico; este último participa en el control de la agregabilidad eritrocitaria.

B) ESTRUCTURA MACROMOLECULAR:

Como podemos apreciar en el esquema, los fosfolípidos de membrana se orientan en forma de doble capa, con sus cadenas largas en ángulo recto con el plano de la membrana y sus extremos polares frente al medio acuoso a ambos lados de la membrana.

El modelo actual más satisfactorio de estructura de membrana es el mosaico fluido, postulado por Singer y Nicolson en 1972 (23). Este modelo afirma que los fosfolípidos de las membranas se hallan ordenados en bicapas formando una matriz fluida, debido a la capacidad de las moléculas lipídicas individuales de moverse lateralmente, lo que además concede a la membrana flexibilidad y una resistencia eléctrica característicamente elevada y una relativa impermeabilidad respecto a moléculas muy polares. Este modelo postula asimismo que las proteínas son globulares y algunas de ellas se encuentran parcialmente empotradas en la membrana, penetrando en la fase lipídica desde cada lado, mientras que otras se encuentran totalmente sepultadas dentro de ella. La secuencia aminoácida de la proteína y la localización sobre su superficie de los grupos R no polares de los aminoácidos determinan la extensión con que cada proteína globular penetra en el interior de la fase lipídica. Las proteínas pueden difundir lateralmente en dos dimensiones dentro de la membrana. Se supone que la viscosidad relativa de la bicapa lipídica es de 100 a 1.000 veces superior a la del agua.

Este modelo interpreta satisfactoriamente muchas características y propiedades de las membranas biológicas. Es aplicable a membranas con contenidos de proteínas muy diferentes

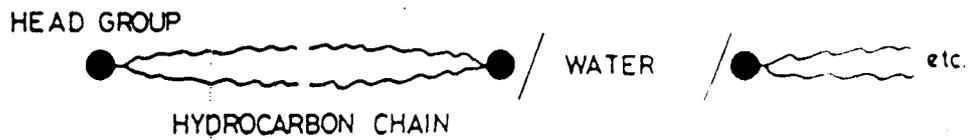
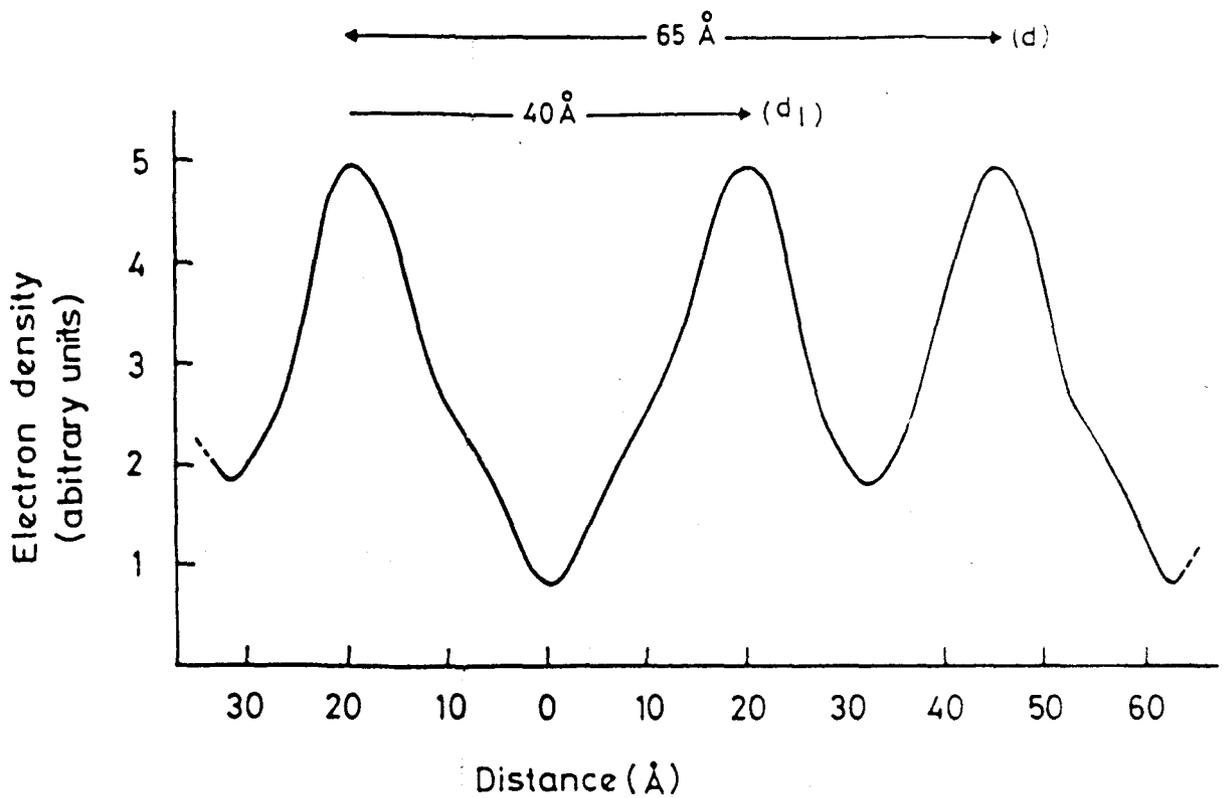


Figura 2.- Esquema de la disposición de las moléculas de Fosfolípidos en la membrana celular, en correspondencia con un esquema idealizado de un perfil de densidad electrónica de una bicapa fosfolipídica en un medio acuoso.

por unidad de superficie membranosa; explica la variación de espesor de diferentes tipos de membranas y permite interpretar la asimetría de las membranas naturales. También interpreta las propiedades eléctricas y de permeabilidad de las membranas.

También se han determinado diferencias en el Cociente Colesterol/fosfolípidos a ambos lados de la bicapa que podrían justificar ciertas asimetrías encontradas en los estudios de electrodensidad.

Para estudios dinámicos de esta estructura se recurre a la formación, mediante agitación ultrasónica en agua, de estructuras bilaminares, también llamadas lamelares o liposomas. En base a los mismos, se ha llegado al conocimiento de ciertos mecanismos funcionales de los lípidos de membrana, que afectan fundamentalmente al estado de rigidez o fluidez de esta estructura.

Así, se conoce la existencia de una llamada Temperatura de Transición de Fase (T_c), alrededor de la cual se mantiene una adecuada movilidad de la cadena hidrocarbonada, mientras que con temperaturas por debajo de la misma, la membrana alcanza un estado de rigidez casi cristalino, con movilidad casi nula. A esto último se denomina Fenómeno de Condensación. Para una determinada clase de Fosfolípidos, la T_c depende de la naturaleza de las cadenas hidrocarbonadas, de forma que, cuanto más cortas y más insaturadas sean, más baja es la T_c . El efecto de adición de Colesterol a una bicapa fosfolipídica es que, en un rango relativamente amplio de temperatura alrededor de la T_c , las cadenas se mantienen en un estado intermedio entre el cristalino y el líquido, que se denomina fase intermedia de gel. Esto ocurre en base a una interacción de dos moléculas de Fosfolípido con cada

molécula de Colesterol. Ello podría correlacionarse con el hallazgo de un descenso de la permeabilidad de la bicapa lipídica comprobado después de forzar la incorporación de Colesterol a uno de estos liposomas de Fosfolípidos. Sin embargo, existen estudios en los que no se han demostrado alteraciones significativas en otras propiedades, como la fragilidad osmótica eritrocitaria o la permeabilidad a solutos no iónicos tras la eliminación de hasta un 30% del Colesterol de eritrocitos humanos.

Hasta aquí, los datos mencionados son referidos a liposomas. Sin embargo, en células normales no se ha demostrado la existencia de ninguna fase de transición dependiente de temperatura en la bicapa, mientras que sí conocemos que la presencia de esteroides en la misma influye en su permeabilidad, a través de un aumento de la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas. Así, la presencia de Colesterol en la membrana eritrocitaria evita la cristalización de la cadena hidrocarbonada a temperatura corporal, colaborando al mantenimiento del estado de gel.

De todo lo anterior se deduce que la dinámica de la bicapa lipídica depende, no sólo de su contenido en Colesterol, sino de las interacciones entre éste y los Fosfolípidos.

Se ha intentado cuantificar dicha interacción mediante el cociente Colesterol/Fosfolípidos, parámetro que muestra alteraciones en determinadas entidades en las que existe patología celular morfofuncional. Así, por ejemplo, en ciertas hepatopatías se de un incremento del Colesterol de membrana eritrocitaria, llegando a producirse cocientes Colesterol/Fosfolípidos de hasta 1.5, coincidiendo con un descenso de la fragilidad osmótica de estos eritrocitos. Por otro lado, se ha comprobado en ciertas leucemias un descenso del

cociente Colesterol/Fosfolípidos, relacionándose ésto con un aumento de la fluidez de membrana en células afectas.

Es por ello que podemos considerar básico el papel de los Fosfolípidos de membrana eritrocitaria en cualquier alteración que influya en el comportamiento dinámico del hematíe en la circulación, por su importancia en los fenómenos que regulan la fluidez de membrana y por lo tanto en la capacidad de deformación celular.

4) FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANA

Como puede apreciarse en los esquemas, la composición química de los fosfolípidos (23, 24, 25, 26, 27, 28) se basa en una molécula de glicerina, uno de cuyos grupos hidroxilo primarios se halla esterificado por el ácido fosfórico, mientras que los demás grupos hidroxilo lo están por ácido grasos. Se definen como compuestos anfipáticos, ya que están constituídos por una cabeza polar, en la que se encuentran el ácido fosfórico y el radical específico de cada fosfolípido, y una cola no polar, compuesta por las cadenas de los ácidos grasos, siendo habitual que el saturado se coloque en el Carbono 1 y el insaturado en el 2 (ver esquema).

Los Fosfolípidos de membrana más importantes son: Fosfatidil-Colina (PC), Fosfatidil-Inositol (PI), Fosfatidil-Serina (PS), Fosfatidil-Etanolamina (PE) y Esfingomielina (SPH).

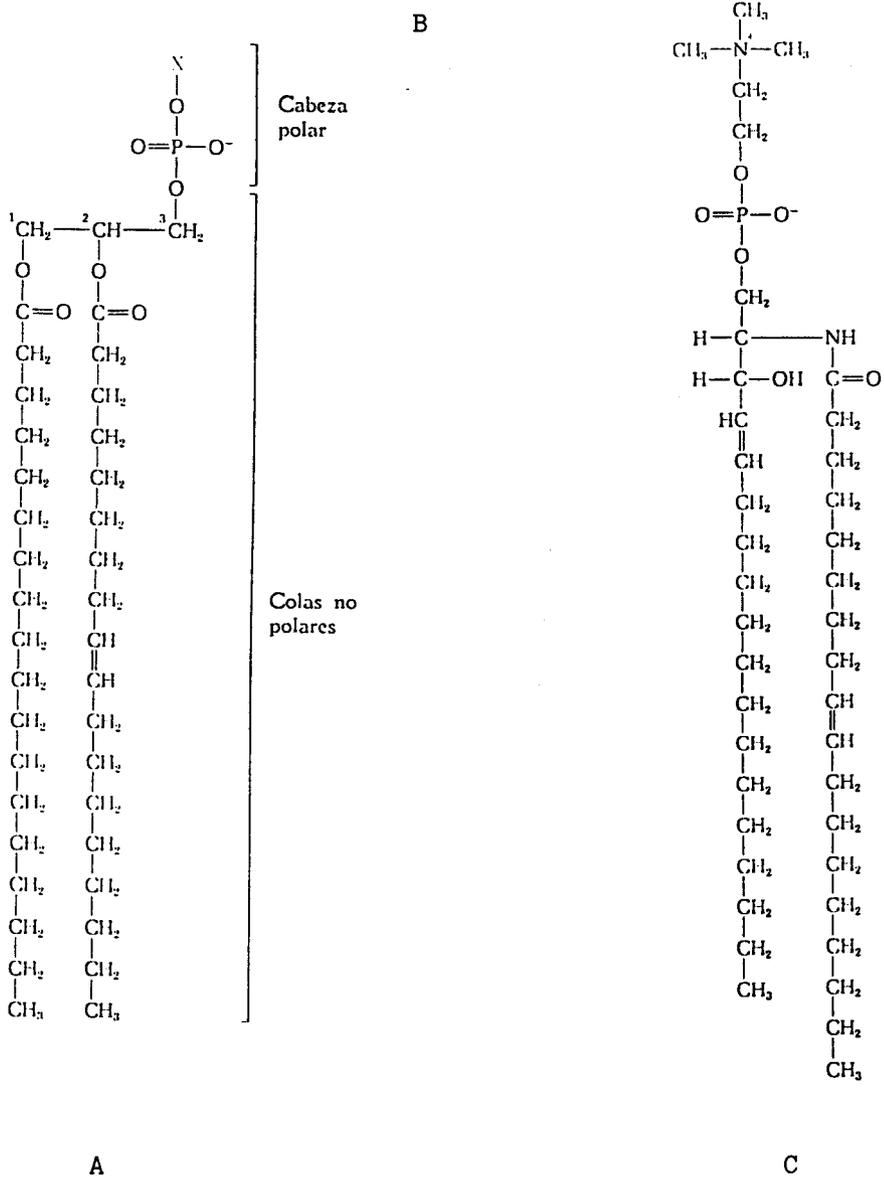
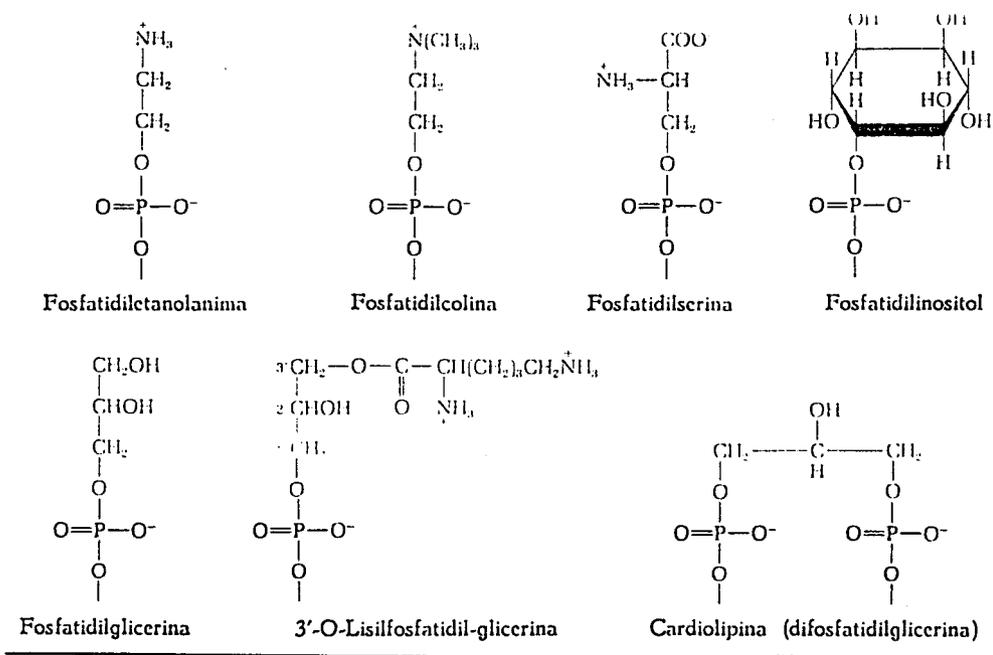


Figura 3.- A: Esquema general de la composición química de un Fosfolípido. B: Algunos Fosfolípidos importantes. C: Esfingomielinina.

En la mayoría de células animales, el más importante es la PC o Lecitina, en cuyo grupo polar aparece el aminoalcohol Colina. En su síntesis participa un enzima Fosfatasa, la cual actúa sobre el Acido Fosfatídico para dar lugar a PC, previa formación de un Diglicérido. El aminoalcohol de la cabeza polar de la PE, también cuantitativamente muy importante en células superiores, es evidentemente la Etanolamina. En cuanto a la PS, constituye el 5-10% de la composición fosfolipídica total de membrana y en ella es el aminoácido Serina el que se une al Acido Fosfórico en el extremo polar de la molécula. Por un proceso de decarboxilación, puede dar lugar a PE. En el PI, el radical de la cabeza polar unido al fosfórico es azúcar-alcohol cíclico Inositol. En cuanto a la SPH, contiene Fosforil-Etanolamina o Fosforil-Colina en su grupo polar, y posee propiedades físicas muy semejantes a las de PE y PC.

La Figura 4 ilustra las posibilidades de interacciones entre estos compuestos, y de ellos se deducen múltiples posibles variaciones metabólicas que pueden acontecer en los procesos patológicos que afecten a la membrana celular.

Los lípidos de la membrana eritrocitaria, no sólo los Fosfolípidos, participan en una dinámica de intercambio a nivel circulatorio con otras estructuras portadoras de lípidos como más adelante veremos y ello parece tener fundamental importancia a la hora de comprender algunos de los pasos íntimos del proceso arterioesclerótico, de ahí nuestro interés en el presente estudio. Por lo tanto, es prioritario establecer las bases teóricas de conocimiento actual sobre este tema y a ello dedicamos el siguiente apartado.

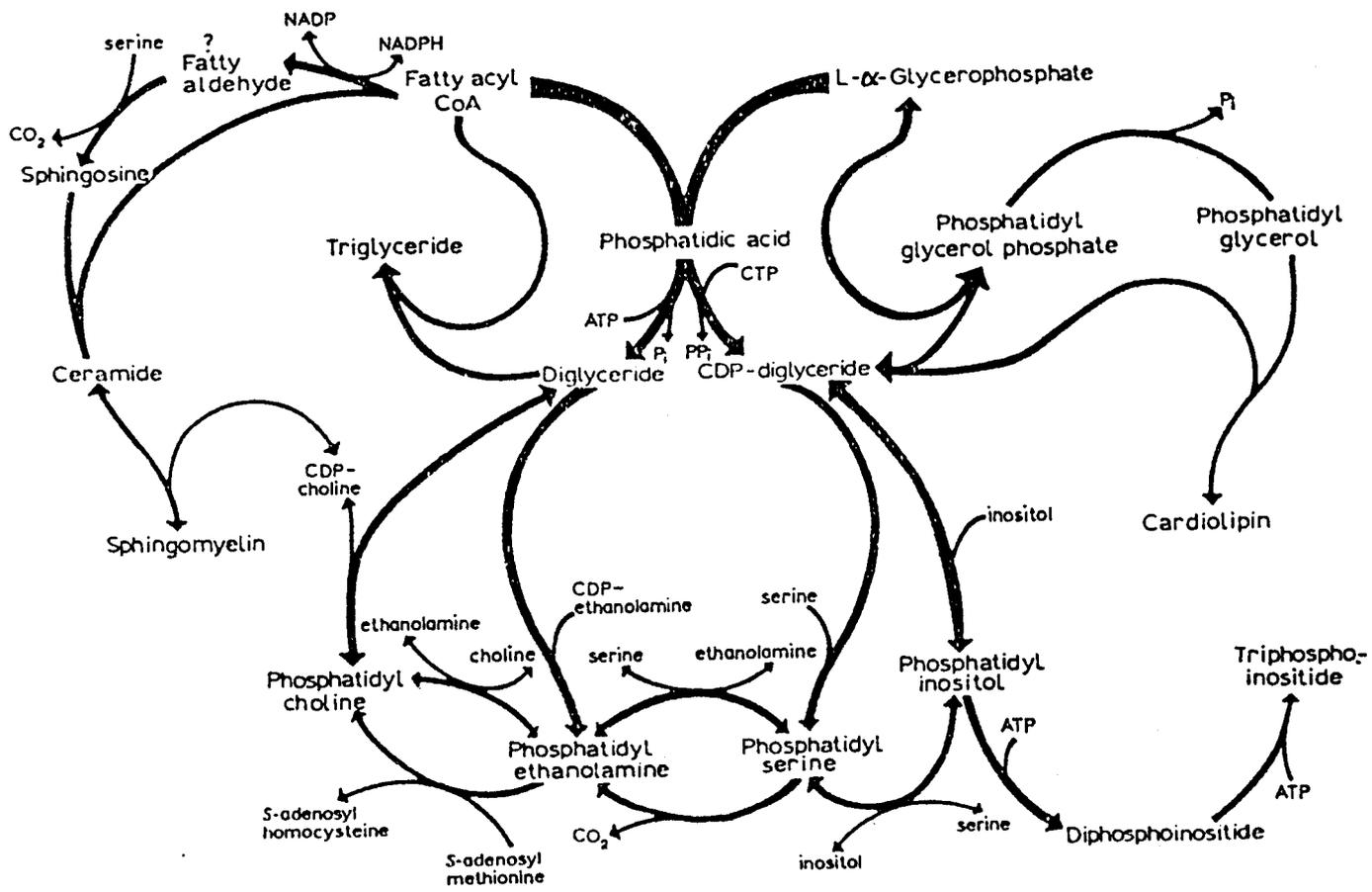


Figura 4.- Metabolismo de los Fosfolípidos.

5) LIPIDOS DE MEMBRANA ERITROCITARIA Y SU PAPEL EN EL PROCESO ARTERIOESCLEROTICO: CONOCIMIENTOS ACTUALES:

Tanto los Fosfolípidos como el Colesterol de membrana celular del eritrocito, tan importantes como hemos visto en la regulación de la fluidez de dicha membrana, están en intercambio con el plasma circulante, como publica Engelmann (29). Este intercambio puede realizarse, bien de forma espontánea o bien mediante factores específicos de transporte (30).

Así, Kozar (31) comunica que las membranas celulares son una importante fuente potencial de fosfolípidos plasmáticos, existiendo una transferencia mediada por proteínas hacia la HDL, lo cual constituye la vía más importante de transporte desde las células hacia el plasma, pudiendo esto representar una posibilidad de intervención anti-ateroesclerótica. Sin embargo, Engelmann (29) afirma que los receptores de HDL no son importantes para la salida de Colesterol celular mediado por HDL; en esto puede ser importante la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana celular.

Del mismo modo, Gold (32) sugiere que las interacciones Colesterol-Fosfolípidos no son sensibles a ciertas alteraciones de membrana, como las modificaciones proteicas del citoesqueleto o la eliminación del mismo, o ciertos cambios fosfolipídicos, como los que afectan al cociente SPH/PC.

Esta dinámica de intercambio de lípidos entre membrana celular y plasma parece afectar a la propia composición de la lesión arterioesclerótica. En este sentido, Mukhin (33) ha encontrado que las células de la lesión aterosclerótica tienen una mayor concentración

de lípidos que las zonas no afectas de la íntima; concretamente, se han encontrado, en la capa elástica, aumentos de las concentraciones de Colesterol y sus ésteres, Triglicéridos y Fosfolípidos. Este aumento no es proporcional, en comparación con los lípidos tisulares, y parece que la mayor participación en este fenómeno corresponde a la propia célula endotelial.

De la existencia de este intercambio cabe deducir la posible existencia de alteraciones de la composición lipídica de la membrana celular eritrocitaria en todas aquellas situaciones predisponentes a la arterioesclerosis. Apoyan esta hipótesis los siguientes hallazgos:

Kirkwood (34) ha encontrado aumentos de Colesterol y de la relación Colesterol/Fosfolípidos en células endoteliales cultivadas en presencia de LDL, influyendo ésto en el fenómeno de adhesión a Polimorfonucleares y en la actividad procoagulante celular. Lie (35) afirma que las apoproteínas se asocian preferentemente a la Fosfatidil-Colina, sobre todo la Lp (a).

Por otro lado, Engelmann y sus colaboradores demuestran en su trabajo (36) que en hipertrigliceridemias tiene lugar, por un lado en el plasma, aumentos de PC y descenso de SPH, con un aumento del cociente PC/SPH del 50%, y por el otro en membrana eritrocitaria, resultados similares, con un aumento del cociente PC/SPH del 20%, junto con un descenso de la Fosfatidil-Etanolamina plasmalógena, lo cual podría estar en relación con una disminución de la actividad anti-oxidante relacionada con la HDL.

Chetty (37) encuentra las siguientes alteraciones en las plaquetas de pacientes hiperlipémicos:

- Aumento de la agregabilidad plaquetaria.
- Aumento del contenido en Tromboxano B2 y Serotonina.
- En membrana plaquetaria, aumento del Colesterol y sus ésteres, de Fosfolípidos y Triglicéridos, modificaciones en los Ácidos grasos y un aumento del Ácido Araquidónico relacionado con el Fosfatidil-Inositol (esto último juega un probable papel en el referido aumento de Tromboxano).

Hallazgos similares encuentra Hochgraf (38), quien comunica, en plaquetas de pacientes hipercolesterolémicos, aumentos de las relaciones Colesterol/Fosfolípidos y PC/SPH, con aumento en la tendencia a la agregación. Las alteraciones que Engelmann y colaboradores (39) encuentran en la membrana eritrocitaria de pacientes hiperlipémicos y que se refieren a aumentos en la concentración de PC y descenso de la SPH, parecen estar en relación con una aceleración del transporte de membrana Sodio/Litio.

Lupu (40) ha comunicado que la exposición del endotelio arterial a lípidos provoca un aumento en la concentración de Fosfolípidos aniónicos en la capa externa de la membrana, lo que conlleva un aumento de la actividad pro-coagulante. Este trastorno se ha comprobado en animales hiperlipémicos en base a la demostración de un aumento de los complejos de proteasa anti-trombina circulantes.

Los estudios de Lucio (41) sobre ratas con hipercolesterolemia alimentaria demuestran un aumento del 45% del cociente Colesterol/Fosfolípidos en membrana eritrocitaria, lo que sin embargo sólo supone un ligero descenso en la fluidez de membrana.

Una aportación importante en este sentido lo constituyen los hallazgos descritos en el conejo de Watanabe (42), que supone un modelo animal de hipercolesterolemia familiar. Se encuentran en este espécimen:

-Aumento de Fosfolípidos totales en aorta, primero de SPH, con aumento de su contenido en ácidos grasos insaturados, lo que posiblemente es un fenómeno que trata de contrarrestar el descenso de fluidez de membrana provocado por el aumento de Colesterol, y en segundo lugar, de PC.

-Aumento, en relación con la PC, de un precursor del Factor Activador Plaquetario (PAF).

-Aumento de Liso-PC, que es un potente factor quimiotáctico para magnitudes.

Pomerantz (43) postula una participación del Colesterol de las células musculares de la pared arterial en la expresión genética o post-transcripcional de la Ciclo-oxigenasa, lo que evidentemente podría repercutir en la síntesis de determinados lípidos de membrana y en el equilibrio de los procesos de agregación/anti-agregación.

Todos los hallazgos descritos permiten suponer que existen ciertos cambios en la composición lipídica de la membrana eritrocitaria en situaciones de hiperlipemia, los cuales podrían intervenir en las alteraciones hemorreológicas que tienen lugar en dichas situaciones. Esto viene además apoyado por los estudios de Poredos (19), que descubre una relación independiente entre el exceso de Colesterol plasmático y el aumento de Viscosidad Sanguínea, encontrando una correlación negativa entre dichos valores de Viscosidad y los de HDL-Colesterol. Del mismo modo, Rosenson (18) encuentra correlaciones positivas entre Viscosidad Sanguínea, Triglicéridos y Fibrinógeno. Además, existen datos, ya comentados

(17) acerca de que el decremento de los Triglicéridos séricos en la Hiperquilomicronemia familiar se acompaña de un descenso de la Viscosidad Sanguínea en sangre completa y en plasma sin células, así como un descenso de la agregabilidad eritrocitaria, que incluso puede normalizarse en esta situación.

Por último, citamos la publicación de Vaya (44), que postula que posible cambios en la membrana eritrocitaria, y no sólo los que afectan a Fibrinógeno y Apolipoproteínas, pueden favorecer un aumento en la tendencia a la agregación plaquetaria en las hiperlipemias.

HIPOTESIS

Las referencias bibliográficas citadas permiten suponer que en las hipercolesterolemias deben tener lugar ciertos cambios en la composición lipídica de la membrana eritrocitaria, al igual que se dan en otras membranas celulares y en las células de la lesión aterosclerótica, todo ello en base a los demostrados intercambios lipídicos entre estos compartimentos.

Dado que todo cambio en la composición lipídica de la membrana eritrocitaria puede repercutir en las propiedades físicas de la misma, cabe suponer también que el aumento de viscosidad sanguínea que se describe en las hipercolesterolemias no se debe tan sólo al aumento de Colesterol plasmático sino a una alteración del comportamiento de la membrana eritrocitaria en la circulación, lo que en definitiva contribuye a las alteraciones hemorreológicas que se dan en estos pacientes.

En suma, hemos pretendido encontrar alteraciones en la composición lipídica de la membrana eritrocitaria y concretamente en sus Fosfolípidos, dada la importancia cualitativa y cuantitativa de los mismos, en pacientes con hipercolesterolemias primarias, que pudieran justificar las anomalías reológicas conocidas en esta enfermedad.

MATERIAL Y METODOS

1) MATERIAL:

Relacionamos a continuación de forma detallada los materiales, aparatos y sistemas que fueron necesarios para la realización de nuestro estudio:

A) MATERIAL FUNGIBLE:

- Jeringas y agujas de uso clínico habitual para extracción de muestras de sangre venosa.
- Tubos de Hematología VACUTAINER con EDTA.
- Tubos cónicos milimetrados.
- Sellante de Tubos PARAFILM.
- Tubos de lectura CUVETTES.
- Tubos Eppendorf.
- Sistema de punción Abbocath n° 18.
- Pipetas Pasteur.
- Filtros para solución lipídica MINISART RC 15 de 0.2 micras.

B) REACTIVOS:

- Suero salino fisiológico 0.9%.
- Cloroformo.
- Metanol.
- Acido Orto-Fosfórico 85%.
- Agua destilada.

C) APARATOS Y SISTEMAS:

- Jeringas de precisión HAMILTON.
- Pipetas automáticas HTL.
- Sistema de filtración para reactivos de Cromatografía:
 - Bomba ABM Modelo VDE 0530.
 - Matraces AFORA.
 - Filtros de Nylon de 0.2 micras LIDA.
- Centrifugadora para preparación de solución desplasmatazada de hematíes marca ORTO.
- Centrifugadora para extracción de Fosfolípidos marca SELECTA.
- Sistema de agitación de muestras modelo VORTEX.
- Viscosímetro Rotacional cono-plato modelo LVTDCP de WELLS-BROOKFIELD.
- Sistema de autoanalizadores para determinaciones bioquímicas del Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Virgen Macarena.
- Sistema de recuento hematológico COULTER modelo STKS del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Virgen Macarena.
- Estufa de laboratorio SELECTA.
- Ultracongelador REVCO.
- Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de BECKMAN, compuesto por:
 - Módulo programable de Solventes 126.
 - Módulo de detección ultravioleta 168.
 - Ordenador IBC. Programa GOLD versión 7.11.
 - Columna BECKMAN Ultrasphere-Silica, de 5 micras de diámetro de poro, 4.6 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud.

2) POBLACION DE ESTUDIO:

A) CASOS:

Se incluyeron 45 pacientes, 25 hombres y 20 mujeres, con un rango de edad entre 19 y 62 años, y una media de 42 años.

Se trataba de pacientes seleccionados de entre los atendidos en la Unidad de Lípidos del Hospital Virgen Macarena de Sevilla, cuya área corresponde con la zona Norte de la capital y su provincia.

Todos ellos habían sido previamente diagnosticados de una hipercolesterolemia primaria fenotipo IIa, es decir, con un exceso de Colesterol plasmático a expensas de su fracción LDL.

Para su inclusión en el estudio, los pacientes debieron cumplir los criterios siguientes:

-Colesterol sérico total superior a 250 mgr/dl.

-Cifra de LDL-Colesterol en suero superior a 150 mgr/dl.

-Normalidad de las cifras de VLDL-Colesterol y Triglicéridos.

-Ausencia de otras patologías, metabólicas u orgánicas.

-Ausencia de tratamiento hipolipemiante.

B) CONTROLES:

Se incluyeron en el estudio 45 controles, 21 hombres y 24 mujeres, con un rango de edad de 22 a 58 años y una media de 41 años.

En este grupo se incluyeron sujetos completamente sanos.

3) METODOS.

A) MEDICION DE LA VISCOSIDAD SANGUINEA:

Previamente a la medición, debe conectarse el calentador del viscosímetro, encargado de mantener una temperatura de 37° C en la cazoleta de depósito de la muestra. Esta fue obtenida a partir de sangre venosa extraída tras un ayuno de 12 horas y depositada en un tubo de hematología con EDTA como anticoagulante. Para lograr uniformidad en las mediciones, el hematocrito de cada muestra debe corregirse al 40%. La medición debe realizarse dentro de las 4 horas siguientes a la extracción, tiempo durante el cual puede conservarse la muestra a temperatura ambiente.

Dado que nuestro interés residía en la medición de la viscosidad sanguínea debida

exclusivamente al componente celular de la sangre, realizamos un lavado de los hematíes siguiendo el proceso siguiente:

1.- Colocación de la muestra en un tubo cónico milimetrado con el fin de determinar el volumen y centrifugación a 2.000 rpm durante 5 minutos.

2.- Extracción y deshecho del plasma sobrenadante.

3.- Adición de suero salino fisiológico hasta completar 10 centímetros cúbicos de solución, mezclándolo con los hematíes.

4.- Centrifugar a 2.000 rpm durante 10 minutos.

5.- Eliminación del sobrenadante y la primera capa del infranadante, con aspecto de "algodón" o "nube", que contiene mayoritariamente células no eritrocitarias.

6.- Repetir los pasos 3, 4 y 5.

7.- Añadir suero fisiológico hasta obtener un volumen igual al inicial.

De este modo, se obtiene una solución desplasmatizada de hematíes, de la cual se debe tomar 1 cc. y depositarla en la cazoleta del viscosímetro.

El paso siguiente es conectar el rotor del viscosímetro directamente a 30 rpm, para

conseguir una distribución uniforme de la muestra. Tras esto, puede apreciarse que se estabiliza, transcurridos unos segundos, la lectura digital del viscosímetro. Entonces, el paso siguiente es realizar las lecturas colocando la velocidad del rotor de forma sucesiva a 60, 30, 12 y 6 rpm, lo que equivale, respectivamente, a las siguientes velocidades de deformación: 450, 225, 90 y 45 seg^{-1} .

Las lecturas digitales obtenidas fueron suministradas al programa matemático de cálculo de viscosidad del sistema Brookfield, el cual nos proporcionó las diferentes viscosidades a cada velocidad de deformación, así como la denominada Viscosidad de Casson, que representa el cálculo estimado de la viscosidad sanguínea a una elevación infinitesimal de la velocidad de deformación.

B) MEDICION DE FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANA:

1) EXTRACCION:

Utilizamos una modificación de la clásica técnica de Folch (45, 46), que consistió en los pasos siguientes:

1.- Tomar 1 ml. de la solución desplasmática de hematíes obtenida a partir de sangre venosa extraída tras 12 horas de ayuno y depositarlo en un tubo de lectura Cuvette.

2.- Añadir 1 ml. de Metanol.

- 3.- Agitar mediante Vortex durante 30 segundos, previo sellado del tubo con Parafilm.
- 4.- Añadir 2 ml. de Cloroformo.
- 5.- Agitar mediante Vortex durante 30 segundos, previo sellado del tubo con Parafilm.
- 6.- Centrifugar a 1.500 rpm durante 10 minutos.
- 7.- Tras el paso anterior, se obtiene la formación de un coágulo y la formación de dos capas líquidas. La infranadante, donde se encuentra el extracto lipídico, es extraído mediante aspiración con jeringa y atravesando el coágulo con aguja de punción Abbocath. La capa sobrenadante y el coágulo fueron desechados.
- 8.- El extracto obtenido fue filtrado utilizando filtros MINISART RC 15 de 0.2 micras de poro.
- 9.- De cada muestra, se tomaron 500 microlitros y se depositaron en tubos Eppendorf, que a su vez fueron colocados en estufa a 50° C para provocar la desecación de la muestra durante toda la noche siguiente.
- 10.- El extracto obtenido fue congelado para su conservación hasta la realización del análisis, a -80° C.



2) ANALISIS HPLC:

Para la determinación de Fosfolípidos de membrana, empleamos el sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de Beckman, con las especificaciones técnicas mencionadas anteriormente (35, 45, 47, 48).

El método de cromatografía fue isocrático, utilizando una fase móvil compuesta por Acetonitrilo:Metanol:Acido Fosfórico 85% con las proporciones 130:5:1.5. Esta mezcla fue previamente filtrada y degasificada siguiendo la técnica habitual para HPLC y empleando los materiales citados en el apartado correspondiente.

Se aplicó un flujo de circulación de la fase móvil de 2.9 ml/minuto, consiguiéndose unas presiones medias de trabajo que oscilaron entre 1.2 y 1.7 Kpsi.

El detector ultravioleta fue programado para una longitud de onda de 203 nm.

Cada extracto desecado y congelado, una vez colocado a temperatura ambiente, fue rediseñado con 20 microlitros de Cloroformo y sometido a agitación mediante Vortex durante 30 segundos. De la solución obtenida se tomaron 2 microlitros mediante aspiración con aguja de Hamilton y fueron inyectados al sistema HPLC.

Cada análisis tuvo una duración de 12 minutos. Tras la finalización de un grupo de análisis, columna y sistema eran sometidos a lavado haciendo pasar por su interior una solución de Metanol:Agua destilada 50:50.

De este modo, obteníamos una gráfica de cada muestra, en la cual pueden apreciarse 6 picos principales, correspondientes, por orden de aparición y como puede apreciarse en las figuras, a los siguientes compuestos:

- 1) FRENTE DE INYECCION.
- 2) FOSFATIDIL-INOSITOL (PI).
- 3) FOSFATIDIL-SERINA (PS).
- 4) FOSFATIDIL-ETANOLAMINA (PE).
- 5) FOSFATIDIL-COLINA (PC).
- 6) ESFINGOMIELINA (SPH).

El programa Gold determinó cuantitativamente cada sustancia en base a una integración matemática del área delimitada bajo cada pico, expresando los resultado en microgramos/microlitro.

En cuanto al análisis estadístico de los resultados, dado que las muestras no mostraban una distribución normal, utilizamos el Test Rank Sum de Mann Whitney para el análisis comparativo y el Test de Spearman en la búsqueda de correlaciones.

RESULTADOS

A) ANALISIS COMPARATIVO:

En la Figura 5 pueden apreciarse las diferencias en cuanto a los niveles de lípidos plasmáticos que determinan las diferencias entre casos y controles.

Así, las medias en el grupo de pacientes fueron las siguientes:

-Colesterol total (CT)= 297.27 mgr/dl. Error standard (ES)=5.93 mgr/dl.

-Fracción de Colesterol de Alta Densidad (HDL)= 52.82 mgr/dl. ES= 2.26 mgr/dl.

-Fracción de Colesterol de Baja Densidad (LDL)= 219.24 mgr/dl. ES= 5.87 mgr/dl.

-Fracción de Colesterol de Muy Baja Densidad (VLDL)= 109.96 mgr/dl. ES= 4.51 mgr/dl.

-Triglicéridos (TG)= 109.96 mgr/dl. ES= 4.51 mgr/dl.

-Cociente CT/HDL= 6.14. ES= 0.34.

En cuanto al grupo control, los valores medios de los lípidos plasmáticos fueron:

-CT= 191.8 mgr/dl. ES= 2.27 mgr/dl.

-HDL= 51.36 mgr/dl. ES= 1.68 mgr/dl.

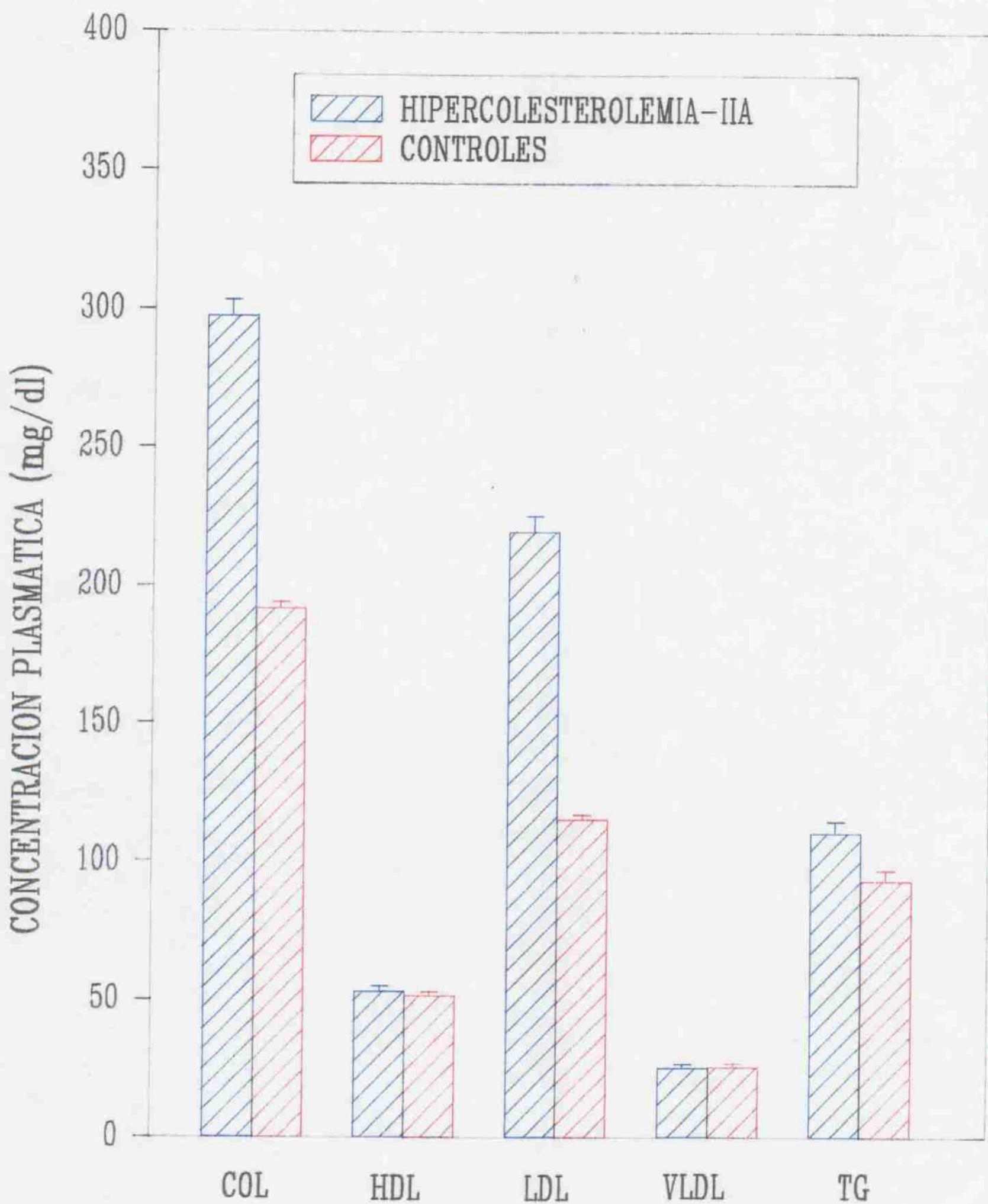


Figura 5.- Comparación de las concentraciones medias de lípidos plasmáticos entre ambos grupos.

-LDL= 114.96 mgr/dl. ES= 1.88 mgr/dl.

-VLDL= 25.49 mgr/dl. ES= 1.25 mgr/dl.

-TG= 93.07 mgr/dl. ES= 3.77 mgr/dl.

-CT/HDL= 3.88. ES= 0.11.

La diferencia del valor del cociente CT/HDL en pacientes con respecto a controles queda reflejada en la Figura 6.

El estudio comparativo de los valores mencionados entre los dos grupos fué:

CT: T= 3060. $p < 0.0001$.

LDL: T= 3060. $p < 0.0001$.

HDL: Las diferencias entre los dos grupos no resultaron significativas ($p=0.6$).

VLDL: Las diferencias entre los dos grupos no resultaron significativas ($p < 0.8845$).

TG: T= 2873. $p=0.0051$.

CT/HDL: T=2842. $p < 0.0001$.

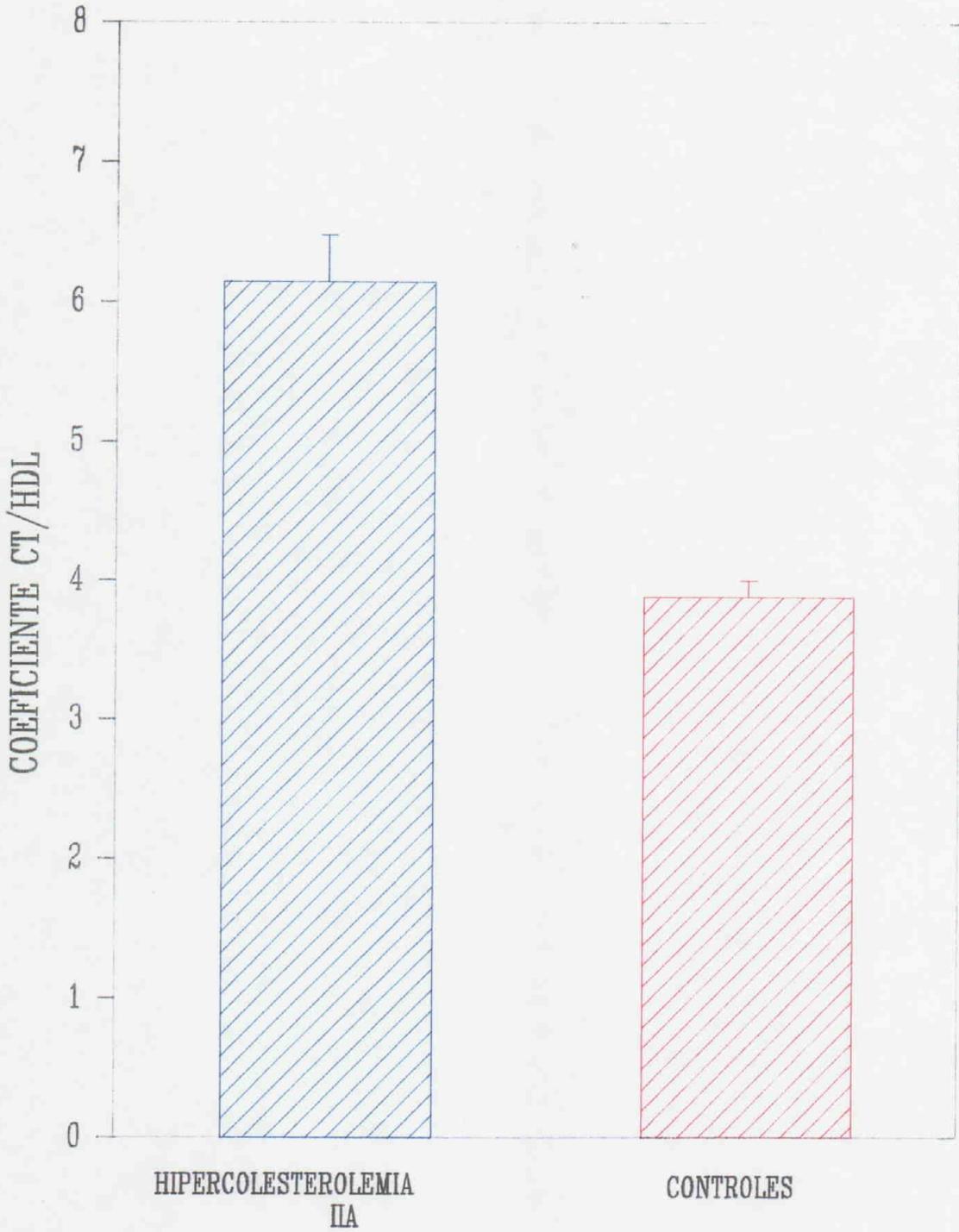


Figura 6.- Diferencias en el cociente CT/HDL entre ambos grupos.

1) VISCOSIDAD SANGUINEA:

La Figura 7 muestra las diferencias entre los valores obtenidos en ambos grupos y que fueron los que se relacionan a continuación:

I) CASOS:

-Viscosidad sanguínea a 60 rpm (VS 60) = 1.91 Centipoises (cps). ES = 0.06 cps.

-Viscosidad sanguínea a 30 rpm (VS 30) = 2.05 cps. ES = 0.06 cps.

-Viscosidad sanguínea a 12 rpm (VS 12) = 3.08 cps. ES = 0.1 cps.

-Viscosidad sanguínea a 6 rpm (VS 6) = 3.99 cps. ES = 0.12 cps.

-Viscosidad de Casson (VC) = 0.011647 cps. ES = 0.0005 cps.

II) CONTROLES:

-VS 60 = 1.24 cps. ES = 0.03 cps.

-VS 30 = 1.36 cps. ES = 0.09 cps.

-VS 12 = 1.79 cps. ES = 0.07 cps.

-VS 6= 1.85 cps. ES= 0.11 cps.

-VC= 0.009578 cps. ES= 0.0003 cps.

A continuación relacionamos los resultados del estudio comparativo de viscosidad sanguínea entre casos y controles:

VS 60: T= 2964. $p < 0.0001$.

VS 30: T= 1187. $p < 0.0001$.

VS 12: T= 2969. $p < 0.0001$.

VS 6: T= 1084. $p < 0.0001$.

VC: T= 2379. $p = 0.0075$.

Por tanto, existen diferencias significativas en la viscosidad sanguínea de origen celular a todas las velocidades de cizallamiento en hipercolesterolemias en comparación con pacientes sanos, en el sentido de un mayor valor de viscosidad en hipercolesterolemias.

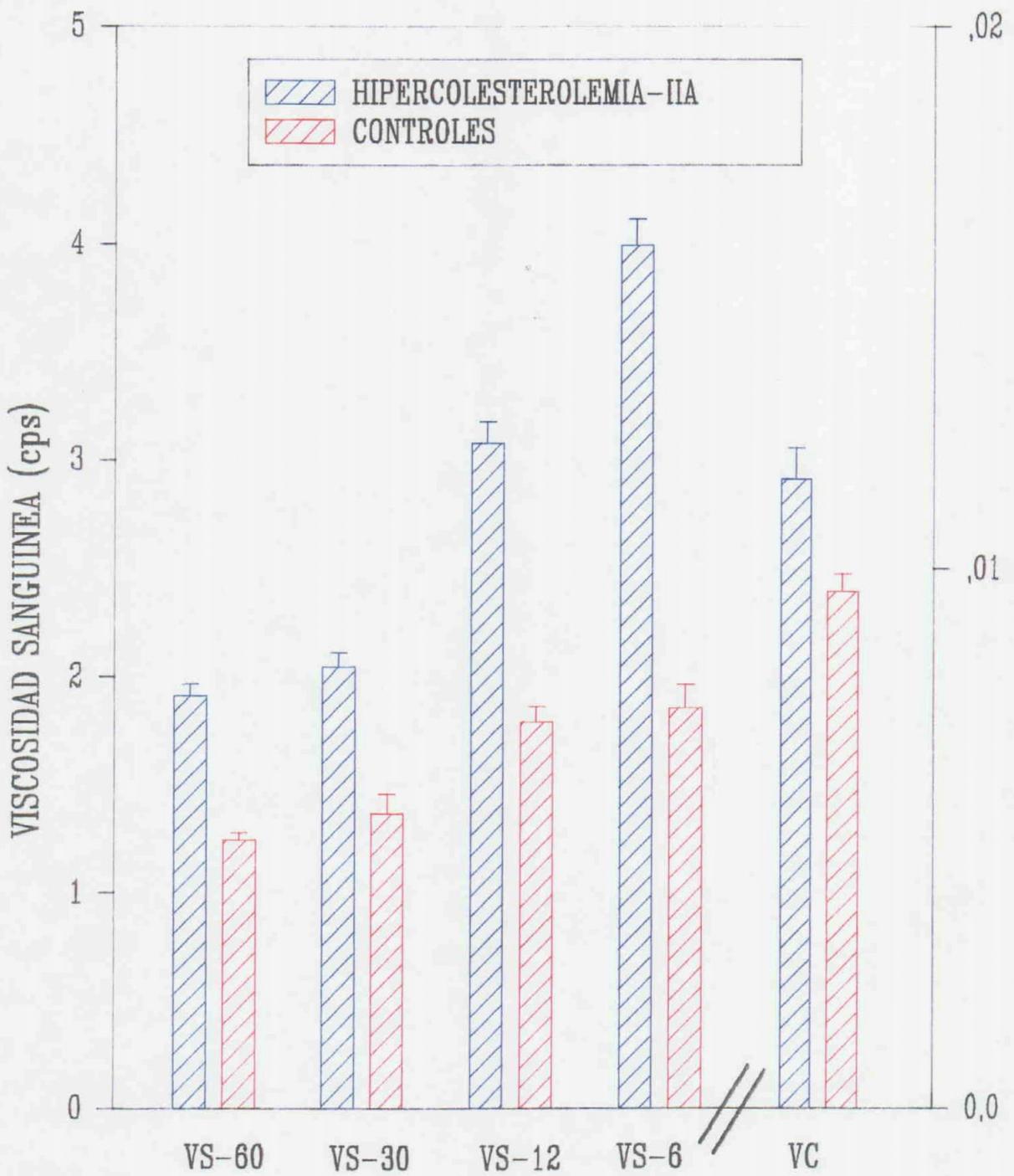


Figura 7.- Resultados de Viscosidad Sanguínea.

2) FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANA ERITROCITARIA:

Los valores que se relacionan seguidamente quedan reflejados en la Figura 8.

En el grupo de casos se obtuvieron los siguientes resultados:

-FOSFATIDIL-INOSITOL (PI)= 10.11 microgramos/microlitro (mcgr/mcl.). ES= 0.71 mcgr/mcl.

-FOSFATIDIL-SERINA (PS)= 29.99 mcgr/mcl. ES= 1.83 mcgr/mcl.

-FOSFATIDIL-ETANOLAMINA (PE)= 36.26 mcgr/mcl. ES= 1.89 mcgr/mcl.

-FOSFATIDIL-COLINA (PC)= 36.32 mcgr/mcl. ES= 1.93 mcgr/mcl.

-ESFINGOMIELINA (SPH)= 1.29 mcgr/mcl. ES= 0.11 mcgr/mcl.

-Cociente PC/SPH= 35.12. ES= 2.75.

Los siguientes son los valores obtenidos en el grupo control:

-PI= 43.51 mcgr/mcl. ES= 2.67 mcgr/mcl.

-PS= 31.57 mcgr/mcl. ES= 2.49 mcgr/mcl.

-PE= 27.03 mcgr/mcl. ES= 1.45 mcgr/mcl.

-PC= 14.26 mcgr/mcl. ES= 0.81 mcgr/mcl.

-SPH= 0.57 mcgr/mcl. ES= 0.05 mcgr/mcl.

-PC/SPH= 47.72. ES= 9.48.

El estudio comparativo entre ambos grupos dió lugar a los resultados que se exponen a continuación.

PI: T= 3051. $p < 0.0001$.

PS: No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0.8401$).

PE: T= 1626. $p < 0.0001$.

PC: T= 3022. $p < 0.0001$.

SPH: T= 1298. $p < 0.0001$.

PC/SPH: No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0.1083$).

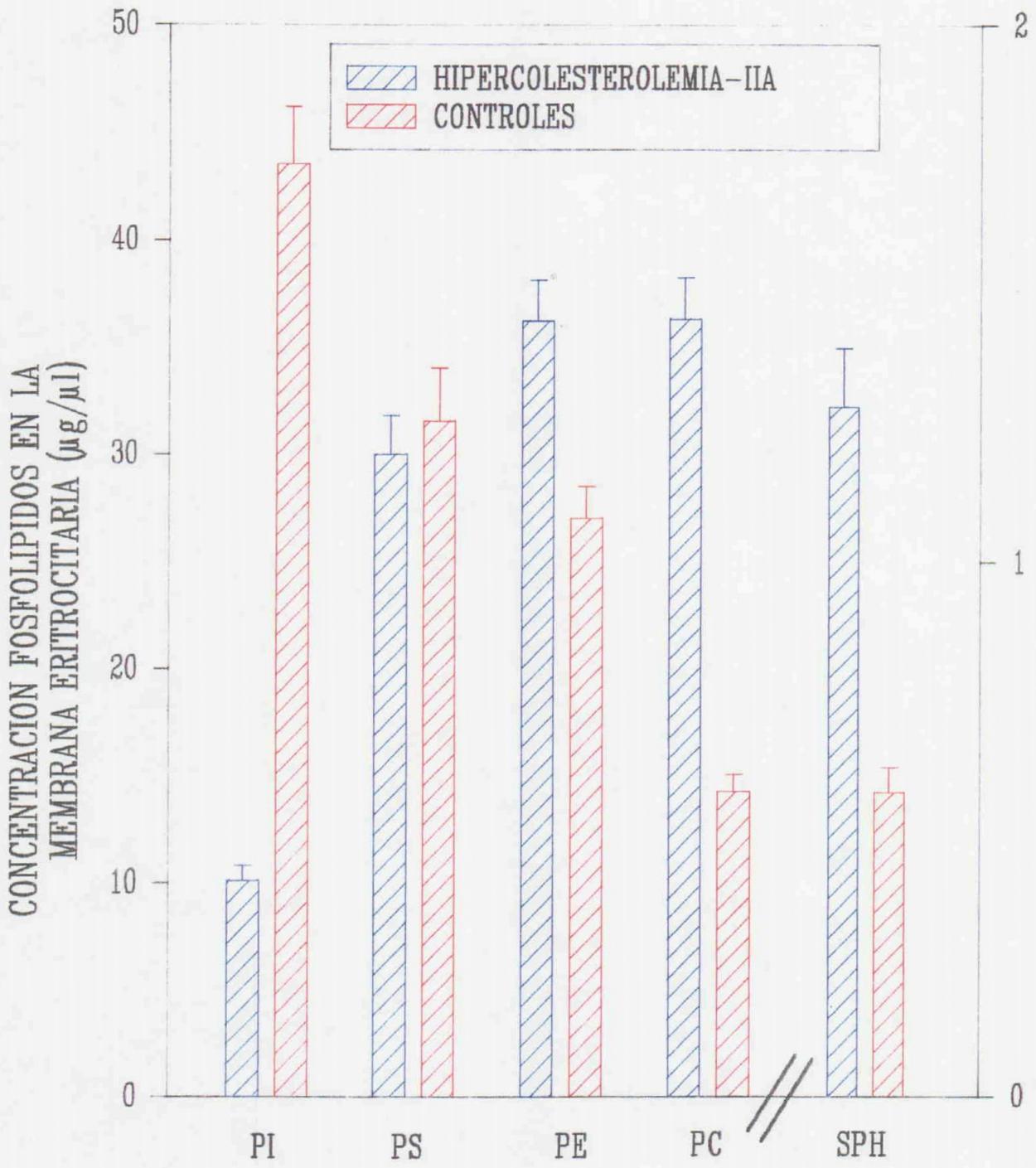


Figura 8.- Resultados de Fosfolípidos de membrana eritrocitaria.

En consecuencia, los pacientes con hipercolesterolemia tienen en su membrana eritrocitaria concentraciones significativamente mayores de PE, PC y SPH, así como un descenso también significativo de la concentración de PI, en comparación con personas sanas.

La Figura 9 muestra la comparación entre los valores medios del cociente PC/SPH entre ambos grupos.

La Figura 10 corresponde a un cromatograma tipo de una persona sana.

La Figura 11 refleja un cromatograma tipo de un paciente con hipercolesterolemia. Son especialmente notables, por un lado, el gran pico correspondiente a la PC, sobre todo en comparación con el correspondiente a la persona sana, y por el otro, un pico tan pequeño de PI que llega a ser inapreciable, circunstancia que no tiene lugar en el control sano.

B) ESTUDIO DE CORRELACIONES:

Según el Test de Spearman las correlaciones fueron las siguientes:

1) CONTROLES SANOS:

I) Encontramos correlación negativa entre los niveles de HDL y fosfolípidos de membrana eritrocitaria, con los siguientes valores:

HDL-PS:

Coeficiente de correlación = -0.2996.

Valor de p = 0.04563.

HDL-PE:

Coeficiente de correlación = -0.4295.

Valor de p = 0.0034.

HDL-PC:

Coeficiente de correlación = -0.3455.

Valor de p = 0.0203.

HDL-SPH:

Coeficiente de correlación = -0.4115.

Valor de p = 0.0051.

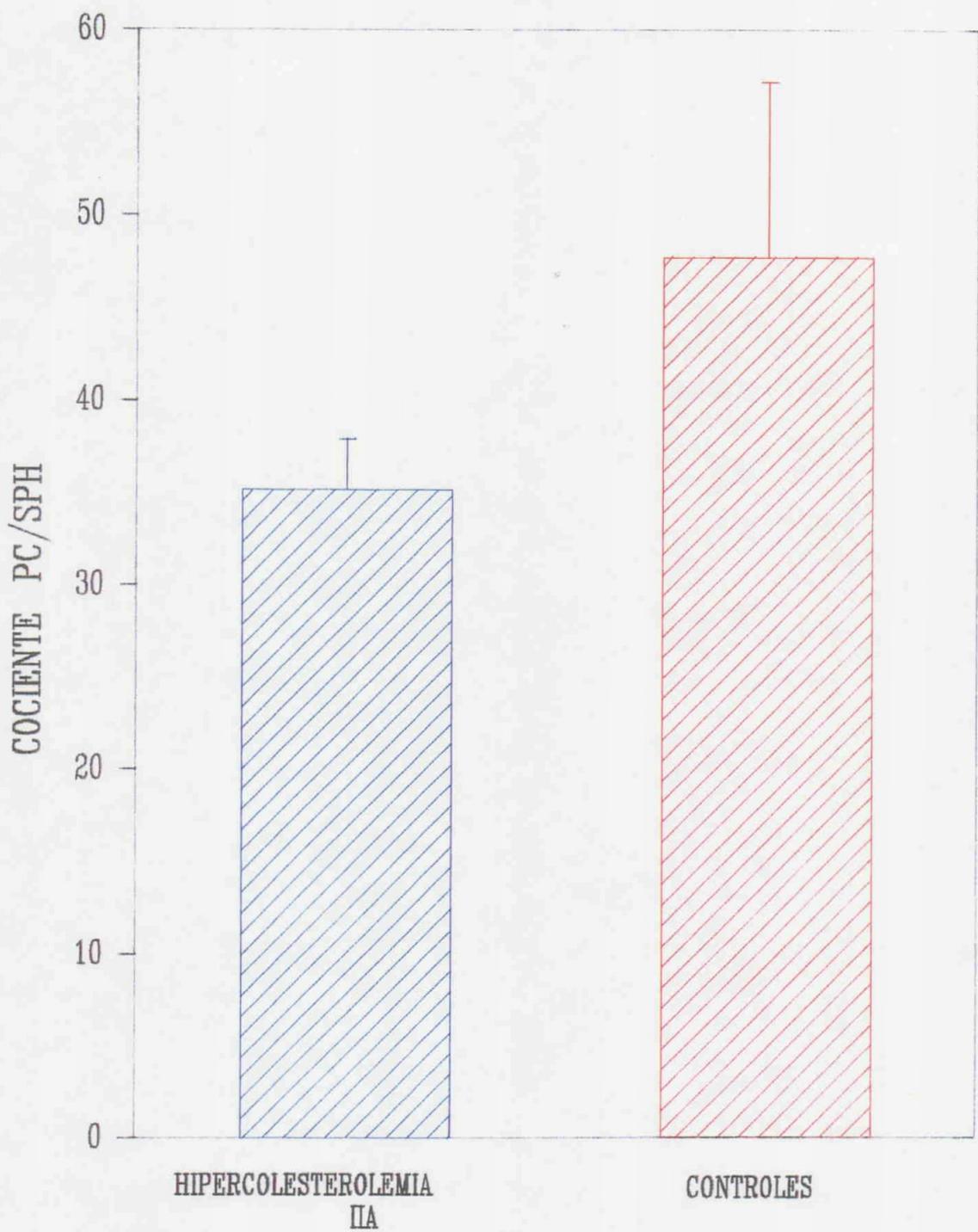


Figura 9.- Comparación del cociente PC/SPH entre ambos grupos.

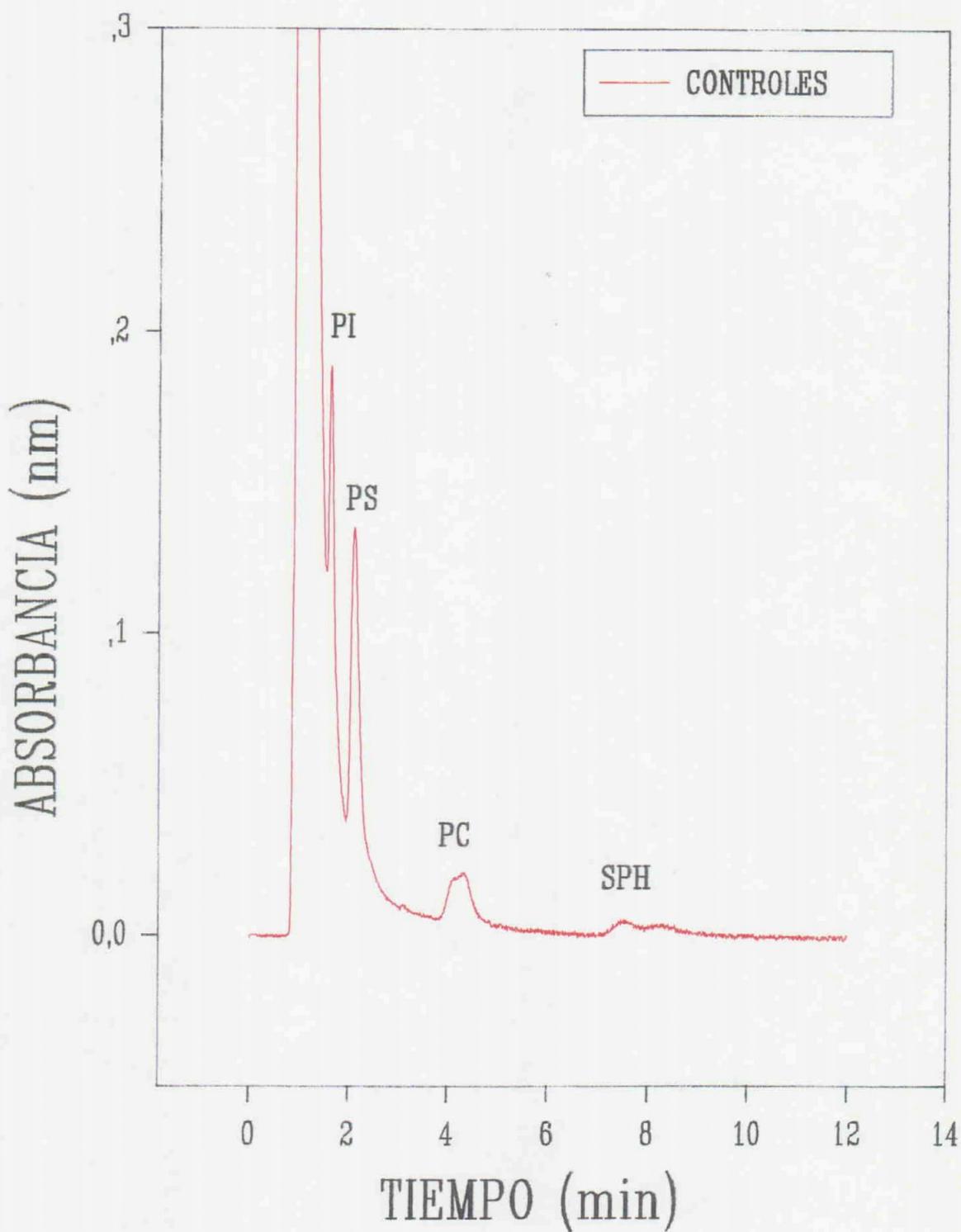


Figura 10.- Cromatograma normal.

49

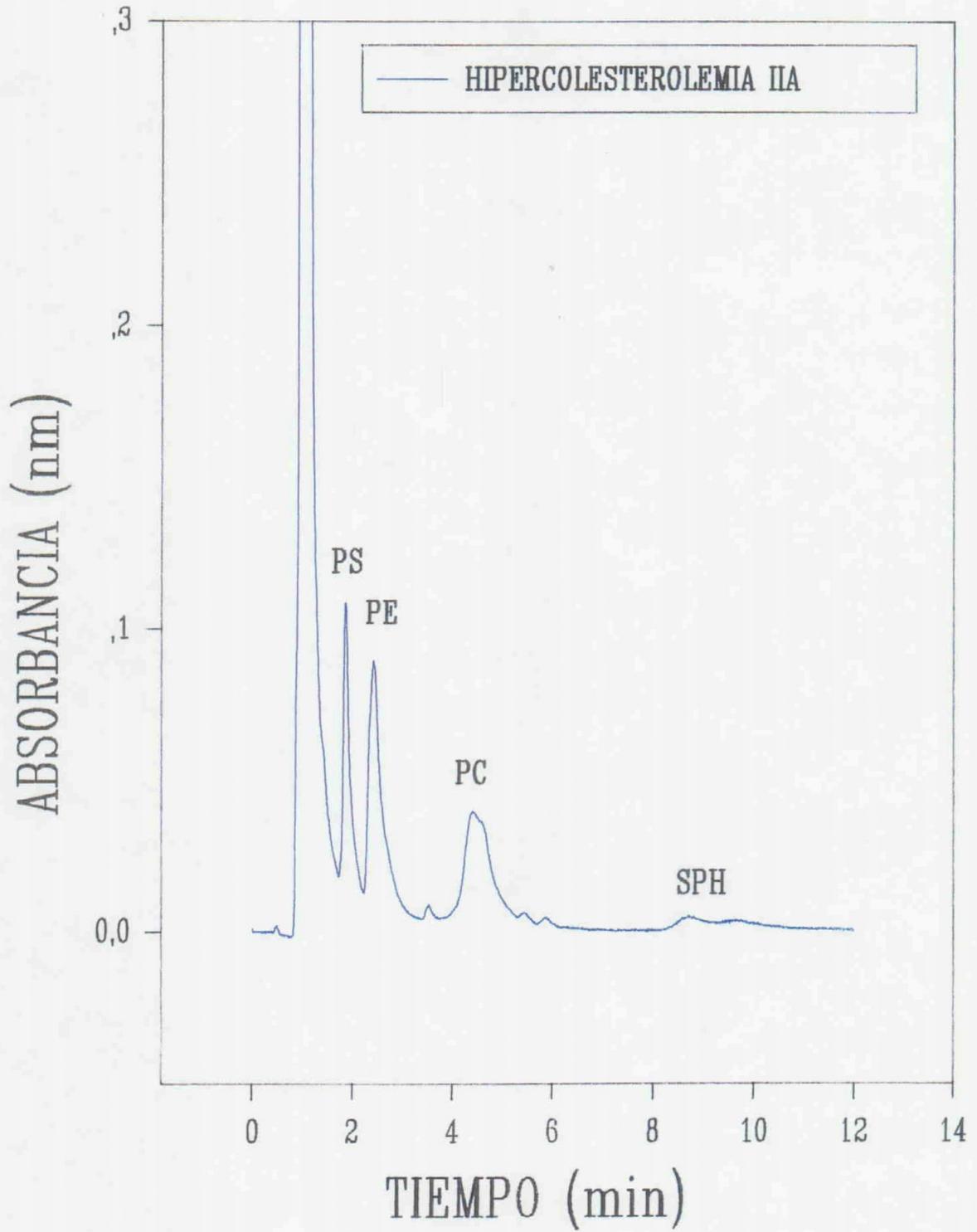


Figura 11.- Cromatograma de paciente con Hipercolesterolemia.

II) Encontramos correlación positiva entre los valores de VLDL y algunos fosfolípidos de membrana eritrocitaria. Los resultados son los que se relacionan a continuación:

VLDL-PS:

Coefficiente de correlación = 0.4427.

Valor de p = 0.0024.

VLDL-PC:

Coefficiente de correlación = 0.3442.

Valor de p = 0.0208.

VLDL-SPH:

Coefficiente de correlación = 0.3393.

Valor de p = 0.0227.

III) Por último, se hallaron también correlaciones positivas de los diferentes fosfolípidos de membrana eritrocitaria entre sí y de cada uno de ellos con el cociente CT/HDL:

PI-PS:

Coefficiente de correlación = 0.567.

Valor de $p = 0$.

PI-PE:

Coefficiente de correlación = 0.3793.

Valor de $p = 0.0104$.

PI-PC:

Coefficiente de correlación = 0.502.

Valor de $p = 0$.

PI-PC/SPH:

Coeficiente de correlación = 0.3715.

Valor de $p = 0.0122$.

PI-CT/HDL:

Coeficiente de correlación = 0.3467.

Valor de $p = 0.0198$.

PS-PE:

Coeficiente de correlación = 0.547.

Valor de $p = 0$.

PS-PC:

Coefficiente de correlación = 0.649.

Valor de $p = 0$.

PS-PC/SPH:

Coefficiente de correlación = 0.3482.

Valor de $p = 0.0193$.

PS-CT/HDL:

Coefficiente de correlación = 0.3753.

Valor de $p = 0.0113$.

PE-PC:

Coefficiente de correlación = 0.563.

Valor de $p = 0$.

PE-CT/HDL:

Coefficiente de correlación = 0.4619.

Valor de $p = 0.0015$.

PC-CT/HDL:

Coefficiente de correlación = 0.3836.

Valor de $p = 0.0095$.

SPH-CT/HDL:

Coefficiente de correlación = 0.4323.

Valor de $p = 0.0031$.

Evidentemente, también se encontraron correlaciones de PC y SPH, positiva la primera y negativa la segunda respectivamente, con el cociente compuesto por ambos (PC/SPH).

2) HIPERCOLESTEROLEMIAS:

I) La gran cantidad de correlaciones comprobadas en los controles sanos se pierde en el grupo de pacientes con hipercolesterolemia. Destaca el hecho de que desaparece la correlación entre HDL y fosfolípidos de membrana eritrocitaria, pasando a ser los Triglicéridos, tanto los predominantemente endógenos (VLDL) como los totales, los lípidos plasmáticos que sí guardan ciertas correlaciones, tanto con algunos valores de viscosidad sanguínea como con algunos de los fosfolípidos, aunque en este último caso, la correlación entre triglicéridos totales y dichos fosfolípidos es negativa. Así, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

VLDL-PC/SPH:

Coefficiente de correlación = 0.3508.

Valor de p = 0.01837.

TG-VS 60:

Coefficiente de correlación = 0.3732.

Valor de p = 0.01181.

TG-VS 30:

Coefficiente de correlación = 0.3352.

Valor de $p = 0.0246$.

TG-VS 12:

Coefficiente de correlación = 0.3442.

Valor de $p = 0.0208$.

TG-PI:

Coefficiente de correlación = -0.3214.

Valor de $p = 0.0314$.

TG-PS:

Coefficiente de correlación = -0.335.

Valor de $p = 0.0246$.

II) Las correlaciones de los diferentes fosfolípidos de membrana eritrocitaria entre sí no resultaron tan amplias en los pacientes con hipercolesterolemia. Así, sólo pudimos comprobar las dos siguientes:

PI-PC:

Coefficiente de correlación = -0.305.

Valor de $p = 0.0417$.

PS-PE:

Coefficiente de correlación = 0.4635.

Valor de $p = 0.0014$.

DISCUSSION

Previamente a la discusión teórica, debemos aclarar tres puntos acerca de la metodología empleada:

- En primer lugar, no hemos realizado medición de viscosidad en sangre completa porque se habría tratado de corroborar resultados ya publicados y porque intentábamos demostrar la influencia del propio eritrocito, sin la participación de un plasma hiperlipémico, en las alteraciones reológicas de estos pacientes.

La centrifugación simple de la sangre con posterior eliminación del sobrenadante y la primera capa "nubosa" de células, asegura la obtención de una solución desplasmatizada de hematíes con una despreciable contaminación por otras células hemáticas.

- Aunque algunos de los trabajos citados hacen referencia a un cociente Colesterol/Fosfolípidos totales en membrana celular, en nuestro trabajo decidimos realizar la medición por separado de los Fosfolípidos más importantes, por entender que obtendríamos una información más detallada, habida cuenta de la importancia relativa de cada uno de ellos en el metabolismo y funcionamiento global de la membrana celular.

Por otro lado, la técnica de HPLC empleada supone una innovación con respecto a la mayoría de estudios publicados y una de las técnicas actuales más sensibles para la determinación de sustancias orgánicas en pequeñas cantidades, lo que creemos que concede una especial importancia a nuestros resultados.

- Elegimos la Hipercolesterolemia primaria fenotipo IIa por la ausencia de trabajos

publicados en este aspecto sobre esta variedad de hiperlipemia, ya que hasta el momento han sido estudiadas con profusión en el aspecto hemorreológico las hipertrigliceridemias, tanto primarias como secundarias, y dentro de éstas últimas las asociadas fundamentalmente con Diabetes Mellitus.

Los resultados descritos apoyan nuestra suposición de una íntima alteración de la estructura de la membrana eritrocitaria junto con una tendencia a la hiperviscosidad sanguínea de origen corpuscular, además del ya conocido origen plasmático, en pacientes con hipercolesterolemia primaria.

Nuestros resultados demuestran que los pacientes con hipercolesterolemia primaria sufren un aumento de viscosidad sanguínea de un doble origen: Por un lado, de origen plasmático, ya previamente conocido y que se atribuye al afecto de la alta concentración de lípidos circulantes y por el otro, de origen corpuscular o celular y que se debe al efecto de los eritrocitos, los cuales, como la célula circulante más abundante, son los responsables directos de este parámetro.

Es especialmente notable que los mencionados incrementos de viscosidad sanguínea aparecen a cualquier velocidad de cizallamiento o deformación celular, sin bien son más notables cuanto más baja es dicha velocidad. También se dieron diferencias significativas en la Viscosidad de Casson. Estos hallazgos, extrapolados a la circulación *in vivo*, nos hacen concluir que estos pacientes sufren aumentos en su viscosidad sanguínea a cualquier velocidad de circulación de la sangre, haciéndose más notable este efecto cuanto más lento es el flujo de la misma, fenómeno que se explica dentro del concepto de fluido no newtoniano que

tenemos de la sangre, como ya mencionamos anteriormente.

Dado que la viscosidad sanguínea guarda una relación directa con el grado de deformabilidad del hematíe y ésta depende a su vez de la fluidez de la membrana del eritrocito, podemos pensar en una alteración de las características físico-químicas de dicha membrana como última responsable de esta alteración.

Los hallazgos descritos en nuestros resultados en cuanto a modificaciones de la composición fosfolipídica de la membrana del hematíe pueden suponer la explicación de los fenómenos descritos.

Así, hemos detectado incrementos significativos en las concentraciones medias de PE, PC y SPH, siendo especialmente importante el aumento de PC, así como un marcado descenso de la concentración de PI. De estos hallazgos, aparece como de singular importancia el marcado aumento de PC, no sólo por su posible efecto hemorreológico, sino además por la existencia de enzimas iniciadoras del proceso trombótico cuya actividad guarda relación con este fosfolípido y que se mencionan en este mismo apartado más adelante.

Por otro lado, es necesario resaltar nuestros resultados en relación con las correlaciones entre los diferentes valores. De acuerdo a lo descrito, hemos comprobado que los pacientes sanos guardan una correlación inversa entre los niveles de fosfolípidos de membrana, a excepción del PI, y los de HDL circulante, de tal forma que el incremento de unos coincide con descenso del otro, y viceversa. Esto se encuadra en el contexto de una situación no aterogénica y es el resultado de un mecanismo de homeostasis basado en

intercambios lipídicos entre las lipoproteínas circulantes, las membranas celulares y las células de la lesión ateromatosa, que ya han sido descritos anteriormente (29, 30, 31).

En situación de hipercolesterolemia, y por lo tanto de pro-aterogénesis, estas correlaciones se pierden, lo cual indica una pérdida del mecanismo regulador mencionado.

También hemos encontrado correlaciones, en este caso positivas, entre los niveles de VLDL y los fosfolípidos de membrana PS, PC y SPH en controles sanos, que tampoco aparecieron en el grupo de casos, entre los cuales sólo se demostró correlación positiva entre la VLDL y el cociente PC/SPH y una correlación negativa entre los niveles de Triglicéridos totales y los de PI y PS. Cabe interpretar estos resultados como incluidos en la pérdida del mecanismo regulador mencionado, aunque el papel de la VLDL, como portadora fundamentalmente de Triglicéridos endógenos, así como de los Triglicéridos totales en el mismo es cuantitativamente inferior.

En el grupo de hipercolesterolemias hemos encontrado correlaciones positivas de los Triglicéridos totales, y no el Colesterol total, con los valores de viscosidad sanguínea a todos los valores de cizallamiento excepto a 6 rpm. Este hallazgo apoya el hecho de que la hiperviscosidad sanguínea atribuible al exceso de colesterol circulante es poco significativa en comparación con la debida al resto de factores hemorreológicos. Esta correlación no se dio en controles sanos.

Por último, en el grupo de controles sanos ha sido especialmente significativo el hallazgo de la existencia de correlaciones positivas de cada uno de los fosfolípidos con los

que le siguen en la secuencia metabólica y de cada uno de ellos con el cociente CT/HDL. Además, aparte de las correlaciones lógicas de PC y SPH con el cociente PC/SPH, positiva en el primer caso y negativa en el segundo, también hemos demostrado correlación positiva entre este cociente y los valores de PI y PS. En el grupo de enfermos también se pierden estas correlaciones, de forma que sólo hemos demostrado una con carácter positivo entre PS, que es el fosfolípido que menor grado de diferencia muestra entre ambos grupos, y PE, así como una correlación negativa, entre PI y PC, que hace referencia a las dos modificaciones cuantitativamente más importantes que tienen lugar entre los fosfolípidos de membrana de los pacientes con hipercolesterolemia.

Esta serie de cambios inducen a pensar en una alteración que puede situarse tanto en los mecanismos bioquímicos intrínsecos del metabolismo de membrana celular como en aberraciones del sistema de intercambio lipídico entre células endoteliales, células sanguíneas y lipoproteínas circulantes. Ambos tipos de trastorno juegan probablemente un papel aún por determinar en las alteraciones descritas, las cuales repercuten a su vez en un empeoramiento de las condiciones hemorreológicas de las hipercolesterolemias, influyendo por lo tanto en una aceleración del proceso aterotrombótico.

Nuestro trabajo guarda de este modo relación estrecha con muchos otros que conceden importancia creciente al papel de la Reología y las condiciones de la microcirculación en la fisiopatología de la Arterioesclerosis. En este sentido, es de destacar el estudio de Celermajer y colaboradores (49), quienes utilizan ultrasonidos de alta resolución para demostrar disfunción endotelial en niños y adultos con riesgo de arterioesclerosis, ya en estadios previos a la evidencia anatómica de formación de la placa de ateroma. También han sido

comprobadas alteraciones de la dilatación dependiente de endotelio en pacientes diagnosticados de angor pectoris pero con arteriografías normales. Según Pritchard (50), en estas perturbaciones funcionales de la célula endotelial juegan un papel importante las alteraciones de la dinámica lipídica inducidas por LDL.

Otros hechos que apoyan la íntima relación entre la disfunción endotelial y el inicio del proceso arterioesclerótico son, por un lado, los publicados por Del Papa (51), que sugiere que toda alteración de la integridad de la célula endotelial podría disparar la reacción de Anticuerpos anti-Fosfolípidos con vasos sanguíneos, y por otro, el trabajo de Kochhar (52), que implica al Colesterol de membrana como iniciador en el proceso de activación de la Fosfolipasa D-específica de Fosfatidil Colina, que a través de la formación de Acido Fosfatídico daría lugar a la síntesis de Fosfolipasa A2, en presencia de Calcio extraplaquetario. Este mecanismo puede tener una especial relevancia, si consideramos nuestro hallazgo de una PC especialmente incrementada en la membrana eritrocitaria de las hipercolesterolemias.

Del mismo modo, se han comunicado múltiples trabajos referidos a alteraciones de composición o funcionamiento de membranas celulares, incluida la eritrocitaria, en otras situaciones diferentes de la hipercolesterolemia, pero indudablemente relacionadas con el proceso arterioesclerótico:

Así, en nuestro país, Ruíz-Gutiérrez (53) ha demostrado que en la Diabetes Mellitus Tipo I o Insulín-dependiente se dan alteraciones en la composición lipídica de la membrana eritrocitaria que parecen guardar relación tanto con los sistemas de transporte de Sodio como

con un mal control metabólico. Por su parte, Watala (54) encuentra las siguientes modificaciones referidas a las lipoproteínas (LDL y HDL) de los pacientes diabéticos: Un aumento de la Glicosilación no enzimática, que guarda una correlación positiva con la Peroxidación lipídica, un aumento del Cociente Colesterol/Fosfolípidos totales y un aumento de la polarización de membrana, esto último también en correlación positiva con los tres fenómenos anteriores. Precisamente en base a estos hallazgos, el mismo autor (55) teoriza acerca del papel de estos fenómenos sobre la fluidez de la membrana lipídica en la Diabetes Mellitus, considerando que no es suficiente un aumento del Cociente Colesterol/Fosfolípidos para provocar un descenso de esta fluidez de membrana, sino que en dicho efecto deben participar además otros factores, como la mencionada glicosilación no enzimática, además de otros cuya importancia quedaría por estimar, como la concentración de Vitamina E o las alteraciones en la concentración de Ácidos grasos.

Por último, en el mismo sentido de las últimas referencias bibliográficas, procede citar la demostración de Bruneau (56) que encuentra, aunque en células procedentes de hepatomas, el papel que las mencionadas alteraciones de la composición lipídica de la membrana celular pueden tener en el fenómeno de la resistencia a Insulina. Del mismo modo, Tong (57) y Devynck (58) interpretan el fenómeno de resistencia a la insulina como un efecto de la alteración de la dinámica de la membrana celular.

Por lo que concierne a otras situaciones relacionadas con la arterioesclerosis, son de destacar las investigaciones realizadas en nuestro país por Montilla y colaboradores (59), quienes demuestran las siguientes alteraciones en la membrana eritrocitaria de pacientes hipertensos: Aumento del Colesterol total, con descensos en las concentraciones de SPH, PS

y Liso-Fosfatidil-Colina, encontrando aumentado el Cociente Colesterol/Fosfolípidos. Este trabajo no hace referencia a la población estudiada en el nuestro, y la metodología de análisis de membrana fue el método IATROSCAN.

En este mismo sentido, Razavian (60) sugiere un efecto acumulativo de las hiperlipemias, tanto las relacionadas con exceso de Colesterol plasmático como las debidas a aumento de Triglicéridos, sobre la hiperagregabilidad plaquetaria que de por sí ya padece el paciente hipertenso, y esto viene a apoyar nuestra suposición de un importante papel de la dinámica alterada de la membrana celular, no sólo en las plaquetas, sino también en los eritrocitos, ya que conocemos que estas células también forman agregados y contribuyen por tanto al proceso trombótico. En última instancia, dicha alteración dinámica de la membrana sería causada, al menos en una parte muy importante, por una íntima alteración en su composición química, y más concretamente en su composición lipídica, que es, tanto en el plano cuantitativo como funcional, la fracción más importante.

De forma similar a las situaciones pro-aterogénicas relacionadas hasta el momento, destacan las modificaciones de la relación Colesterol/Fosfolípidos de membrana eritrocitaria descritos por Grinshtein (61) en la Insuficiencia Renal Crónica, y que se relacionan con un aumento de la viscosidad de la bicapa lipídica de dicha membrana. Estos cambios guardan relación directa con los lípidos plasmáticos y no son modificables por diálisis.

En síntesis, en el inicio del proceso fisiopatológico de la Arterioesclerosis tiene lugar una alteración de la interrelación dinámica entre las células endoteliales, las células sanguíneas y las lipoproteínas circulantes, que afecta de forma especial al contenido lipídico

de todas estas estructuras y al intercambio de dichos lípidos entre las mismas. Es probable que las diferencias lipídicas mencionadas se deban a alteraciones de la actividad de diferentes sistemas enzimáticos, en el sentido de que algunos se muestren hiperfuncionantes en detrimento de otros, lo que daría lugar a los desequilibrios fosfolipídicos enumerados.

Como ya hemos mencionado (52), los estudios de Kochhar apoyan el que dichos desequilibrios enzimáticos pueden ser claves en el inicio de la actividad atero-esclerótica y pro-agregante. Es necesario resaltar en este punto la similitud, aunque no igualdad, entre las alteraciones descritas en nuestro trabajo para hipercolesterolemias y las comunicadas en otras situaciones favorecedoras de la arterioesclerosis, como la Hipertensión Arterial o la Diabetes Mellitus. Es evidente que quedan por dilucidar los mecanismos íntimos de las alteraciones expuestas.

Dado que el componente fosfolipídico es el más importante desde el punto de vista cuantitativo de la membrana celular, es plausible suponer que toda alteración en dicho componente repercutirá en la fluidez de la membrana del eritrocito y por consiguiente en la viscosidad sanguínea.

De este modo, la alteración de los lípidos de membrana celular que tiene lugar en la hipercolesterolemia, como ocurre en la Diabetes y en la Hipertensión, puede favorecer el proceso arterioesclerótico en una doble vertiente:

- Por un lado, en base a una alteración del intercambio lipídico entre las células endoteliales, las sanguíneas y las lipoproteínas que puede favorecer la activación de sistemas



enzimáticos con actividad proagregante.

- Por el otro, favoreciendo un aumento de la viscosidad sanguínea de origen corpuscular o celular, que se añade al que se debe a la propia hiperlipemia y que también constituye, como es bien conocido, una situación pro-trombótica.

Por último, es de resaltar que, si bien no conocemos aún los mecanismos bioquímicos de estas modificaciones de lípidos celulares, sí se han comunicado cambios inducibles por diversos tratamientos de las enfermedades relacionadas con la arterioesclerosis. Así, citamos los siguientes:

Koenig (62) publica un efecto hemorreológico de la Lovastatina, que provoca una disminución de la insudación de los componentes plasmáticos en la pared arterial, sugiriendo un papel desconocido en este proceso de la denominada Lipoproteína a (Lp(a)).

Beigel (63) comunica las siguientes modificaciones reológicas inducidas por la Lovastatina:

- Mejoría de la filterabilidad.
- Normalización de la morfología eritrocitaria.
- Aumento del Fibrinógeno plasmático.
- Aumento de la agregación plaquetaria inducida por ADP.
- Aumento del número de plaquetas, aumentando las de gran tamaño y sin que se produzcan modificaciones en el porcentaje de agregación plaquetaria.

- No se apreciaron cambios en la viscosidad de sangre completa.

Paramonova y colaboradores (64) encuentran que los fármacos hipolipemiantes pueden provocar modificaciones en el contenido fosfolipídico de las HDL, concretamente aumentos de PC y de PE y disminución de Liso-PC. Estos cambios podrían influir en una alteración del transporte reverso de Colesterol, con la lógica influencia que ello tiene en los procesos orgánicos de control de la aterogénesis.

Schmitt (65) ha demostrado en su trabajo realizado sobre pacientes en diálisis que los Acidos grasos omega-3 administrados a dichos pacientes en forma de suplementos dietéticos se adhieren a los Fosfolípidos de membrana eritrocitaria y provocan de esta forma una mejoría de las características del flujo sanguíneo. Esto viene a apoyar igualmente el indiscutible papel de los fosfolípidos de membrana en el mantenimiento o alteraciones de las características reológicas de la microcirculación.

En suma, todos estos hallazgos nos son útiles para concluir la importancia del papel de los Fosfolípidos de membrana eritrocitaria, y por extensión de todas las células, en el inicio y desarrollo y también en la mejoría e incluso reversión del proceso arterioesclerótico y que nuestro estudio puede constituir un punto de partida fundamental para la investigación de nuevas pautas terapéuticas en esta enfermedad.

CONCLUSIONES

1) Los pacientes con hipercolesterolemia primaria sufren un aumento de viscosidad sanguínea de origen eritrocitario que se une a la hiperviscosidad debida exclusivamente al exceso de lípidos circulantes.

2) Dicho aumento de hiperviscosidad sanguínea aparece en todas las velocidades de deformación o cizallamiento celulares, de lo que se deduce que in vivo se manifiesta a todos los niveles circulatorios.

3) Asimismo, los pacientes con hipercolesterolemia primaria sufren alteraciones en la composición fosfolipídica de la membrana de sus hematíes, consistentes en aumentos de las concentraciones de fosfatidiletanolamina, esfingomiélinea y, fundamentalmente, de fosfatidilcolina, junto con una marcada reducción en la concentración de Fosfatidil-Inositol.

4) Estos hallazgos suponen una pérdida del estado de equilibrio de los fosfolípidos de membrana entre sí y con los lípidos circulantes.

5) Dada la importancia cuantitativa de los fosfolípidos en el metabolismo y propiedades físicas de la membrana celular, estas alteraciones pueden originar una disminución de la fluidez de la membrana eritrocitaria y por consiguiente de la deformabilidad del hematíe, repercutiendo de esta forma en el fenómeno descrito de hiperviscosidad sanguínea.

6) Las alteraciones descritas suponen una causa de deterioro de las condiciones hemorreológicas de los pacientes con hipercolesterolemia y por lo tanto pueden considerarse favorecedoras del proceso aterotrombótico.

7) En base a estos hallazgos deben investigarse, en el campo de la terapéutica de la hipercolesterolemia, posibilidades de tratamiento con repercusión sobre estas alteraciones hemorreológicas, con el fin de disminuir la incidencia futura de fenómenos obstructivos vasculares en estos pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Leake DS. Oxidised low density lipoproteins and atherogenesis (Editorial). *Brit Heart J* 1993; 69: 476-8.
- 2.- Halliwell B. Free radicals and vascular disease: how much do we know? *Brit Med J* 1993; 307: 885.
- 3.- Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci USA* Nov 1992; 89: 10316-20.
- 4.- Jambou D, Dejour N, Bayer P, Poirée JC, Frédenrich A, Issa-Sayegh M, Adjovi-Desouza M, Lapalus P, Harter M. Effect of human native low-density and high-density lipoproteins on prostaglandin production by mouse macrophage cell line P388D1: possible implications in pathogenesis of atherosclerosis. *Bioch Bioph Act* 1993. 1168: 115-21.
- 5.- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* Apr 29 1993; 362: 801-9.
- 6.- Dintenfass L. Viscosity of blood at high haematocrits measured in microcapillary (paralellplate) viscometers of $r=3-30$ microns. En Copley eds. *Proceedings of the 1st International Conference on haemorheology*. Reykjavik. Oxford. Pergamon Press 1968; pp: 197-8.
- 7.- Dintenfass L. Blood microrheology-viscosity factors in blood flow, ischaemia and

thrombosis. (1^a ed.). London. Butterworths 1971.

8.- Dintenfass L, Girolami A. Blood pressure and blood viscosity in coronary heart disease. Lancet 1978; 2: 993-4.

9.- Dintenfass L. Hyperviscosity in hypertension. Oxford Pergamon Press 1981.

10.- Dintenfass L. Blood viscosity, hyperviscosity and hiperviscoseamia. (1^a ed.). Lancaster. MIP Press Ltd 1985.

11.- Moulias R, Congy F, Mercier M. L'elevation de l'hématocrite est-elle un facteur de risque vasculaire cérébral? Étude rétrospective chez 150 sujets ayant en un accident vasculaire cérébral et chez 150 témoins appariés. Nouv Press Med 1982; 11: 567-70.

12.- Wood JH. Response to letter to the editors: Is the circadian change in haematocrit and blood viscosity a factor triggering cerebral and myocardial infarction? Stroke 1987; 18: 813-4.

13.- Yamamoto A, Niimi H, Tashiro M. Blood viscosity and RBC deformability in cerebrovascular diseases. Jpn Soc Biorheol Abstr Clin Hemorheol 1981; 1: 399-400.

14.- Harris J, McLoughlin G. The viscosity of blood in high blood pressure. QJ Med 1963; 23: 451-64.

- 15.- Labiós M, Gabriel F, Vicente A. Agregación eritrocitaria en la hipertensión arterial esencial. *Hipertensión* 1993; 10: 80.
- 16.- Labiós M, Gabriel F, Guirad V. Deformabilidad eritrocitaria en la hipertensión arterial esencial. *Hipertensión* 1989; 10: 79.
- 17.- Richter WO, Jacob BG, Ritter MM, Schwandt P. Treatment of primary chylomicronemia due to familial hypertriglyceridemia by omega-3 fatty acids. *Metabolism* 1992; 41(10): 1100-5.
- 18.- Rosenson RS, Uretz E. Elevated blood viscosity in hyperlipidemic subjects: an additional cause for atherothrombosis. *Atherosclerosis X* 1994. Abstr 19.
- 19.- Poredos P, Zizek B. Effect of hypercholesterolemia on plasma viscosity. *Atherosclerosis X* 1994. Abstr 14.
- 20.- Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963; 150: 119-30.
- 21.- Coleman R, Finean JB. The Cell-Surface Membrane. En Florkin M. and Stotz E. H. eds. *Cytochemistry*. Amsterdam. Elsevier Publishing Company 1968; pp: 99-126.
- 22.- Myant NB. Sterols in Biological Membranes. En *The biology of Cholesterol and related Steroids*. London. William Heinemann Medical Books Ltd 1981; pp: 317-37.

23.- Lehninger AL. Lípidos, lipoproteínas y membranas. En Omega ed. Bioquímica (2^a ed.). Barcelona 1980: 285-314.

24.- Tappel AL. Lysosomas: Isolation Methods. En Marcel Florkin and Elmer H. Stotz eds. Cytochemistry. Elsevier Publishing Company 1968: 78-81.

25.- Datta DB. A comprehensive introduction to membrane biochemistry. Floral Publishing. Madison 1987.

26.- Myant NB. Chemistry. En The biology of Cholesterol and related Steroids. London. William Heinemann Medical Books Ltd 1981: 3-51.

27.- Thompson GA. Phospholipid Metabolism. En Marcel Florkin and Elmer H. Stotz eds. Lipid Metabolism. Elsevier Publishing Company 1970: 157-99.

28.- Michell RH, Harwood JL, Coleman R, Hawthorne JN. Phospholipid Metabolism. Biochim Biophys Acta 1967; 144: 649.

29.- Engelmann B, Duhm J, Thiery J, Seidel D. Reversible alterations of plasma and red blood cell phospholipid composition after low density lipoprotein apheresis. 62nd European Atherosclerosis Society Congress Abstracts Book. Sep 1993: 120.

30.- Pownall HJ, Bick DLM, Massey JB. Spontaneous Phospholipid Transfer: Development of a Quantitative Model. Biochemistry 1991; 30: 5696-700.

- 31.- Kozar RA, McKeone BJ, Pownall HJ. Mechanism of Cellular Phospholipid Efflux. *J Surg Res* 1993; 55: 548-52.
- 32.- Gold JC, Phillips MC. Effects of membrane lipids and proteins and cytoskeletal proteins on the kinetics of cholesterol exchange between high density lipoprotein and human red blood cells, ghosts and microvesicles. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1111(1): 103-10.
- 33.- Mukhin DN, Orekhov AN, Andreeva ER, Schindeler EM, Smirnov VN. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. Lipid distribution in intimal sublayers. *Exp Mol Pathol* 1991; 54(1): 22-30.
- 34.- Kirkwood A, Pritchard JR, Schwarz SM, Medow MS, Stemerman MB. Effect of low density lipoprotein on endothelial cell membrane fluidity and mononuclear cell attachment. *Am J Physiol.* 1991; 260(1 Pt 1): C43-9.
- 35.- Lie O, Lambertsen G. Fatty acid composition of glycerophospholipids in seven tissues of cod (*Gadus morhua*), determined by combined high performance liquid chromatography and gas chromatography. *J Chromatogr* 1991; 565: 119-29.
- 36.- Engelmann B, Streich S, Schöntier UM, Richter WO, Duhm J. Changes of membrane phospholipid composition of human erythrocytes in hyperlipemias. I. Increased phosphatidylcholine and reduce sphingomyelin in patients with elevated levels of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Bioch Biophys Acta* 1992; 1165: 32-37.

- 37.- Chetty N, Naran NH. Platelet hyperreactivity in hyperlipidaemia with specific reference to platelet lipids and fatty acid composition. *Clin Chim Acta* 1992; 213: 1-13.
- 38.- Hochgraf E, Levy Y, Aviram M, Brook JG, Cogan U. Lovastatin decreases plasma and platelet cholesterol levels and normalizes elevated platelet fluidity and aggregation in hypercholesterolemic patients. *Metabolism* 1994; 43(1): 11-7.
- 39.- Engelmann B, Duhm J, Schonhner UM, Streich S. Relations of sodium-lithium countertransport kinetics to plasma and red cell membrane phospholipids in hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1993; 99(2): 151-63.
- 40.- Lupu F, Moldovan N, Ryan J, Stern D, Simionescu N. Intrinsic procoagulant surface induced by hypercholesterolaemia on rabbit aortic endothelium. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4(5): 743-52.
- 41.- de Lucio Cazana FJ, Rodríguez Puyol M, Pérez Caballero J. Effects of dietary hyperlipidemia-hypercholesterolemia on rat erythrocytes. *Int J Vitam Nutr Res* 1990; 60(4): 392-7.
- 42.- Hara A, Taketomi T. Characterization and change of phospholipids in the aorta of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Jpn J Exp Med* 1990; 60(6): 311-8.
- 43.- Pomerantz KB, Summers B, Hajjar DP. Eicosanoid metabolism in cholesterol-enriched arterial smooth muscle cells. Evidence for reduced posttranscriptional processing of

cyclooxygenase I and reduce cyclooxygenase II gene expression. *Biochemistry* 1993; 32(49): 13624-35.

44.- Vaya A, Martínez M, Carmena R, Aznar J. Red blood cell aggregation and primary hyperlipoproteinemia. *Thromb Res* 1993; 72(2): 119-26.

45.- Tracey B. Lipids. En C. K. Lim ed. *High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of small molecules. A practical approach.* Oxford. IRL Press Limited. 1986; pp: 69- 102.

46.- Honda S. Lipids Chromatography. *Anal Biochem* 1984; 140: 1.

47.- Eder K, Reichlmayr-Lais AM, Kirchgessner M. Simultaneous determination of amounts of major phospholipid classes and their fatty acid composition in erythrocyte membranes using high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *J Chromatogr* 1992; 598: 33-42.

48.- Rehman SU. Rapid isocratic method for the separation and quantification of major phospholipid classes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1991; 567: 29-37.

49.- Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111-5.

50.- Pritchard KA, Wong PYK, Stemarman MB. Atherogenic concentrations of low density lipoproteins enhance endothelial cell generation of epoxyeicosatrienoic acid products. *Am J Pathol* 1990; 136: 1381-91.

51.- Del Papa N, Meroni PL, Tincani A, Harris EN, Pierangeli SS, Barcellini W, Borghi MO, Balestrieri G, Zanussi C. Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial cell antibodies: further characterization of the reactivity on resting and cytokine-activated endothelial cells. *Clin Exp Rheum* 1992; 10(1): 37-42.

52.- Kochhar N, Kaul D. Molecular mechanism involved in cholesterol-modulated human platelet activity. *Atherosclerosis X* 1994. Abstr 63.

53.- Ruiz-Gutierrez V, Stiefel P, Villar J, García-Donas MA, Acosta D, Carneado J. Cell membrane fatty acid composition in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: relationship with sodium transport abnormalities and metabolic control. *Diabetología* 1993; 36: 850-6.

54.- Watala C, Winocour PD. The relationship of chemical modification of membrane proteins and plasma lipoproteins to reduced membrane fluidity of erythrocytes from diabetic subjects. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30(9): 513-9.

55.- Watala C. Altered Structural and Dynamic properties of Blood Cell Membranes in Diabetes Mellitus. *Diabetic Med* 1993; 10: 13-20.

56.- Bruneau C, Hubert P, Waksman A, Beck JP, Staedel-Flaig C. Modifications of cellular

lipids induce insulin resistance in cultured hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1987; 928: 297-304.

57.- Tong P, Thomas T, Berrish T, Humphriss D, Barriocanal L, Stewart M, Walker M, Wilkinson R, George K, Alberti MM. Cell membrane dynamics and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1995; 345: 357-8.

58.- Devynck MA. Do cell membrane dynamics participate in insulin resistance? *Lancet* 1995; 345: 336-7.

59.- Montilla, C. Muñiz O, Villar J, Ruiz-Gutierrez V, Stiefel P, Serreras JL. Erythrocyte membrane cholesterol and phospholipids composition in hypertensives vs normotensives. 62nd European Atherosclerosis Society Congress Abstracts Book 1993: 93.

60.- Razavian SM; Del Pino M, Duche C, Simon A, Levenson J. Increase of erythrocyte aggregation in hypertensive men with dyslipidemia. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1992; 85(8): 1197-9.

61.- Grinshtein IuI, Tereshchenko VP, Tereshchenko IuA, Romanova VIa. Disordered lipid metabolism and the morphofunctional instability of the erythrocyte membranes in patients with terminal kidney failure. *Ter Arkh* 1990; 62(6): 84-8.

62.- Koenig W, Hehr R, Ditschuneit HH, Kuhn K, Ernst E, Rosenthal J, Hombach V. Lovastatin alters blood rheology in primary hyperlipoproteinemia: dependence on

lipoprotein(a)? J Clin Pharmacol 1992; 32(6): 539-45.

63.- Beigel Y, Fuchs J, Snir M, Green P, Lurie Y, Djaldetti M. Lovastatin therapy in hypercholesterolemia: effect on fibrinogen, hemorrheologic parameters, platelet activity and red blood cell morphology. J Clin Pharmacol 1991; 31(6): 512-7.

64.- Paramonova IV, Ozerova IN, Akhmedzhanov NM, Pavlova LI, Perova NV. Effect of lipid-lowering drug treatment on HDL phospholipid composition in hyperlipidemic subjects. Atherosclerosis X 1994. Abstr 171.

65.- Schmitt Y, Schneider H. The effect of highly unsaturated fatty acids on the parameters of lipoprotein metabolism and rheology during their administration to patients undergoing chronic hemodialysis treatment. Z Ernährungswiss 1993; 32(3): 209-18.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Manuel Ángel Ruiz Corral

titulada Estadísticas de consumo cultural y visibilidad de firmas en universidades

acordó otorgarle la calificación de Apto con Lode

Sevilla, 25 de enero 1991

El Vocál,

El Vocál,

El Vocál,

El Presidente,

El Secretario,

El Doctorado,

[Handwritten signatures and stamps for El Vocál, El Presidente, El Secretario, and El Doctorado]