



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

MEDICINA

COMPOSICION LIPIDICA EN LA MEMBRANA
ERITROCITARIA Y ESTUDIO DE TRANSPORTE
IONICO TRANSMEMBRANA EN HIPERTENSOS
VERSUS CONTROLES

AUTORA: Cinta Montilla López

DIRECTOR: José Villar Ortiz

5 de Junio de 1995

R. 23388

T.D.
M/200



**COMPOSICION LIPIDICA DE LA
MEMBRANA ERITROCTARIA Y
ESTUDIO DE TRANSPORTE IONICO
TRANSMEMBRANA EN HIPERTENSOS
VERSUS CONTROLES.**

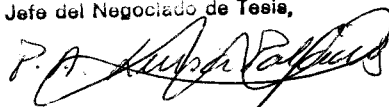
A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized letter 'P' with a loop at the top and a vertical stroke on the left.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 159 número 316 del libro
correspondiente.

Sevilla, 23 MAYO 1995

El Jefe del Negociado de Tesis,

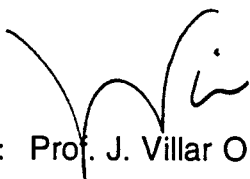


JOSE VILLAR ORTIZ, Profesor Titular del Departamento de MEDICINA,
de la Universidad de Sevilla y VALENTINA RUIZ GUTIERREZ, Doctora
en Biología e Investigadora del C.S.I.C.

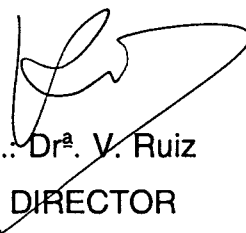
COMUNICAN :

Que la Licenciada D^a. **CINTA MONTILLA LOPEZ**, ha realizado el
trabajo de investigación que lleva por título: "**COMPOSICION LIPIDICA
DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA Y ESTUDIO DE TRANSPORTE
IONICO TRANSMEMBRANA DE HIPERTENSOS VERSUS CONTRO-
LES**", bajo nuestra dirección, reuniendo las condiciones para ser leida
y defendida como tesis para optar al GRADO DE DOCTOR en Medicina
y Cirugía.

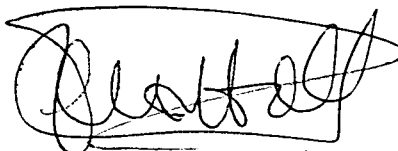
Para que conste y a los efectos oportunos, expidimos la presente
Comunicación en Sevilla a 23 de Mayo de 1.995.



Fdo.: Prof. J. Villar Ortiz
DIRECTOR



Fdo.: Dr^a. V. Ruiz
DIRECTOR



Fdo.: Cinta Montilla López
DOCTORANDO

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quiero dejar constancia de que es imposible para mí expresar con palabras el agradecimiento que siento hacia las personas que cito a continuación.

Al Dr. D. José Villar Ortiz, verdadero inspirador de este tema, por el continuo estímulo y confianza que de él recibo en cada momento y sobre todo por brindarme su amistad.

A la Dra. Dña. Valentina Ruiz-Gutierrez, que tanto me enseñó sobre las técnicas que se desarrollan en esta memoria, y que me abrió desde el principio las puertas de su laboratorio.

Al Dr. D. Miguel Angel García-Donas, por su imprescindible labor en este trabajo y porque está constantemente dispuesto a prestarme su ayuda.

Al Dr. D. Joaquín Carneado de la Fuente, por sus valiosísimos consejos y asesoramiento, y sobre todo por el apoyo personal que siempre recibo de él.

Al Dr. D. Jose Luis Serrera Contreras, porque me enseña día a día la rigurosidad en el trabajo, y porque apuesta siempre conmigo en el desarrollo de éste y otros tantos temas.

Al Dr. D. Francisco García-Muriana, porque siempre me ofrece su amable colaboración en la resolución de tantas dudas.

A los Dres. D. José Algaba, D. Manuel Almagro, Dña. Adela Baños, Dña. M^a Dolores Fernández-Vega, D. Tomás Gallego, Dña. M^a Sierra García-Valdecasas, D. Fidel Gayoso, D. Luis Jimenez, D. Antonio Mainar, Dña. M^a Dolores Mendoza, Dña. Carmen Molina, D. José Molina, D. Antonio Padilla, Dña. Maribel Peralbo, Dña. Concha Rey, D. Mario Ruiz, Dña. M^a Luisa Sanroma y D. Fernando Vaquero, porque han sido maestros y amigos durante todos estos años y porque el trabajo que realizan constituye la base fundamental de ésta y otras muchas Tesis.

A los residentes del Servicio de Bioquímica Clínica, por todo lo que hemos compartido; y a todos y cada uno de los miembros de éste Servicio porque de todos he aprendido.

A todos los miembros de la Unidad de Hipertensión y Lípidos porque formamos un estupendo equipo.

A Elo, porque siempre está cuando la necesitamos.

A mi familia y amigos porque de una forma u otra han colaborado en mi trabajo.

Es imposible que yo pueda expresar lo que ha significado la ayuda del Dr. D. Ovidio Muñiz Grijalvo; él y yo sabemos que sin su ayuda éste trabajo nunca hubiera llegado a fin.

DEDICATORIA.

A mi padre.

A mis hijos, Ignacio y María.

INDICE.

INTRODUCCION. 1

1. Introducción al transporte iónico en las membranas celulares.....1

1.1. Papel de los sistemas de transporte de sodio en la fisiopatología de la hipertensión esencial.

1.1.1. Aumento de la difusión pasiva de Na^+ .

1.1.2. Alteraciones de la ATPasa.

1.1.3. Anomalías del cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$.

1.1.4. Alteración del contratransporte $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ o $\text{Na}^+\text{-Na}^+$.

1.2 Otros transportadores posiblemente implicados en la fisiopatología de la hipertensión esencial.

1.2.1. Sistemas de transporte del calcio.

1.2.2. Sistema de transporte $\text{Na}^+\text{-H}^+$.

2. Composición lipídica de la membrana celular.....14.

2.1. Introducción.

2.2. Fluidez de membranas.

2.2.1. Concepto.

2.2.2. Determinantes de fluidez.

2.3. Composición lipídica de la membrana del eritrocito.

2.4. Cambios en las fracciones lipídicas. Repercusión funcional.

2.4.1. Cambios en el contenido en colesterol.

2.4.2. Cambios en las fracciones fosfolipídicas.

2.4.3. Cambios en los ácidos grasos de los fosfolípidos.

2.5. Cambios ejercidos por la dieta en la composición lipídica de la membrana y su repercusión funcional.

3. Relación entre la composición lipídica de la membrana celular y la actividad de los transportadores de cationes.....30.

3.1. Relación con otras enfermedades.

3.2. Relación con la hipertensión

OBJETIVOS.....35

MATERIAL Y METODOS 36

1. Pacientes.....36

2. Metodología.....37

2.1. Metodología de la determinación de los flujos basales de Na⁺.

2.1.1 Consideraciones previas.

2.1.2. Preparación de los hematíes

2.1.3. Determinación de los flujos de Na.

2.2. Metodología de la determinación de los flujos de Na⁺ en condiciones de sobrecarga: estudio cinético

2.2.1. Procedimiento para la sobrecarga de Na⁺.

2.2.2. Determinación de los flujos de Na⁺.

2.2.3. Cálculo de la variaciones cinéticas.

2.2.3.1. ATPasa Na.K.

2.2.3.2. Cotransporte Na.K.Cl.

2.2.3.3. Contrantransporte Na-Li.

2.2.3.4. Determinación de la velocidad máxima del contrantransporte Na⁺-Li⁺ (Técnica de Canessa).



2.3. Separación-identificación y cuantificación de los lípidos de la membrana del hematíe.	
2.3.1. Extracción lipídica.	
2.3.2. Separación y cuantificación de las distintas clases de lípidos.	
2.3.3. Separación de fosfolípidos de membrana eritrocitaria y preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.	
3. Análisis estadístico.....	51
RESULTADOS	52
1. Datos generales del plasma.....	52
2. Na ⁺ intraeritrocitario y valores basales y de cinética de transportadores iónicos.....	54
2.1. Resultados del estudio basal.	
2.2. Resultados del estudio cinético.	
3. Datos de composición lipídica de membrana.....	56
3.1. Composición en colesterol y fosfolípidos.	
3.2. Composición en ácidos grasos de fosfolípidos mayoritarios de membrana.	
3.3. Distribución de ácidos grasos de la esfingomielina.	
3.4. Distribución de ácidos grasos de la fosfatidilcolina.	
3.5. Distribución de ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina.	
4. Relación entre la composición lipídica de membrana y los transportadores de Na ⁺ .	62
TABLAS Y GRAFICOS	64
DISCUSION	84

1. Transporte iónico transmembrana	84
2. Composición lipídica de la membrana celular.....	86
2.1. Alteraciones de la relación molar colesterol/fosfolípido.	
2.2. Diferencias en los fosfolípidos de la membrana eritrocitaria.	
2.3. Composición en ácidos grasos de la membrana eritrocitaria.	
3. Influencia de los cambios en la composición lipídica de membrana en la actividad de los transportadores de Na ⁺	96
CONCLUSIONES	103
BIBLIOGRAFIA	105

INTRODUCCION.

1. INTRODUCCION AL TRANSPORTE IONICO EN LAS MEMBRANAS CELULARES.

La hipertensión arterial (HTA) es probablemente la enfermedad más ampliamente distribuida de cuantas afectan a la humanidad y su prevalencia se cifra entre el 20 y el 25% de la población de adultos de países desarrollados. Gran parte de su importancia radica en que se considera uno de los principales factores de riesgo de padecer enfermedad cardiovascular, causa de muerte más importante de la población occidental.

Existen evidencias epidemiológicas, clínicas y experimentales que apuntan una estrecha relación entre la HTA y algún trastorno del metabolismo del sodio¹. En las últimas décadas ha existido un creciente interés ante la posibilidad de que la HTA esencial pudiera estar causada por una alteración en la homeostasis intracelular de algunos iones, especialmente el Na⁺ y el Ca⁺⁺; todos los estudios se encaminaron a demostrar la existencia de anomalías de su transporte activo y pasivo a través de las membranas celulares.

En 1960 *Losse et al*² detectaron un aumento de la concentración intracelular de Na⁺ en eritrocitos de pacientes afectados de HTA. Estos datos fueron posteriormente refrendados por *Wessels y Zumkley*³ en un extenso trabajo con 300 individuos hipertensos. Estos autores demostraban que el contenido medio intraeritrocitario de Na⁺ en pacientes hipertensos era el 12% superior al de los normotensos. Esto indujo a muchos investigadores a profundizar en el conocimiento de su metabolismo celular, de sus movimientos a través de las membranas y de su relación con otros iones, en un intento de llegar a comprender la relación Na⁺-HTA a nivel molecular.

Debido a su fácil manejo, los eritrocitos humanos han sido las células más utilizadas para el estudio del metabolismo del Na⁺. Aunque estas células no se

hallan directamente implicadas en los mecanismos que regulan la presión arterial, su estudio debe considerarse como modelo, ya que los sistemas de transporte transmembranario de Na^+ son comunes a todas las células del organismo, siendo las alteraciones halladas en hematíes reproducibles en fibras musculares lisas vasculares, células del tubulo renal y neuronas noradrenérgicas⁴.

En la membrana del hematíe se han caracterizado los cuatro sistemas de transporte implicados en los movimientos de cationes (**figura 1**):

1. Difusión pasiva de Na^+ a través de la bicapa lipídica de la membrana, que da lugar a un flujo neto de entrada de Na^+ al interior de la célula y un flujo neto de salida de K^+ .

2. ATPasa Na^+ - K^+ sensible a ouabaína, conocida como bomba de Na^+ , que utilizando la energía proveniente de la hidrólisis del ATP, intercambia 3 moléculas de Na^+ intracelular por 2 de K^+ extracelular, con lo que se produce un flujo neto de cargas positivas al exterior contragradiante.

3. Cotransporte Na^+ - K^+ - Cl^- , sensible a furosemida y bumetanida, que genera pequeños flujos acoplados de ambos iones hacia el exterior de la célula. Este sistema actúa como mecanismo regulador de los desequilibrios iónicos que se generan como consecuencia de los dos sistemas fundamentales, difusión pasiva y bomba Na^+ - K^+ -ATPasa, y es además el responsable principal de la reabsorción de Na^+ a nivel renal en la porción ascendente del asa de Henle.

4. Contratransporte Na^+ - Li^+ , intercambia una molécula de Na^+ intracelular por otra extracelular, no generando por tanto cambios netos en la concentración de Na^+ intracelular. El Li^+ y probablemente el H^+ puedan sustituir al Na^+ en este sistema.

1.1. PAPEL DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE SODIO EN LA FISIOPATOLOGIA DE LA HTA ESENCIAL.

Las anomalías del metabolismo celular del Na^+ descritas en la HTA esencial referencian tanto un aumento de su concentración intracelular como un alteración en los sistemas de transporte de los que depende su movimiento a ambos lados de la membrana.

1.1.1. Aumento de la difusión pasiva de Na^+ .

Ya en 1967, Wessels³ había observado un aumento en la incorporación de Na^+ en hematíes de pacientes hipertensos esenciales, que sospecharon era debido a un aumento de su entrada por difusión pasiva; aunque en las condiciones en las que trabajaron la intrusión de Na^+ era también mediada por el cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$, contratransporte $\text{Na}^+\text{-Na}^+$ y transportador de aniones. Años más tarde el grupo de Garay⁵ demostró que el flujo de Na^+ en hematíes incubados en medio conteniendo ouabaína y bumetanida, inhibidores de la bomba de Na^+ y del cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ respectivamente, mostraba las propiedades cinéticas de la difusión pasiva. Este mismo grupo unos años más tarde caracterizó un subgrupo de hipertensos esenciales cuyos valores de difusión pasiva eran claramente superiores a los de los controles⁶ y los denomina "hipertensos *leak +*". Según este autor entre un 15 y un 25% de los hipertensos esenciales están dentro de este grupo; en nuestro medio se ha detectado esta anomalía en una cifra no superior al 12%^{4,7}.

Estos pacientes con aumento de la difusión pasiva no necesariamente tienen aumentada la concentración intracelular de Na^+ , puesto que esta alteración puede ser compensada por parte de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ y del cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cuya respuesta frente al aumento del Na^+ intracelular es un aumento de su actividad. No obstante si estos sistemas están defectuosos o ante

una situación de sobrecarga salina, estos transportadores pueden saturarse y el Na^+ intracelular puede aumentar.

Frente a una sobrecarga salina y en respuesta a la expansión del líquido extracelular, se libera un factor natriurético "ouabaína-like" que condiciona el aumento de la natriuresis bloqueando la boma de Na^+ del polo vascular del túbulo renal e impidiendo la reabsorción del Na^+ filtrado. La bomba de Na^+ disminuye su actividad también en la célula del músculo arteriolar, determinando que el cotransporte $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ sea el único sistema disponible para eliminar el exceso de Na^+ intracelular originado por el aumento del leak. En caso de que el efecto compensatorio de este mecanismo fuese insuficiente o la sobrecarga salina demasiado grande, aumentaría el contenido de Na^+ intracelular, y esto supone una dificultad para la extrusión del Ca^{++} por el sistema de cotransporte $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$; esto último unido a un aumento de la sensibilidad de los receptores adrenérgicos originado por el aumento del Na^+ intracelular que regula la unión de la adrenalina con los receptores alfa₂ plaquetarios, produciría un aumento del tono vascular, y con ello una elevación de las cifras de tensión arterial^{18,9}.

1.1.2. Alteraciones de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$.

La ATPasa Na^+-K^+ es el principal mecanismo de extrusión activa de Na^+ del que dispone la célula. Es un sistema del que disponen todas las membranas celulares del organismo. Presenta una estequiometría 3:2, es decir, externaliza 3 moléculas de Na^+ por cada dos de K^+ que introduce, y es selectivamente inhibido por la ouabaína a concentración 0.1 mMolar. El flujo de Na^+ que de ella depende puede variar por acción de sustancias moduladoras de su actividad, y por modificaciones del número de unidades de bomba existentes en la membrana celular. Su principal función es la de mantener un gradiente iónico-eléctrico transmembranario correcto (cociente de Na^+-K^+ de 34 en medio extracelular y de 0.07 en el intracelular) y un potencial de membrana de alrededor de -60 mV, permitiendo así la correcta función de multitud de sistemas vitales.

En su actividad la bomba de Na^+ consume una cantidad considerable de energía, habiendo sido estimado que la actividad de este mecanismo puede ser responsable del 20 al 50% de la termogénesis celular total. El grupo de De Luise¹⁰ encuentra una disminución del 22% del número de unidades de bomba en eritrocitos de obesos comparados con controles no obesos así como un aumento paralelo en la concentración intracelular de Na^+ en estos enfermos. Asimismo la magnitud de la reducción en el número de unidades de bomba por célula se correlaciona negativamente con el porcentaje del peso ideal, sugiriendo que un defecto en la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ puede estar presente en algunos tipos de obesidad humana y jugar un papel importante.

En la HTA esencial se ha descrito una disminución en la actividad de la bomba por la mayoría de los autores¹¹⁻¹³, pero estos datos no han sido corroborados por todos¹⁴⁻¹⁶. No obstante estos hallazgos discordantes pueden ser explicados por diferentes motivos. Por ejemplo si las bombas están parcialmente inhibidas por el factor "ouabaína-like", existirá un aumento compensador en el número de unidades de bomba por célula, tal como se observa en el tratamiento crónico con digitálicos^{17,18}. Así, las células de los pacientes pueden mostrar una actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ normal, aumentada o disminuida, dependiendo de que el inhibidor se disocie de las bombas durante la manipulación experimental, de que haya existido un cambio previo de la concentración de Na^+ intracelular como resultado de la inhibición, o de que se produzca un aumento compensador del número de unidades de bomba por célula.

Hasstedt *et al*¹⁹ encuentran que el número de unidades de bomba que exhiben las células de una persona está explicado en parte por la herencia que las determina, encontrándose la expresión de un alto número de unidades de bomba ligado a herencia recesiva, existiendo homocigotos para este alelo con una frecuencia de un 1.74%, (560.0 unidades/célula roja frente a una media de 312.2 unidades/célula roja en otros fenotipos). Así la diabetes y la HTA precoz son más prevalentes en mujeres con fenotipo de mayor número de bombas, así como la

enfermedad coronaria en varones con esta misma condición. No está este grupo de acuerdo con lo estimado por De Luise¹⁰ ya que Hasstedt¹⁹ encuentra un aumento aunque no significativo en el número de unidades de bomba en adultos obesos de ambos sexos.

En definitiva ya sea por presencia de inhibidores plasmáticos circulantes, por anomalía intrínseca del sistema, o por ambos mecanismos la bomba de Na⁺ exhibe en algunos hipertensos esenciales una anomalía que viene definida por un aumento en la constante **K_m**, es decir, un incremento en la concentración intracelular de Na⁺ necesaria para producir la mitad del máximo eflujo posible a través del transportador^{11,12}. Esta alteración traduce una disminución en la constante de afinidad por el Na⁺ intracelular y puede ser compensada por un aumento en la velocidad máxima de este transportador o del cotransporte Na⁺-K⁺-Cl⁻. Esta anomalía afectaría a un porcentaje comprendido entre el 5 y el 25% de los hipertensos esenciales (hipertensos denominados "pump o bomba-")^{11,12,19-22}.

1.1.3. Anomalías del cotransporte Na⁺-K⁺-Cl⁻.

El cotransporte de Na⁺-K⁺-Cl⁻ es un sistema de extrusión del Na⁺ intracelular con un flujo acoplado de salida de K⁺ y Cl⁻ en una relación 1:1:2. Este mecanismo se ve regulado por sustancias vasoactivas a nivel celular. EL AMPc inhibe el cotransporte Na⁺-K⁺-Cl⁻ en musculatura lisa vascular y endotelio, mientras que la bradiquinina y la vasopresina lo estimulan^{23,24}. En musculatura vascular el péptido natriurético atrial estimula a este transportador²⁵.

En 1979 Garay y Meyer²⁶ demostraron un descenso de su actividad en hipertensos esenciales tanto en condiciones basales como tras sobrecarga salina. De acuerdo con ellos otros autores posteriormente han evidenciado un descenso de su actividad frente a controles normotensos^{16,27-35}, mientras que otros no han observado diferencias significativas³⁵⁻³⁹ o han encontrado un aumento⁴⁰.

Sin embargo al estudiar las características cinéticas del cotransporte en una población de hipertensos esenciales, **Garay et al**³⁴ han podido observar que existe un subgrupo de pacientes con una anomalía caracterizada por una disminución de la afinidad aparente del cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ por el Na^+ intracelular, es decir, un incremento en la constante **K50**. Esto origina una dificultad en la extrusión, pues los hematíes requieren mayores concentraciones intracelulares del catión para conseguir el mismo nivel de estimulación que un individuo normal. El defecto del cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ de estos pacientes (llamados hipertensos "Co -") puede pasar desapercibido en el caso de que solo se determinen flujos basales, sin estudio de cinética, ya que esta alteración puede verse compensada al aumentar la velocidad máxima de transporte de forma que si el defecto en la constante de afinidad no es grande el flujo global puede verse no afectado.

El defecto en el cotransporte es intrínseco y hereditario, estando ligado a un gen único, y se transmite con carácter autosómico dominante³³⁻⁴¹; afecta a un máximo del 35% de la población de hipertensos esenciales²⁰. Su carácter genético se traduce en la existencia de un mayor porcentaje de hipertensos con descenso del cotransporte en la raza negra⁴².

La gran frecuencia de solapamiento entre las poblaciones de controles, hipertensos y descendientes sanos de hipertensos²⁸ disminuye la especificidad de este transportador en su utilidad como test de diferenciación entre HTA esencial y secundaria, identificación de sujetos en estadios prehipertensivos o como marcador pronóstico y terapéutico de este tipo de hipertensos.

1.1.4. Alteración del cotransporte $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ o $\text{Na}^+\text{-Na}^+$.

Este transportador, uno de los más interesantes en el campo de la HTA esencial intercambia Na^+ por Na^+ en proporción 1:1, pero también tiene afinidad por el Li^+ . Su existencia es conocida desde hace al menos 15 años, cuando se descubre que en los pacientes maníaco-depresivos en tratamiento con Li^+ el efecto

era mayor según se alcanzasen concentraciones intraeritrocitarias más altas de Litio. En 1875, Haas⁴⁵, estudiando por qué mecanismo entra el Litio en el eritrocito, observa que la entrada del mismo está facilitada por la existencia de un gradiente de Na⁺. Es decir, que hematíes cargados de Na⁺ presentan una mayor entrada de Litio y hematíes cargados de Li⁺ un mayor flujo de entrada de Na⁺. Por lo tanto un medio extracelular saturado de Li⁺ impide la entrada de Na⁺ y un medio muy rico en Na⁺ impide el influjo de Li⁺. Se trata pues de un transportador Na⁺-Li⁺ que funciona por un mecanismo consecutivo o en "ping-pong"⁴⁶. Hay que suponer que el intercambio Na⁺-Li⁺ se realiza porque el Li⁺ ocupa el lugar del Na⁺ en un transportador Na⁺-Na⁺, demostrado por técnicas isotópicas⁴⁷ y cuya función es desconocida, aunque algunos autores han sugerido que se trata de otra forma de operar del transportador Na⁺-H⁺, responsable de la reabsorción de Na⁺ en TCP, pudiendo intervenir por ello en una forma de HTA sal-sensible.

Ya en 1980 Canessa *et al*⁴⁸ demostraron un aumento de la actividad del contratransporte Na⁺-Li⁺ en hematíes de hipertensos esenciales. Para ello determinaron el flujo de salida de Li⁺ estimulado por Na⁺ extracelular. El grupo de Weder³⁵ trabaja midiendo flujo de entrada de Li⁺ sensible a floretina (inhibidor específico del sistema), y el de Garay⁴⁹ y Coca⁴ determinan el eflujo de Na⁺ sensible a ouabaína y bumetadina, cuando se incubaba en un medio con Li⁺. Esta última técnica es más rápida y estos autores prefieren llamarla contratransporte Na⁺-Li⁺ para diferenciarla del contratransporte Li⁺-Na⁺ que sería el mismo sistema determinado por la técnica de Canessa. Sin saberse aún hoy el por qué, el flujo no es exactamente el mismo en ambas técnicas por lo que sería conveniente hacer esa diferenciación.

A pesar de estas diferencias metodológicas la mayoría de los autores coinciden en señalar que este mecanismo se encuentra alterado en la HTA esencial^{4,16,27,36,40,48,50-54}. En nuestro medio el aumento de la Velocidad máxima Na⁺-Li⁺ es la anomalía más frecuente y afecta entre el 25 y el 49% de los HTA esenciales^{4,51}. A estos pacientes se les denomina "counter +". Esta alteración no se observa en ninguna forma de HTA secundaria⁵⁴.

Es posible que su alteración al igual que la Na⁺-K⁺-ATPasa se deba a la existencia de un factor plasmático dializable, ya que según evidenció **Woods**⁵⁵ la velocidad del contratransporte disminuye tras la ultracentrifugación y hemodiálisis en pacientes con nefropatía hipertensiva. Sin embargo existen suficientes datos para afirmar que el motivo principal del defecto de este transportador es de origen genético. Tanto el mismo **Woods**^{56,57} como otros autores^{27,48,58} han descrito un aumento del contratransporte en normotensos con historia familiar de HTA que no se observa en hijos de normotensos.

Parecen existir evidencias de transmisión ligada a un locus mayor^{59,60} y en un trabajo realizado en donantes sanos de Rochester⁶¹ se observa una correlación positiva entre las cifras del contratransporte y las de tensión arterial. Tanto **Mangili et al**⁶² como **Relimpio**⁶³ describen un aumento en el flujo del contratransporte en pacientes diabéticos. El grupo de **Mangili** observa este aumento en diabéticos con enfermedad renal pero no en diabéticos sin nefropatía, ni en enfermos renales sin diabetes, teniendo ambos grupos de enfermos renales cifras altas de presión arterial. Concluyen estos autores que la predisposición a HTA determinada por un aumento en el contratransporte pudiera ser un marcador de riesgo precoz para la nefropatía diabética.

Otras entidades parecen asociarse con un aumento en el contratransporte, como la hiperlipidemia^{53,64}. En cuanto al sexo, la mujer suele mostrar cifras más bajas de contratransporte⁶⁵. No existen por el momento evidencias de que la restricción salina⁶⁶, la restricción calórica⁶⁷ o las dietas con suplementos de ácido oleico o linoleico⁶⁸ originen cambios en las cifras del contratransporte. En cuanto a la HTA el grupo de **Corrocher**⁵⁴ encuentra una correlación positiva entre las cifras de contratransporte y la actividad de renina plasmática.

1.2. OTROS TRANSPORTADORES POSIBLEMENTE IMPLICADOS EN LA FISIOPATOLOGIA DE LA HTA ESENCIAL.

1.2.1. Sistemas de transporte del Calcio.

En los últimos años, diversos estudios epidemiológicos han identificado el bajo consumo de calcio en la dieta como un factor de riesgo para el desarrollo de la HTA^{69,70}. En líneas generales puede decirse que una persona que consume una dieta que contenga 300 mg diarios de Ca^{++} tiene un riesgo para el desarrollo de HTA de un 11-14% superior a otro de su misma edad, sexo y raza que consume 1200 mg diarios⁶⁹. Otra evidencia más que relaciona el Ca^{++} con la HTA deriva de los estudios del grupo de **McCarron**⁷¹ que demuestran un descenso tensional en casi la mitad de los hipertensos esenciales al ser sometidos a dietas con suplemento oral de Ca^{++} . Pero la mayor evidencia que implica dicha alteración como causa de HTA ha surgido de los estudios del metabolismo celular de este catión.

La contracción de la musculatura lisa arteriolar depende del Ca^{++} libre intracelular que ejerce función de mensajero entre el estímulo y la respuesta; entra en la célula a través de canales propios (canales de Ca^{++}) controlados a partir de receptores específicos, o por cambios en el potencial de membrana, dando lugar a un aumento en su concentración citosólica y provocando la contracción muscular. A continuación una parte se incorpora a estructuras intracelulares, pero el resto debe salir, haciéndolo contragradiente gracias a sistemas de transporte activo. La existencia de estos canales de Ca^{++} tiene importancia terapéutica porque en ellos actúan los calcio-antagonistas o bloqueantes de canales de Ca^{++} que bloquean su apertura originando una disminución de la entrada de Ca^{++} , provocando con ello vasodilatación⁷².

El defecto de la extrusión del Ca^{++} por sus transportadores activos provocaría por tanto un aumento en su concentración intracelular aumentando el tono vascular. A este respecto existen estudios que demuestran un aumento de la

concentración intracelular de Ca^{++} en la HTA tanto en hematíe⁷³ como en leucocito^{74,75} o en plaquetas⁷⁶.

A la correlación directa que parece existir entre la concentración de Ca^{++} y la tensión arterial⁷⁷, se le suma la reciente evidencia de Zidek *et al*⁷⁸ que tras aislar en plasma de HTA esenciales un extracto capaz de provocar un aumento de la tensión arterial de ratas, vieron que se acompañaba de un aumento del influjo de Ca^{++} en los neutrófilos de estos animales.

Todo esto ha inducido a distintos autores a buscar una alteración en la cinética de los transportadores que ayude a explicar todos estos mecanismos. La homeostasis del Ca^{++} se consigue fundamentalmente a merced de dos sistemas de transporte:

1. La ATPasa Ca^{++} dependiente o bomba de Ca^{++} , que utilizando la energía producida por la hidrólisis del ATP, constituye el mecanismo básico de extrusión de Ca^{++} . Aunque posee una gran afinidad por el Ca^{++} intracelular no tiene capacidad para transportarlo en grandes cantidades, por lo que su función es eliminar constantemente pequeñas cantidades de Ca^{++} , no pudiendo responder tras la entrada masiva de este ión que se produce tras la despolarización y el potencial de acción⁷⁹. No obstante la calmodulina es capaz de multiplicar por 30 la afinidad de la bomba de Ca^{++} y aumenta también su velocidad máxima^{80,81}. Quizá una alteración de este sistema puede contribuir a la aparición de un aumento de la concentración de Ca^{++} intracelular en los hipertensos esenciales. En este sentido se ha encontrado defectos en la calmodulina para estimular a la bomba de Ca^{++} ^{82,83}, y disminución de la actividad basal del transportador en la HTA esencial⁸⁴, no siendo esto último confirmado por todos los autores⁸⁵. Es posible que la existencia de una heterogeneidad en la población hipertensa sea la explicación para esta diferencia de resultados.

El grupo de Garay junto con de la Sierra⁸⁶ tras estudiar recientemente la cinética de la bomba de Ca^{++} en hipertensos y normotensos, han observado un aumento de su actividad en el 25% de hipertensos con aumento de la velocidad máxima de transporte y aumento en la constante de disociación por el Ca^{++} interno.

2. El contratransporte $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ es capaz de extruir una molécula de Ca^{++} intracelular, intercambiándola con 3 o más moléculas de Na^+ extracelular. Este sistema actúa en ambos sentidos, siendo este mecanismo de baja afinidad para el Ca^{++} , pero con alta capacidad de estimulación, lo que le convierte en el principal mecanismo de extrusión de Ca^{++} citosólico tras la despolarización celular^{87,88}. Los derivados del amiloride pueden inhibir parcialmente este sistema⁸⁹. Este intercambiador no está presente en los hematíes humanos pero ha sido bien caracterizado en otras células directamente implicadas en el mantenimiento de la presión arterial, como pueden ser las neuronas noradrenérgicas, las fibras musculares lisas vasculares o las células del túbulo renal.

El hecho de que en los hipertensos esenciales existiera un aumento en las concentraciones intracelulares de Na^+ , debido al descenso de la actividad del cotransporte (hipertensos "Co -"), o descenso de la actividad de la bomba (hipertensos "pump -") o aumento de la difusión pasiva de Na^+ (*leak +*) o al aumento de la actividad del transportador Na^+-H^+ , sería causa del intento compensador por parte del contratransporte $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ que originaría un aumento en la concentración de Ca^{++} libre citosólico y por ello del tono vascular y las cifras de presión arterial.

1.2.2. Sistema de transporte Na^+-H^+ .

Este sistema o sistemas son los responsables de imprescindible mantenimiento del pH intracelular. En este sentido las células disponen de tres mecanismos fundamentales que le permiten regular su pH y cuya importancia relativa depende del tipo celular:



-
1. ATPasa H⁺ dependiente.
 2. Transportador de aniones, capaz de transportar en ambos sentidos aniones Cl⁻ y CO₃H⁻, y
 3. Transportador Na⁺-H⁺ o contratransporte Na⁺-H⁺ que transporta en ambos sentidos Na⁺ y H⁺.

Este último transportador se ha demostrado en prácticamente todas las células en las que ha sido investigado⁹⁰⁻⁹⁴ y cumple funciones esenciales para el mantenimiento de la vida.

Además de la regulación del pH intracelular juega un importante papel en el mantenimiento del volumen celular, la reabsorción transepitelial de Na⁺ o la excreción de H⁺, actuando como mensajero en funciones de reproducción y/o activación celular, respuesta a hormonas y factores de crecimiento tisular. Por todo ello ha sido recientemente implicado en multitud de patologías como el cáncer, alteraciones renales del EAB, hipertofia patológica de órganos y la HTA esencial. En este último campo los resultados de investigaciones recientes son como poco prometedores.

El grupo de **Milanick**⁹⁵ mide el flujo de protón asociado a la bomba de calcio en eritrocito humano, en un intento de caracterizar los efectos de las distintas concentraciones de protones extracelulares en la bomba de Ca⁺⁺, y de determinar la estequiometría Ca⁺⁺-H⁺. Concluyen que esta cinética es dependiente de la concentración extracelular de protones, siendo la estequiometría 2:2 en situación de un aumento de H⁺ extracelular, y de 2:1 si es baja la concentración, inhibiendo el Ca⁺⁺ extracelular la actividad de la bomba a bajas concentraciones de H⁺ extracelular, originándose una competencia entre el Ca⁺⁺ y el H⁺ extracelulares por el transportador.

2.COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA CELULAR.

2.1. INTRODUCCION.

La estructura aceptada actualmente para las biomembranas de las células de los mamíferos es la de una bicapa lipídica (bilayer) asimétrica compuesta principalmente por fosfolípidos y colesterol a los que se le asocian las distintas proteínas, teniendo éstas funciones importantes en la célula como receptores, transportadores y enzimas. Estas proteínas pueden estar en la superficie membrana (proteínas periféricas) o empotradas en la envergadura o matriz de la membrana (proteínas integrales). En menor proporción existen hidratos de carbono formando parte de glucolípidos y glucoproteínas.

Los lípidos de la membrana se distribuyen en un 40% de colesterol no esterificado, 50% de fosfolípidos y 10% de glucolípidos y ésteres de colesterol^{96,97}. El colesterol constituye un pool único que se intercambia por el transportado por las lipoproteínas plasmáticas⁹⁸.

Todos los fosfolípidos de membrana en general (fosfatidilcolina -PC, fosfatidilserina -PS-, fosfatidiletanolamina -PE-, fosfoinositol -PI-) menos las cardiolipinas, contienen ácidos grasos de 16 a 22 átomos de carbono. Estos ácidos grasos son en su mayoría insaturados, presentando de 1 a 4 dobles enlaces; todos con conformación "cis", lo que permite una mayor compactación. Dependiendo del pH la cadena polar puede ser neutra (PC, PE) o negativa (PS, PI).

El estado dinámico de los lípidos de éste bilayer fué descrito ya en 1972 por Singer y Nicholson⁹⁹ y es uno de los pilares básicos del modelo de mosaico fluido de la estructura de la membrana. El estado físico de la membrana se define como el de una fluidez relativa, un estado intermedio entre los estados sólido y

líquido, denominado estado mesomórfico. En este fluido especial flotan las proteínas como en un mar lipóideo, y como destaca la imagen sugerida por Singer y Nicholson en 1972 (Figura 2), gran parte de la molécula proteica se encuentra sumergida en el estrato lipídico bimolecular, como la parte oculta de un iceberg. Hay otras proteínas que están contenidas totalmente en la capa lipídica, y son las verdaderas proteínas integrantes de la membrana; otras son periféricas, situadas en la cara externa o en la interna, y finalmente hay otras proteínas que atraviesan la membrana totalmente de un lado a otro y son de una importancia funcional extraordinaria, porque nos explican la posibilidad de transmitir información de fuera a dentro de la célula.

Una cuestión básica formulada entonces fue si las interacciones entre lípidos contenidos en la bicapa podrían modificar/modular la actividad de las proteínas de membrana. Así es evidente que las funciones de estas proteínas pueden ser influenciadas por las propiedades de los lípidos de la matriz lipídica, incluyendo su fluidez. Estas funciones entre otras incluyen los mecanismos de reconocimiento antigénico, el aporte de ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas, el transporte de diversas sustancias y la relación con los ejes hormonales sistémicos a través de receptores específicos; alteraciones en la composición lipídica de la membrana pueden ser responsables de la alteración de todas estas funciones, a partir de la afectación de la movilidad lateral y el apiñamiento de las proteínas, su orientación vertical y su conformación. Ya desde entonces se conocía que la membrana del eritrocito humano tras la exposición a fosfolipasa A2 e hidrolización de sus ácidos grasos con posición sn-2 de los glicerofosfolípidos, reducía el transporte de glucosa en un 75%. Además la actividad de la Na⁺-K⁺-ATPasa de la membrana del eritrocito disminuía¹⁰⁰. Mientras que tales estudios establecen que la estructura del bilayer lipídico de membrana puede influenciar la actividad de proteínas de la misma, no proveen de información sobre si estos defectos ocurren también en células intactas.

Desde el punto de vista de la fisiología celular y la regulación de su metabolismo, existen cuestiones críticas sobre si cambios en la composición

química de su membrana, pueden realmente ocurrir en la célula viva, y de ser así, si estos cambios son de suficiente magnitud como para influenciar la funcionalidad de la membrana. Extensos trabajos informan sobre estos temas en la últimas décadas, muchos de ellos realizados en cultivos de células de mamíferos¹⁰¹⁻¹⁰⁶.

2.2. FLUIDEZ DE LAS MEMBRANAS

2.2.1. Concepto.

El concepto de fluidez de membrana se refiere al orden y movimiento del *core* hidrocarbonado del bilayer lipídico. La fluidez de las membranas biológicas es importante para proporcionar a las células la flexibilidad suficiente para adaptarse a variaciones de forma, la fusión de diferentes membranas, proporcionar flexibilidad a las proteínas integrales y permitir la difusión de proteínas y lípidos¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Actualmente se han podido caracterizar los movimientos de los fosfolípidos de la membrana. Hay un movimiento interno que se produce dentro de cada molécula por rotación de la cadena hidrocarbonada en torno a alguno de sus enlaces C-C. Hay además movimientos globales de una molécula que pueden ser desplazamientos laterales o rotaciones alrededor de su eje longitudinal. Existe también otra forma de desplazamiento en que una molécula pasa de una capa a otra del doble estrato; este movimiento se denomina de "*flip-flop*". Las moléculas proteicas sufren movimientos análogos. Las interacciones de lípidos y proteínas tienden a disminuir la libertad de movimientos moleculares. La movilidad y por consiguiente el estado físico de los fosfolípidos depende fundamentalmente de la temperatura; al aumentar ésta, las moléculas lipídicas, antes de llegar a su verdadero punto de fusión, sufren una transición crítica o cambio de estado, al pasar de un estado de gel ordenado o cristalino a otro estado de líquido cristalino, asociado con un aumento de la libertad conformacional de las cadenas de ácidos

grasos. La temperatura de transición aumenta con el número de carbonos y disminuye según aumente el número de dobles enlaces.

En este sentido se requiere una regulación de la fluidez de membrana por parte de la célula, ya que un exceso de la fluidez, no es compatible con el mantenimiento de la integridad celular y un defecto de fluidez no permite el intercambio rápido de sustancias a su través¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

2.2.2. Determinantes de fluidez.

La fluidez está principalmente determinada por la composición lipídica, siendo el colesterol y la relación colesterol/fosfolípido uno de los principales determinantes de su estado, ya que parece sostener la matriz bilayer en un estado de "fluido intermedio"^{110,111}.

La relación molar colesterol/fosfolípido no es sin embargo el único determinante; la composición en fosfolípidos^{112,113} y la longitud y grado de insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos afectan también la fluidez^{111,114}. Asimismo las interacciones lípido-proteína y los tipos de proteína existentes en la membrana pueden influenciar la fluidez de la misma^{115,116}. Pueden ser preparados eritrocitos ricos en colesterol incubando con dispersiones ricas en éste¹¹⁷. Las células resultantes tienen severas anormalidades, incluyendo un decremento en la fluidez de su membrana^{118,119}.

En pacientes con hepatopatías las anormalidades en la composición de las lipoproteínas plasmáticas están asociadas a sus correspondientes cambios en la composición lipídica de la membrana eritrocitaria¹²⁰. Las membranas son más ricas en colesterol y fosfatidilcolina y la relación colesterol/fosfolípido está aumentada; estos cambios pueden afectar la estructura y propiedades de los eritrocitos, su forma y deformabilidad es anormal y está disminuida la permeabilidad al sodio^{121,122}.

La estructura y las propiedades dinámicas de la matriz lipídica han sido extensamente estudiadas, usando técnicas tales como RNM, resonancia electrónica *spin* y polarización de fluorescencia^{123,124}.

Con frecuencia los análisis lipídicos de la membrana son expresados como relaciones o proporciones más que como cantidades absolutas por milígramo de proteína; éstos son independientes de las variaciones en el contenido de proteínas de membrana y son indicadores muy buenos de las interacciones lípido-lípido entre biomembranas.

2.3. COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO.

Los lípidos juegan un importante papel en la membrana del eritrocito; la bicapa lipídica no sólo constituye la matriz estructural de la membrana plasmática sino que también actúa como barrera de permeabilidad y tabique entre el citoplasma y el suero que lo circunda, además de contener como ya ha sido comentado una gran variedad de proteínas estructurales¹²⁵.

Los lípidos totales de la membrana del eritrocito comprenden alrededor del 40% de su peso; alrededor de la mitad de las fracciones lipídicas consisten en colesterol no esterificado (40%) y la otra mitad son fosfolípidos (50%) y glucolípidos junto con ésteres de colesterol (10%). Cuantitativamente los fosfolípidos más importantes son esfingomielina (**SM**), fosfatidilcolina (**PC**), fosfatidiletanolamina (**PE**), y fosfatidilserina (**PS**), que comprenden el 95% del total de fosfolípidos. Los tres últimos son diacilglicerofosfolípidos, cuya "columna vertebral" (esqueleto central) está formado por una molécula de glicerol; dos largas cadenas de ácidos grasos están esterificadas en los grupos hidroxilo en posición 1 y 2; la tercera posición está ocupada por un grupo fosfato que se une a la colina (**PC**), serina (**PS**) o etanolamina (**PE**). Otras variaciones son posibles, pero en la membrana del

eritrocitos otros lípidos tienen menor importancia. La **SM** pertenece a una clase de fosfolípidos que contienen esfingosina como "columna vertebral" en lugar de glicerol.

Esta estructura consiste en una cadena carbonada de longitud fija y un doble enlace que incluye dos grupos hidroxilo y un grupo NH₂ con una cadena larga de ácido graso que es esterificado vía amida, formando entonces una ceramida. El segundo grupo OH transporta un grupo fosforilcolina y es el mismo que el de la **PC**. Los glicolípidos se asemejan a la **SM** ya que todos ellos contienen una unidad de ceramida, pero el grupo polar es distinto, y consisten en una gran variedad de polisacáridos complejos que pueden contener más de 20 residuos de azúcares.

Cada una de las distintas clases de fosfolípidos representa un grupo de componentes que tienen todos el mismo grupo polar de cabeza, pero distintos ácidos grasos con variaciones en la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces. De este modo la **PC** de la membrana del eritrocito, consiste en más de 20 especies moleculares distintas. El tipo más abundante es uno con un ácido graso saturado en posición 1 y uno insaturado en posición 2 del esqueleto de glicerol¹²⁷.

De este modo los lípidos de la membrana del eritrocito comprenden más de 100 especies moleculares distintas. Esta extraordinaria complejidad de la composición puede servir o modificar distintas funciones de membrana. Sin embargo nuestro conocimiento del significado de todas estas especies moleculares es todavía fragmentario^{128,129}.

En general los dos fosfolípidos que contienen colina (**SM** y **PC**) constituyen entre el 45 y el 60% de los fosfolípidos totales, pero sus cantidades relativas varían considerablemente en los eritrocitos de las distintas especies, estando también sometidos a variaciones interindividuales.

2.4. CAMBIOS EN LAS FRACCIONES LIPIDICAS. REPERCUSION FUNCIONAL.

2.4.1. Cambios en el contenido en colesterol.

El efecto de los cambios en el contenido en colesterol sobre la viscosidad de la membrana ha sido ya comentado y muy estudiado en el eritrocito humano. Metodos de fluorescencia han podido probar que el aumento en el contenido de colesterol de la membrana restringe el movimiento molecular en la porción hidrofóbica de la misma^{1,117-119,125,131}.

Normalmente este colesterol se encuentra en forma libre, con sólo trazas de colesterol esterificado. Por su hidrofobia no forma estructuras compactas con él mismo, intercalándose con los fosfolípidos. Su grupo -OH interacciona con la cabeza polar de los fosfolípidos, mientras que el anillo esteroideo interacciona con las cadenas de ácidos grasos tendiendo a inmovilizarlos. En general, el colesterol tiende a hacer la membrana menos fluida a temperaturas de alrededor de 37°C¹²⁵.

A pesar de gran cantidad de intentos para aproximarse a la distribución exacta del colesterol a ambos lados de la membrana, este dato es todavía incierto^{125,128}. **Roelofsen**¹²⁵ en el año 1981 publicó que, en general, el colesterol de membrana eritrocitaria sana está situado fundamentalmente en la monocapa externa. Un trabajo recientemente publicado por nuestro grupo¹²⁶ encuentra una distribución asimétrica del colesterol en membrana de eritrocito de pacientes hipertensos.

El grupo de **Owen**¹¹¹ estudia la composición lipídica de la membrana de eritrocitos de pacientes con enfermedad hepática y la compara con la obtenida de sujetos sanos, encontrando que existe un considerable aumento en el contenido absoluto en colesterol y relación colesterol/fosfolípido, siendo ésta la principal causa de la disminución en la fluidez de la membrana y de las distintas alteracio-

nes funcionales de la misma. Esta conclusión coincide con los resultados de **Vanderkooi et al**¹³¹ y con los de **Hutchai y Cooper**¹¹⁰. Aunque también encuentran que un aumento en la relación PC/SM tiene como consecuencia una disminución en la fluidez de membrana, es el incremento en el contenido en colesterol el mayor responsable de la disminución de la fluidez de la membrana eritrocitaria de sus pacientes.

2.4.2. Cambios en las fracciones fosfolípidicas.

La membrana celular es asimétrica en el sentido de que no son iguales su lado citoplásmico y su lado externo. Esto se reveló ya en las primeras imágenes obtenidas con el microscopio electrónico: la capa de proteínas exteriores no se hace visible cuando las preparaciones se fijan con OsO_4 , que visualiza en cambio las proteínas del lado interno. Ambas son visibles en las preparaciones fijadas con permanganato, dando la imagen clásica de dos bandas oscuras, separadas por una banda clara, que **Robertson** ha denominado "unidad de membrana". Las proteínas externas son diferentes porque llevan los factores de reconocimiento celular, que no existen en el lado interno: factores específicos de grupo ABO, de grupo Rh, antígenos de histocompatibilidad, etc.

Ahora bien, la membrana celular es también asimétrica en relación con los fosfolípidos que no están distribuidos uniformemente entre las dos capas lipídicas de la membrana. De esta manera los fosfolípidos que contienen colina (**PC** y **SM**) están preferentemente localizados en el lado externo y la **PE** y la **PS** en el lado interno de la membrana¹²⁵. De este modo en la membrana del eritrocito humano el 76% de la **PC** y el 82% de la **SM** se encuentra en la monocapa externa, mientras que el 80% de la **PE** y toda la **PS** se localiza en el lado interno. Todos los glicolípidos están en el lado externo. Una orientación que pudiera ser lógica es que todos los lípidos junto con las glicoproteínas, que tienen residuos de azúcar en el lado externo de la membrana, determinan las propiedades antigénicas de la célula.

Los fosfolípidos del hematíe humano normalmente están constituidos aproximadamente en un 30-32% por PC, por PE y SM ambas alrededor del 20-25% y PS en un 10-15%; en estas células los ácidos grasos que se encuentran varían entre 12 y 22 átomos de carbono, siendo más abundante el de 16 carbonos saturado y el de 18 átomos de carbono con uno o dos dobles enlaces; la máxima insaturación corresponde a un ácido graso de 22 carbonos con 6 dobles enlaces³⁰.

Las dos mitades del *bilayer* lipídico no deberían ser consideradas como dos entidades separadas más o menos. De acuerdo con la teoría de Sheetz y Singer¹³², drásticos cambios son observados en la morfología de la célula cuando se introducen pequeñas modificaciones en el monolayer externo respecto al interno. Existe el convencimiento de que estos cambios pueden resultar del tratamiento de células intactas con Fosfolipasas. La modificación de los grupos polares de los fosfolípidos del *monolayer* externo, mediante tratamiento con fosfolipasa C, causa decremento en su superficie y consecuentemente la célula muestra invaginaciones¹³³. El tratamiento de eritrocitos con fosfolipasa A2 induce la producción de lisocomponentes y ácidos grasos libres en el *monolayer* externo, con productos de ruptura que se piensa cubren áreas completas, ligeramente mayores que aquellas que han sido ocupadas por el compuesto diacil original. De esta manera el *monolayer* externo se expandirá relativamente hacia el interior, lo cual aparentemente conduce a la aparición de equinocitos^{125,134}. Además de alteraciones en su conformación, ha sido recientemente demostrado que las alteraciones en la composición de la membrana del eritrocito, pueden ser causa del incremento en la adherencia al endotelio que muestran los hematíes de pacientes diabéticos¹³⁵.

De estas especulaciones puede también deducirse que la estabilidad del *bilayer* es también dependiente de la distribución de las especies moleculares de cada clase de fosfolípidos sobre las dos capas de la membrana. Existe aún un cierto grado de incertidumbre sobre el significado fisiológico de la distribución asimétrica de los fosfolípidos y su mantenimiento.

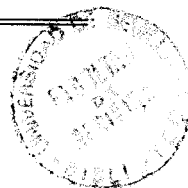
La ATPasa transportadora de cationes de la membrana llamada $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPasa, y la $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -ATPasa, han sido mostradas como dependientes de los glicerofosfolípidos del *monolayer* interno^{134,136}. La actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPasa al menos en el eritrocito, es mantenida solamente por la PS, mientras que la actividad de la $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ -ATPasa está mantenida por todos los glicerofosfolípidos (PC,PE,SM y PS) situados en el *monolayer* interno. Ambos sistemas enzimáticos han sido considerados proteínas integrales, y, consecuentemente en estrecho contacto con ambos lados del *bilayer*; el hecho de que solamente los glicerofosfolípidos que están presentes en el lado interno estén implicados en la actividad de ambas enzimas, adquiere una especial dimensión cuando los centros activos de ambos sistemas miran también al interior de la célula¹²⁵.

2.4.3. Cambios en los ácidos grasos de los fosfolípidos.

Los ácidos grasos (AG) que constituyen los fosfolípidos son sintetizados mayoritariamente en el retículo endoplásmico, a partir del ácido linoleico y Ó-linolénico (AG esenciales), que procedentes de la grasa dietética y mediante reacciones alternas de desaturación y elongación dan lugar a AG más insaturados y de mayor peso molecular; en la figura pueden observarse las distintas vías metabólicas de las cuatro principales familias de AG poliinsaturados (PUFA).

Las más importantes familias son la n-3, n-6 y n-9, basadas en los ácidos linolénico (n-3), linoleico(n-6) y oleico (n-9). Los AG pertenecientes a la misma familia están relacionados biosintéticamente y pueden transformarse unos en otros, mediante procesos enzimáticos de desaturación, elongación de la cadena o acortamiento de la misma.

El ácido linoleico (c18:2,n-6), comparable al oleico (c18:1,n-9) en cuanto a su amplia distribución y alto contenido en las distintas especies, puede considerarse el prototipo de PUFA. El ácido *p*-linoleico (c18:3,n-6) es el primer intermediario en la bioconversión de linoleico a araquidónico, y forma parte tan sólo como



trazas de los fosfolípidos de los aceites de pescado. El araquidónico tiene una enorme importancia al ser precursor de prostaglandinas (PG), tromboxanos (Tx) y leucotrienes, y puede aislarse de las grasas de hígado y huevo. El Ó-linolénico (c:18,n-3), es producto de origen vegetal. Otros AG importantes de la familia n-3, son el eicosapentaenoico (EPA) (c:20,n.3) y el docohexaenoico (DHA) (c:22,n-3), componentes mayores de los aceites de pescado, siendo el EPA fuente importante de algunas PG y Tx. De los AG esenciales, el linoleico sólo está en los vegetales, pero los restantes pueden ser sintetizados a partir del linoleico ingerido en la dieta.

De las dos reacciones, desaturación y elongación, las de desaturación desempeñan un papel primordial en la biosíntesis de ácidos poliénicos, y están catalizadas por distintas desaturasas. Se han descrito las delta 9, 6, 5 y 4 desaturasas. Todas estas enzimas utilizan como sustrato un AG unido a CoA. En general las desaturasas muestran mayor afinidad por el sustrato más insaturado, compitiendo los distintos sustratos por el enzima. El orden de preferencia sería: familia del linolénico>linoleico>oleico>palmitoleico.

La delta 6 desaturasa ocupa una posición clave en la ruta biosintética de los PUFA, ya que, regula la síntesis de ácido araquidónico (20:4 *n*-6), catalizando la conversión de ácido linoleico (18:2 *n*-6) a alfa-linolénico (18:3 *n*-6); de modo que una modificación de su actividad, repercutiría rápidamente en la biosíntesis de todos los AG superiores. La delta 6 desaturasa está influenciada por distintos factores alimenticios, hormonales y ambientales. La falta de AG esenciales aumenta su actividad y los poliinsaturados de cadena larga la disminuyen por retroinhibición.

La delta 5 desaturasa cumple una función importante en la desaturación de AG de 20 átomos de carbono, principalmente en la conversión del ácido eicosatrienoico (20:3 *n*-6) a eicosatetraenoico (20:4 *n*-6), ambos precursores de prostanoides. La actividad delta 5 desaturasa es modificada por factores alimentarios y hormonales, y por mecanismos competitivos y de inducción. Por ejemplo, la deficiencia

de AG esenciales disminuye su actividad. La trioleína y los PUFA de la serie n-6 producen una reactivación del enzima (Figura 3)

Recientemente se ha puesto de manifiesto que el enterocito posee actividad 6 y 9 desaturasa, postulando que el propio enterocito podría sintetizar parte de los AG necesarios para formar los fosfolípidos de sus membranas, y para la síntesis de lipoproteínas.

Según todo lo anteriormente indicado las desaturasas desempeñan un papel importante en la provisión de estructuras adecuadas para determinar las propiedades fisicoquímicas convenientes de las membranas biológicas, y servir además, de precursores de sustancias específicas de gran actividad biológica. Por ello, en situaciones patológicas, como diabetes mellitus, ingestión crónica de alcohol o resección intestinal, las alteraciones en la composición de las membranas celulares podrían deberse a cambios en la actividad de estas desaturasas, lo que daría lugar a cambios en las propiedades fisicoquímicas de las membranas, y como consecuencia, en las características de los distintos sistemas de transporte transmembrana¹³⁷.

Las alteraciones en la función celular también pueden estar producidas por distintas modificaciones en la longitud y el grado de insaturación de los AG constituyentes de los fosfolípidos¹³⁸. Igualmente se ha propuesto que los AG libres causan alteraciones en la actividad de la Na⁺-K⁺-ATPasa, flujo de Ca⁺⁺ o actividad de la guanilciclase¹³⁰⁻¹⁴¹. Una pequeña cantidad de AG pueden ser generada como resultado del *turn-over* continuo de los grupos "*fatty-acyl*" de los fosfolípidos de la membrana^{11,14,45}. Es posible que cuando la composición en AG de los fosfolípidos se modifica, la composición de los AG generados pueda ser capaz de alterar determinados procesos sensibles a ellos⁹⁶.

Un aumento en el contenido en AG insaturados de los fosfolípidos de la membrana, afectan a las propiedades de captación del receptor de la insulina de

distintas líneas celulares^{144,145}, incluso en membrana de eritrocito, como ha sido recientemente constatado por el grupo de **Pelikanova**¹⁴⁶.

Igualmente cambios en la composición en la **PC** influyen la captación de la tirotrina por su receptor. La captación del receptor de opiáceos disminuye al enriquecer la membrana en PUFA sin que cambie la afinidad del receptor^{147,148}.

La modificación de la composición en AG de los fosfolípidos de la membrana puede afectar también a la producción de PG. El enriquecimiento de distintas líneas celulares con 18:2 incrementa la producción de PGE₂, mediante la conversión de 18:2 a 20:4. La mayor formación de PGE₂ está aparentemente causada por un aumento en la disponibilidad de 20:4 (ácido araquidónico) en el pool intracelular de fosfolípidos que proporciona el sustrato para la síntesis de PG.

El sistema que ha sido estudiado más ampliamente en relación a la producción de PG, son las células endoteliales. Cuando estos cultivos son estimulados con trombina, el enriquecimiento con distintos AG, fundamentalmente 18:2, 20:4 y 20:5 induce a un aumento en la producción de prostaciclina (PGI₂); sin embargo el enriquecimiento en 18:1 o 22:6 puede reducir la producción de PGI₂. Las plaquetas también producen menos Tx A₂ cuando son enriquecidas con 18:2¹⁴⁹.

2.5. CAMBIOS EJERCIDOS POR LA DIETA EN LA COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA Y SU REPERCUSION FUNCIONAL.

Los PUFA son constituyentes fundamentales de las membranas, formando parte de los fosfolípidos integrantes de las mismas, como ya ha sido extensamente comentado. Las alteraciones en sus niveles han sido relacionadas con distintas condiciones patológicas¹⁵⁰.

Hace unos años un grupo catalán estudió la composición de los AG de la membrana de la célula roja en una población sana de su entorno¹⁵¹. Coinciden con otros autores en los porcentajes relativos de los distintos AG de las clases mayores de fosfolípidos. Se encuentran diferencias sustanciales en los fosfolípidos minoritarios de las muestras, lo que probablemente puede deberse a diferencias metodológicas. En la mayoría de los casos sin embargo, las diferencias entre los estudios pueden atribuirse a las características de la población.

El sexo no es una importante fuente de variación, excepto durante la infancia. El mayor factor contribuyente a la variación es la composición de la dieta. El tipo de AG de la dieta influye en el perfil de AG de los lípidos plasmáticos y triglicéridos, y a medio-largo plazo, de los lípidos constituyentes de la membrana celular.

El relativo alto consumo de lípidos poliinsaturados de aceites vegetales y la disminución en el consumo de aceites provenientes del pescado en nuestra población han de tenerse en cuenta a la hora de evaluar los relativos cambios sufridos en los últimos años. Las variaciones en la dieta a la que nos sometemos son capaces de modificar la composición de nuestras membranas, incluso en pocos meses. **Putnan et al**¹⁵² sometieron a dos grupos de recién nacidos durante 4 meses a distinta alimentación, dando a un grupo leche maternizada (cuyos compuestos grasos derivan de aceites vegetales), y al otro leche materna. La mayoría de las fórmulas adaptadas contienen 2 o 3 veces más de ácido linoleico (ácido graso esencial) que la leche humana, sin embargo, la relación linoleico/Ó-linolenico es dos veces superior en la leche humana, siendo éste un índice importante de la bondad de la composición de las membranas celulares. Asimismo encuentran mayor grado de insaturación en los AG de PE y PC de la membrana eritrocitaria en niños alimentados con leche humana que en aquellos que tomaron fórmulas adaptadas. Resultados similares fueron encontrados por **De Lucchi**¹⁵³ en un espacio mucho más corto de tiempo (1 mes).

En el año 1986 un grupo japonés practicó un estudio de intervención dietética sobre pacientes diabéticos¹⁵⁴. Se sometió a estos enfermos a una dieta enriquecida con aceite de pescado (sardina), muy rico en EPA (20:5). Antes del consumo de este aceite la fluidez de membrana de eritrocitos de estos pacientes fue significativamente menor que en el grupo control, mostrando asimismo un bajo índice de insaturación en los AG de los fosfolípidos mayores. Tras el consumo del suplemento de aceite de sardina durante 8 semanas, se incrementó considerablemente la fluidez de sus membranas, aumentando los niveles de 20:5 en los fosfolípidos y disminuyendo la relación colesterol/fosfolípido. Asimismo se pudo comprobar que el grupo control sometido a la misma dieta respondía de la misma forma. Proponen estos autores que el aumento en la fluidez de las membranas de estos pacientes tras la dieta, podría probablemente contribuir a mejorar la respuesta funcional de la célula diabética.

Los desórdenes en el metabolismo lipídico durante la insuficiencia renal crónica tienen un importantísimo papel en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular, complicación importante de este síndrome; la hiperlipemia observada en estos pacientes acelera significativamente la progresión del fallo renal. Por este motivo **Loschiava et al**¹⁵⁵ estudiaron dos grupos de insuficientes renales *matcheados* por edad, sexo y grado de insuficiencia renal, sometiendo a un grupo de ellos a 6 meses de dieta baja en proteínas y elevado índice de poliinsaturados/saturados. Tras este tiempo se encontró un aumento en este índice en los pacientes sometidos a la dieta propuesta; se detectó al mismo tiempo una correlación negativa entre el porcentaje de polinsaturados y el nivel de triglicéridos y creatinina plasmática. Estos datos sugieren que las dietas hipoproteicas conteniendo un alto índice insaturados/saturados, podrían contrarrestar las anomalías del metabolismo lipídico de estos enfermos.

El grupo finlandés de **Hessel** publicó en *Atherosclerosis*¹⁵⁶, los resultados obtenidos tras someter a un grupo de adultos sanos a 12 semanas de dieta rica en pescado fresco. Midieron deformabilidad y agregabilidad eritrocitarias, encontrando que, tras este tipo de dieta, rica en PUFA de la serie n-3, la

deformabilidad del eritrocito aumenta significativa y proporcionalmente a la cantidad de pescado ingerido; además se comprueba una disminución de la agregabilidad artificial del eritrocito, no observándose cambios ni en el volumen corpuscular medio ni en la concentración de hemoglobina corpuscular media. Este estudio sugiere que cambios relativamente pequeños en el perfil de PUFA de la membrana, originan importantes cambios en las propiedades viscoelásticas de la membrana del hematíe, así como en su tendencia a la agregación.

3. RELACION ENTRE LA COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA CELULAR Y LA ACTIVIDAD DE LOS TRANSPORTADORES DE CATIONES.

El mecanismo mediante el cual los lípidos pueden influir en la actividad de ciertos transportadores es desconocida actualmente, si bien se ha especulado con la posibilidad de que los lípidos de membrana próximos a un transportador pueden afectar su conformación aumentando o reduciendo la accesibilidad a sus sitios de unión específica⁹⁶.

Ya desde los años 70 muchos investigadores comprobaron que la actividad de numerosas proteínas de membrana, es modificada por los cambios en la composición lipídica de la misma. La actividad de la adenilciclase se afecta por los cambios de composición de las cadenas de los AG de los fosfolípidos y de grupos polares de las células LM¹⁵⁷. Para explicar estos cambios se ha sugerido que los cambios en la composición lipídica de la membrana puede inducir cambios en la conformación de la adenilciclase modificando así su actividad¹⁵⁸. Este hecho ha podido comprobarse igualmente en plaquetas¹⁵⁹.

Más recientemente pudo verse también que un enriquecimiento de la membrana del eritrocito en colesterol, inhibía el cotransporte de cationes. Estudios isotópicos han demostrado que el colesterol de la membrana se intercambia rápidamente con el colesterol no esterificado de las lipoproteínas, como ya ha sido anteriormente referido, existiendo un equilibrio dinámico entre ambos, pudiéndose decir por tanto que de alguna forma, el contenido en colesterol de la membrana depende o está muy influenciado por la cantidad de colesterol que existe en el medio que rodea al hematíe¹⁶⁰. En este sentido Willey y Cooper¹⁶¹ estudiaron el efecto del enriquecimiento en colesterol de la membrana sobre la cinética del cotransporte de cationes $\text{Na}^+\text{-K}^+$ sensible a furosemida. Estudiaron

dicho efecto incubando los eritrocitos en un medio con alto cociente colesterol/fosfolípidos; encontraron que un enriquecimiento en el colesterol membranario superior al 70% inhibe los influjos de ambos cationes y amplifica la inhibición mediada por furosemida. Este efecto inhibitorio sugiere que el colesterol puede modificar la posición del carrier encargado del cotransporte de Na^+ y K^+ , o bien, que puede enlentecer su movimiento debido a un microambiente más viscoso y más rígido de la membrana.

Estas mismas alteraciones pudieron encontrarse en un estudio de **Kimelberg**¹²² y en otro de **Owen**¹²² con enfermos hepáticos; éste último encontró correlaciones negativas entre el flujo de Na^+ no sensible a ouabaína y las concentraciones intracelulares de Na, y la relación molar colesterol/fosfolípido en la célula.

Más recientemente, en el año 1991, un grupo argentino demuestra que también los fosfolípidos de la membrana pueden alterar la afinidad aparente de la bomba Ca^{++} -ATPasa por el Ca^{++} , como ya antes había sido sugerido, pero que su acción no es reflejo de una alteración directa sobre la región C-terminal de la molécula de Ca^{++} -ATPasa, como es el caso de la calmodulina, estando aún por aclarar su mecanismo de acción¹⁶³.

En este mismo campo fueron importantes las aportaciones de **Thomas et al**¹⁶⁴, que demuestran que la acción de las drogas antagonistas del calcio, como es el caso de la flunaracina, depende de su interacción con los fosfolípidos de las membranas plasmáticas.

3.1. RELACION CON OTRAS ENFERMEDADES.

Son muchas las enfermedades que muestran cambios en la composición lipídica de la membrana del eritrocito. Además de las ya referenciadas, también se han descrito en la esferocitosis hereditaria¹⁶⁵, en la esclerosis múltiple¹⁶⁶, en el

síndrome de Zellweger¹⁶⁷, en niños con desnutrición calórico-proteica¹⁶⁸ y en la osteocondrosis¹⁶⁹.

A partir de ello han sido muchos los investigadores que intentan correlacionar los cambios sufridos en la composición lipídica de la membrana con la actividad en sus transportadores. Este es el caso del grupo italiano de **Mazzanti**¹⁷⁰ que evidencia que la reducción de la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ presente en los diabéticos tanto insulin como no insulin dependientes puede ser debido a un cambio en la actividad de la enzima provocado por modificaciones en la fluidez de las membranas. **Goroncoli**¹⁷¹ estudió la relación entre la composición en AG de la membrana del eritrocito y el contratransporte $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ en enfermos con síndrome nefrótico. Encontró una correlación positiva entre el contrastransporte $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ (mayor en pacientes con síndrome nefrótico), y la cantidad de AG saturados de la membrana del hematíe; por el contrario la correlación fue negativa con la cantidad total de AG insaturados.

Estudios de intervención dietética, como ya hemos visto pueden modificar incluso a corto plazo la composición lipídica de la membrana, pudiendo ser esto origen de cambios en el transporte de iones a través de la misma, como demostraron **Pagnan et al**¹⁷² en un grupo de voluntarios sanos.

3.2. RELACION CON LA HIPERTENSION.

En 1990 un grupo de investigadores suecos intentó poner un poco de luz en las distintas especulaciones hechas a lo largo del tiempo con referencia a la coexistencia y relación entre los cambios en la composición de la membrana del eritrocito y su repercusión en los distintos transportadores en la HTA esencial¹⁷³. Estudiaron el flujo de iones transmembranario en 95 hipertensos esenciales y 39 individuos sanos, encontrando que la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ estaba disminuida en la mayor parte de los estados de HTA; a medida que la HTA progresaba

la relación colesterol/fosfolípidos aumentó, teniendo esto influencia clara sobre la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$.

Estudios de polarización de fluorescencia en eritrocitos y plaquetas de pacientes con HTA esencial y de ratas espontáneamente hipertensas, encuentran un incremento de la microviscosidad de las membranas al compararlas con controles sanos¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. *Tsuda et al*¹⁷⁷ usando resonancia electron *spin* confirmaron una disminución de la fluidez de membrana de eritrocitos y cultivo de musculo vascular en ratas hipertensas. Las propiedades fisicoquímicas como microviscosidad de biomembranas son afectadas por el contenido en colesterol, fosfolípidos y sus AG.

Son de gran importancia los datos aportados por *Dominiczak et al* en el año 1991 publicados en *Hypertension*¹⁷⁸. Este grupo compara la microviscosidad de las membranas de la célula roja y de músculo liso vascular, su composición en fosfolípidos y su metabolismo, en ratas normo e hipertensas. Encuentran un aumento en la microviscosidad de las células de tejido vascular de las ratas hipertensas en relación con las normotensas. Sus observaciones sugieren que el aumento de la viscosidad (disminucion de la fluidez) de las membranas es generalizado, y tiene un potencial efecto sobre la funcionalidad de las distintas proteínas transportadoras de iones; esto estaría de acuerdo con la gran cantidad de estudios que reportan un aumento en la permeabilidad al Na^+ , al K^+ y al Ca^{++} en la HTA¹⁸⁰⁻¹⁸²; estas observaciones son también apoyadas por *Jones et al*¹⁸³ que encuentran que el aumento de la microviscosidad en la HTA está acompañada de un incremento en el flujo de cationes. *Bialecki y Tulenko*¹⁸⁴ han estudiado la relación entre viscosidad de la membrana y permeabilidad. Observan que un incremento en la incorporación del colesterol en las membranas causa un incremento en la permeabilidad al Ca^{++} . Por su parte, *Okamoto et al*¹⁸⁵ evidencian que la PC y la PE son fluidificadoras en la membrana, mientras que las proteínas, el colesterol y la SM son rigidificantes.



En resumen, los estudios de **Dominiczak**^{178,179}, sugieren que las anomalías en las membranas de los eritrocitos y de las plaquetas pueden ser generalizadas, encontrándose de sumo valor las observadas en la musculatura vascular, básica en la regulación de la presión arterial. Estos autores sugieren, en fin, que el incremento en la microviscosidad de la membrana celular encontrado en la HTA causa el aumento en la permeabilidad al Na⁺, al K⁺ y al Ca⁺⁺ observado en esta enfermedad.

OBJETIVOS.

En el planteamiento de nuestro trabajo nos trazamos los siguientes **objetivos**:

1. Estudiar el contenido en sodio intracelular y la actividad basal y cinética de los principales sistemas de cationes.
2. Estudiar si existen diferencias en la composición lipídica de la membrana del eritrocito entre hipertensos y controles, tanto en colesterol y fosfolípidos como en la distribución de los ácidos grasos de los fosfolípidos mayoritarios.
3. Analizar si existen relaciones entre dicha composición lipídica de membrana y la actividad o cinética de los distintos sistemas de transporte transmembrana de sodio.

MATERIAL Y METODOS.

1. PACIENTES.

Se estudió un grupo de 15 pacientes portadores de HTA ligera de reciente diagnóstico y aún sin tratamiento farmacológico y un grupo control de 13 sujetos sanos sin antecedentes familiares en primer grado de HTA que formaban parte del personal sanitario de nuestro hospital. Los pacientes fueron reclutados aleatoriamente de las consultas externas la Unidad de Hipertensión y Lípidos del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. A cada individuo estudiado se le realizó una detallada anamnesis en la que se recogieron los antecedentes familiares y personales, con especial atención a los factores de riesgo vascular (HTA, diabetes mellitus, hiperlipemias, enfermedad vascular precoz, hábitos tóxicos) y un completo examen clínico. Ninguna de las mujeres de ambos grupos estaba embarazada o bajo tratamiento con anticonceptivos hormonales. Las características de la población estudiada (edad, sexo, índice de Quetelet y cifras tensionales) se especifican en la **TABLA 1**.

El diagnóstico de HTA se realizó en base a los criterios de la OMS, con un mínimo de dos tomas de presión arterial separadas al menos por una semana, y el de HTA esencial tras completo estudio clínico, analítico y radiológico que descartase HTA secundaria. Todos los casos se encontraban en grado I-II de repercusión visceral de la clasificación de la OMS, y no habían seguido hasta entonces ningún tratamiento antihipertensivo, siendo todos de reciente diagnóstico.

2. METODOLOGIA.

Tras 12 horas de ayuno se recogieron muestras de 20 ml de sangre venosa en tubos heparinizados (heparina-litio). Para el estudio de la actividad de transportadores de membrana, las muestras sanguíneas se procesaron inmediatamente. En el caso del análisis lipídico de membrana eritrocitaria, no se observaron alteraciones de origen oxidativo si las muestras se mantenían congeladas a -80°C en atmosfera inerte (N_2). Las distintas determinaciones plasmáticas se realizaron en el suero que se obtenía por centrifugación de las muestras de sangre total extraídas.

Los niveles de glucosa, creatinina, ácido úrico, colesterol total y sus fracciones (HDL, HDL₂, HDL₃, y LDL colesterol), fosfolípidos y triglicéridos se determinaron por métodos enzimáticos convencionales y las apolipoproteínas AI y B por nefelometría-láser.

2.1. Metodología de la determinación de los flujos basales de Na^+ .

2.1.1. Consideraciones previas.

La determinación de los flujos de Na^+ se realizó siguiendo el método descrito por Garay *et al*⁴⁹. El flujo de Na^+ dependiente de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ fue considerado como el componente sensible a la ouabaína de la extrusión neta de Na^+ a través de la membrana del hematíe. El flujo de Na^+ vehiculizado por el Cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ fue considerado como aquél resistente a la ouabaína e inhibido por la bumetanida. El flujo de Na^+ dependiente del Contratransporte $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ se consideró como el componente de la salida neta de Na^+ que, siendo resistente a la ouabaína y a la

bumetanida, era estimulado por Li^+ . Finalmente el flujo pasivo de Na^+ se entendió como el componente de la extrusión de Na^+ resistente a la ouabaína y a la bumetanida en un medio enriquecido con Mg^{++} y sacarosa.

2.1.2. Preparación de los hematíes.

La sangre era centrifugada a 1750xg durante 5 minutos a 4°C, aspirándose y eliminándose, a renglón seguido, el sobrenadante y la capa de leucocitos y plaquetas. Posteriormente los eritrocitos se lavaban cuatro veces con una solución de MgCl_2 110 mM a 4°C; en cada uno de los lavados, los eritrocitos eran diluidos a un hematocrito (Hto) aproximado de un 10%, siendo centrifugados luego, y tras aspiración del sobrenadante, vueltos a lavar de esta misma forma.

Una vez lavados, los eritrocitos eran resuspendidos en una solución de sacarosa- Mg^{++} , hasta alcanzar un Hto de un 20-25%. La solución referida contenía MgCl_2 75 mM, Sacarosa 85 mM, MOPS-TRIS (Acido 4-morfolinopropanosulfónico-Tris; PH 7.4, a 37°C) 10 mM y Glucosa 10 mM. Se obtenía de este modo, lo que desde ahora denominaremos "suspensión celular inicial".

A continuación se separaba una porción (aproximadamente 50 μl) de la suspensión celular inicial, se hemolizaba con 5 ml de agua bidestilada y se cuantificaba el Hto inicial real (mediante la absorbancia de la hemoglobina a 540.5 nm) y las concentraciones de Na^+ y K^+ intracelulares (mediante espectrofotometría de absorción atómica). El contenido de Na^+ intracelular se cuantificaba en mmol/l de células, conforme a la siguiente fórmula:

$$\text{Na}^+ \text{ medido (micromol/l)} \times 10 / \text{valor de HTo}$$

Alícuotas de la suspensión celular inicial se distribuían en 16 tubos (4 para cada sistema de transporte), a los que se añadían las "soluciones específicas" de cada sistema (que luego se describen), hasta lograr una suspensión celular final con un Hto de un 5% aproximadamente (lo que a efectos prácticos lográbamos uniendo 1 cc de la solución celular inicial y 4 cc de la solución específica). El Hto final se cuantificaba mediante la determinación de la absorbancia de la hemoglobina en la propia suspensión celular final (Ab Hb final), de forma que su valor se calculaba conforme a la fórmula siguiente:

$$\text{Hto final} = \text{Hto inicial} \times \text{Ab Hb final} / \text{Ab Hb inicial}$$

La osmolaridad se mantuvo a lo largo de todo el proceso a 295 ± 10 mOsm/l.

Las soluciones específicas para cada sistema de transporte eran preparadas añadiendo a la suspensión celular inicial los siguientes elementos:

- * Medio 1 (para la valoración de la extrusión total de Na^+): KCl 2mM.
- * Medio 2 (para la valoración de la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$): Ouabaína 0.1 mM.
- * Medio 3 (para la valoración de la actividad del Cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$): Ouabaína 0.1 mM y Bumetanida 0.02 mM.
- * Medio 4 (para la valoración de la actividad del Contratransporte $\text{Na}^+\text{-Li}^+$): Ouabaína 0.1 mM, bumetanida 0.02 mM y ClLi 10 mM.

2.1.3. Determinación de los flujos de Na⁺.

Estas soluciones específicas eran incubadas en baño de maría con agitación continua a 37°C. El momento en que esta incubación se iniciaba era considerado el tiempo 0. Para la cuantificación de los cationes extracelulares se detenía la incubación y se enfriaban los tubos rápidamente colocándolos a 4°C; se centrifugaban a 1750xg durante 10 minutos. Esto se efectuaba en el tiempo 0 en los medios 1 y 3. A los 30 minutos se determinaba el Na⁺ del sobrenadante del medio 1 y a los 60 minutos, de los medios 2, 3 y 4. La cuantificación del Na⁺ del sobrenadante se realizaba mediante espectrofotometría de absorción atómica, con un espectrofotómetro Perkin-Elmer 460.

Los flujos de Na se cuantificaban según la fórmula:

$$\text{Flujo de salida} = (\text{Dcat}) \times (100 - \text{Hto final}) / t \times \text{Hto final}$$

donde t representa el tiempo de incubación expresado en horas y Dcat (en micromoles/litro de sobrenadante) la diferencia entre la concentración externa del catión en el tiempo 0 y en el tiempo 30 o 60 de la incubación. El resultado era expresado en $\mu\text{mol/L}$ de células/hora-1.

El flujo de Na⁺ dependiente de la ATPasa Na⁺-K⁺ se calculó por diferencia entre el flujo en el medio 2 y en el medio 1.

El flujo de Na⁺ dependiente del Cotransporte Na⁺-K⁺-Cl⁻ se calculó sustrayendo el flujo en el medio 3 del medio 2.

La actividad del Contratransporte $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ se calculó sustrayendo el flujo de Na^+ en el medio 3 del medio 4.

El flujo pasivo de Na^+ se asumió como aquél que acontecía en el medio 3 en el tiempo 0 y los 60 minutos de incubación, siendo expresado por su constante de permeabilidad ($K_p\text{Na}^+$), calculada como el cociente entre el flujo pasivo de Na^+ y su concentración intracelular y quedando expresado en horas^{-1} .

2.2. Metodología de la determinación de los flujos de Na^+ en condiciones de sobrecarga: estudio cinético.

2.2.1. Procedimiento para la sobrecarga de Na^+ .

Para el estudio de los flujos de Na^+ en condiciones de sobrecarga, se prepararon alícuotas de células conteniendo diferentes concentraciones intracelulares de Na^+ . Para ello era utilizado un método basado en la estimulación fisiológica del influjo de Na_2HPO_4 a través del transportador de aniones.

Cuatro alícuotas de hematíes lavados eran resuspendidas, a un Hto aproximado de un 5%, en cuatro diferentes medios de sobrecarga de Na^+ que contenían:

* Medio 1: MgCl_2 75mM; sacarosa 85mM; MOPS-TRIS 10 mM y glucosa 10 mM.

* Medio 2: NaCl 150 mM; Na_2HPO_2 2.5 mM; PH 7.4 a 37°C); MgCl_2 1mM; glucosa 10 mM; inosina 3mM y adenina 2 mM.

* Medio 3: NaCl 75 mM; Na_2HPO_4 50 mM; sacarosa 35 mM; glucosa 10 mM; inosina 3 mM y adenina 2 mM.

* Medio 4: Na_2HPO_4 100 mM y Sacarosa 75 mM.

Los hematíes del medio 1 eran procesados inmediatamente, según lo expuesto en lo relativo al estudio basal. Los hematíes de los medios 2, 3 y 4 eran incubados en baño de maría durante 120 minutos a 37°C y luego resuspendidos a un Hto del 10% en el medio 2 e incubados durante otros 120 minutos a 37°C. Al final del periodo de sobrecarga, los hematíes eran centrifugados a 1750xg durante 5 minutos a 37°C y posteriormente, guardados a 4°C hasta el día siguiente.

En experimentos de control verificamos que el pH celular, el contenido de fosfato inorgánico y la absorbancia de hemoglobina por litro de célula (indicador indirecto del volumen celular) eran normales.

2.2.2. Determinación de los flujos de Na⁺.

La determinación de los flujos de Na⁺, para cada uno de los sistemas de transporte, y en cada uno de ellos, con una concentración intracelular de Na⁺ diferente, lograda según el método expuesto, se llevaba a cabo según se describe en el apartado 1.3.

2.2.3. Cálculo de las variaciones cinéticas.

El estudio del comportamiento de los distintos sistemas de transporte con distintas concentraciones intracelulares de Na⁺ nos permitía conocer las variables cinéticas que definen dichos sistemas; esto es, la afinidad aparente por el Na⁺ intracelular y la velocidad máxima del eflujo de Na⁺.

El eflujo de Na⁺ catalizado por cada uno de los transportadores fue expresado en función de la concentración intracelular de Na⁺.



2.2.3.1. ATPasa Na⁺-K⁺.

Por lo que se refiere a la bomba de Na⁺ en hematíes humanos, su funcionamiento puede expresarse según una ecuación de Hanes modificada^{11,186}:

$$V_p = V_{p,max} / (1 + K_p Na^+ / [Na^+]_i)^3$$

donde V_p representa el eflujo de Na⁺ sensible a la ouabaína; $V_{p,max}$ es la velocidad máxima de dicho eflujo, $K_p Na^+$ representa la constante de disociación aparente para el Na⁺ intracelular ($[Na^+]_i$) y 3 es el número de lugares de unión para el Na⁺ intracelular de la bomba.

La ecuación precedente puede ser formulada del modo siguiente:

$$1/V_p = (1 + K_p Na^+ / [Na^+]_i)^3 / V_{p,max}$$

$$1/V_p^{1/3} = 1/V_{p,max}^{1/3} + K_p Na^+ / V_{p,max}^{1/3} \times [Na^+]_i$$

$$[Na]_i / V_p^{1/3} = [Na^+] / V_{p,max}^{1/3} + K_p Na^+ / V_{p,max}^{1/3}$$

El término izquierdo de la ecuación fue enfrentado a la $[Na^+]$, obteniendo una gráfica de Hanes.

La velocidad máxima de la bomba ($V_{p,max}$) y la constante de disociación aparente de la misma (K_pNa^+) se calcularon mediante análisis de regresión lineal de la pendiente y de la intersección de la abcisa, respectivamente, de la curva obtenida en la gráfica referida.

La $[Na^+]$ requerida por una estimulación medio-máxima de la bomba de Na^+ se obtuvo de la ecuación:

$$V_{p,max}/2 = V_{p,max}/(1+K_pNa^+/K50\%)^3$$

de donde se deduce:

$$K50\% = K_pNa^+ \times 0.26$$

quedando el valor de K50 expresado en mmoles/l de células.

2.2.3.2. Cotransporte Na^+ - K^+ - Cl^- .

El eflujo de Na^+ regulado por el sistema del cotransporte, expresado en función de la concentración intracelular de Na^+ , sigue también una ecuación de Hanes en lo que respecta a los hematíes humanos¹⁸⁷, de forma que :

$$V_c = V_{c,max}/(1+K_cNa^+/[Na^+]_i)^3$$

donde $V_{c,max}$ es la tasa máxima de flujo de Na^+ sensible a bumetanida y K_cNa^+ representa la constante de disociación aparente para el Na^+ intracelular.

Los valores de $V_{c,max}$ y de K_cNa^+ fueron calculados por similar método al empleado en el caso de la bomba de Na^+ , esto es, mediante la aproximación de Hanes. En este caso el exponente 3 no significa necesariamente que el sistema de cotransporte disponga de tres lugares internos de unión para el Na^+ . La ecuación reseñada anteriormente sólo describe una función que se ajusta a la dependencia sigmoideal del cotransporte en relación con el Na^+ intracelular.

2.2.3.3. Contratransporte Na^+ - Li^+ .

El eflujo de Na^+ dependiente de contratransporte Na^+ - Li^+ , en relación con la concentración intracelular de Na^+ , sigue una función *Michaeliana* en los hematíes humanos⁴⁶. Dicha función puede representarse según la ecuación:

$$V_{cn} = V_{cn,max} / (1 + K_{cn}Na^+ / [Na^+]_i)$$

donde $V_{cn,max}$ es la tasa máxima de eflujo de Na^+ estimulado por Li^+ (o velocidad de contratransporte) y $K_{cn}Na^+$ representa la constante de disociación aparente para el Na^+ intracelular.

Sus valores fueron calculados de forma similar a los casos anteriores (aproximación de Hanes); esto es, mediante análisis de regresión lineal, de la pendiente y de la intersección con la abcisa de la curva obtenida.

2.2.3.4. Determinación de la velocidad máxima de contratransporte Na^+ - Li^+ (técnica de Canessa).

Además de la estimación de la velocidad máxima del contratransporte Na^+/Li^+ por la técnica de Garay como ya ha sido comentado, se estimó también la velocidad máxima de este transportador de acuerdo a la metodología propuesta por Canessa *et al*⁴⁸.

Con posterioridad a los lavados que ya han sido descritos en el apartado anterior, la masa eritrocitaria fue resuspendida hasta un valor hematócrito aproximado al 20% en una solución de sobrecarga de Li^+ cuya composición era CO_3Li_2 75 mM, glucosa 10 mM y MOPS (ácido morfolinpropanosulfónico) 75mM. Los eritrocitos fueron incubados en este medio 60 minutos a 37°C. Posteriormente se repitieron los cuatro lavados consecutivos con solución Cl_2Mg 115 mM según lo descrito anteriormente; se centrifugó la muestra tras cada lavado, y se aspiró el sobrenadante. Tras la sobrecarga de Li^+ y los cuatro lavados, los eritrocitos fueron centrifugados de nuevo 2 minutos a 6000 rpm a 4°C, aspirándose el sobrenadante y tomándose alícuota para determinación de Li^+ intracelular (espectrofotometría de absorción atómica, ver posteriormente) y hematócrito.

A continuación se tomaron dos alícuotas de 1 ml de masa celular así tratada. La primera fué resuspendida en 5 ml de una solución con NaCl (NaCl 150 mM, glucosa 10 mM, ouabaína 0.1 mM, TRIS-MOPS 10 mM, pH 7.4, osmolaridad 300 ± 5 mOsm/l) a 37°C durante 60 minutos. De modo simultáneo, la segunda alícuota de 1 ml se suspendió en 5 ml de una solución isosmolar sin NaCl (MgCl_2 75 mM, glucosa 10 mM, ouabaína 0.1mM, TRIS-MOPS 10 mM, sacarosa 85 mM, pH 7.4, osmolaridad 300 ± 5 mOsm/l) a la misma temperatura durante el mismo tiempo.

Posteriormente se volvió a centrifugar según lo expresado anteriormente, separándose el sobrenadante por aspiración. Se practicó medida de la concentración de Li^+ en el sobrenadante de ambas suspensiones eritrocitarias tras la centrifugación. Este parámetro fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica (espectrofotómetro Perkin-Elmer 460) ajustado a una longitud de onda de 670.8 nm. En los casos en que la hemólisis fue apreciable, se corrigió la concentración de Li^+ en el sobrenadante mediante la medición de la hemoglobina en el mismo, cálculo del Li^+ presente en sobrenadante secundario a hemólisis eritrocitaria y resta de la correspondiente concentración de Li^+ .

Se determinó la concentración máxima de contratransporte Na^+ - Li^+ como la diferencia en la concentración de los sobrenadantes obtenidos tras centrifugar ambas suspensiones. Se asume que a las concentraciones de Li^+ intracelular alcanzadas tras incubación con solución de sobrecarga, el sistema de transporte objeto de estudio obra bajo condiciones de saturación, obteniéndose un eflujo máximo de Li^+ constante en el tiempo en presencia de la concentración de Na^+ presente en el primer medio. Se corrigió tal diferencia para el valor hematócrito medido en el volumen celular centrifugado tras sobrecarga de Li^+ y se expresó como mmol/litro celular/hora, según lo descrito en la literatura.

2.3. Separación, identificación y cuantificación de los lípidos de la membrana del hematíe.

2.3.1. Extracción lipídica.

La extracción lipídica de la membrana del hematíe se realizó según el método de Rose y Oklander¹⁸⁸, cuya máxima efectividad ha sido recientemente revisada por Peuchant *et al*¹⁸⁹. A un paquete de 1 ml de hematíes, se le añaden 11 ml de alcohol

isopropílico y tras una vigorosa agitación, se deja en reposo (con agitación ocasional) durante una hora. Este solvente contiene butilhidroxitoluol (BHT) 0.45 mM como antioxidante. Tras el tiempo indicado se añaden 7 ml de cloroformo y se repite la misma operación anterior. Finalmente, se filtra la mezcla quedando en el filtro los restos de membranas ya delipidadas y en el filtrado la fracción orgánica con los componentes lipídicos extraídos. Esta preparación se evaporó mediante un sistema de presión reducida (Rotavapor) a la temperatura de 40°C, hasta obtener aproximadamente 1 ml de extracto lipídico; con el fin de mantener las muestras en condiciones de máxima estabilidad, respecto al posible oxidación de los lípidos (fundamentalmente insaturados), se mantuvieron en una atmósfera inerte de N₂ mediante gaseado y a la temperatura de -30°C.

2.3.2. Separación y cuantificación de las distintas clases de lípidos.

Para la identificación y cuantificación de los distintos componentes lipídicos de la membrana de los eritrocitos, se utilizó un sistema de cromatografía en capa fina denominado **Iatroscan** (Technical Marketing Associates, Mississauga, Ont), equipado con un detector de ionización de llama (H₂ flow rate 175 ml/min, air flow rate 1850 ml/min) con scanner (scanning 0.47 cm/seg) e integrador (sensitivity 10 mV, chart speed 0.42 cm).

Este sistema se caracteriza por el uso de unas varillas de cuarzo (Cromatorods (tipo S), recubiertas con silicagel formando una capa fina estable.

Las muestras (2 µl) se colocaron con la ayuda de una jeringa de precisión Hamilton, una por cada varilla. Se usó como fase móvil una mezcla de hexano/éter etílico/ácido fórmico (90:10:3, v/v/v), según técnica descrita por Tsuchiya y Sugay¹⁹⁰.

Una vez desarrollados los cromatorods, las fracciones lipídicas se identificaron mediante la señal eléctrica producida tras su ionización con una llama. Esta fuente de calor se controlaba con una mezcla de H₂ y aire. Tras el barrido con la llama de los cromatorods y con la ayuda del integrador, se obtuvieron los cromatogramas correspondientes. La cuantificación de los distintos lípidos se llevó a cabo mediante la comparación del área de cada pico con el área del pico producida por un patrón de concentración conocida.

2.3.3. Separación de fosfolípidos de membrana eritrocitaria y preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

Una porción de las muestras lipídicas obtenidas tras la extracción de la membrana de los eritrocitos se sometió a una cromatografía de capa fina en placa 20x20 cm (Kiesegel 60 F-254, Merck). La fase móvil fué una mezcla de cloroformo/-metanol/ácido acético/agua (80:12:12:3,v/v/v/v).

Tras el desarrollo de las placas los distintos fosfolípidos fueron visualizados con vapores de Iodo e identificados por comparación con la posición en la placa de patrones conocidos.

La banda correspondiente a cada fosfolípido se raspó con una espátula metálica y, tras empaquetar los polvos de silicagel en una minicolumna de vidrio, la elución se llevó a cabo añadiendo 5 ml de metilato sódico 0.2 N. Las muestras se sometieron a una temperatura de 110°C en baño de glicerina-agua durante 40 minutos en tubos de metilación. A continuación, se añadieron unas gotas de solución alcohólica de fenolftaleína como indicador de pH y la neutralización se efectuó con sulfúrico diluido al 20% con metanol anhidro, calentando de nuevo a 110°C durante 40 minutos.

Transcurrido este tiempo las muestras se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y los ésteres metílicos formados de cada fosfolípido se extrajeron con 2 ml de hexano, repitiendo la operación tres veces. Para facilitar la separación de fases, se agregaron a cada muestra 3 ml de solución saturada de NaCl, que junto al hexano da lugar a un sistema de fase simple. La muestra obtenida se concentra con N₂ hasta un volumen adecuado (aproximadamente 0.5 ml).

La muestra así obtenida se analizó con un cromatógrafo de gas (Hewlett-Packard, modelo 5890 serie II, equipado con detector de ionización de llama y empleando una columna capilar de sílice fundido Omegawax 320 (30 m x 0.332 mm i.d., 0.25 microm film). Se realizó el desarrollo a temperatura programada de 180 a 220°C. El flujo proporcional de helio fue de 2 ml/min, la presión de la cabeza de la columna era de 250 kPa, y el detector auxiliar de flujo proporcional era de 25 ml/min. Las áreas de cada pico se calcularon con un integrador-registrador Hewlett-Packard 3890 A. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos individuales fueron identificados en registros isotérmicos por comparación de sus tiempos de retención con los de muestras estándares (Larodan Fine Chemicals, Malmö, Suecia). En los casos de identificación dudosa se empleó la espectrometría de masas, con un sistema automático de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas, que consistía en un cromatógrafo de gas HP-5890, un espectrómetro de masas AEI MS 30 VG/70 y un sistema de datos VG11/250 (VG Analytical, Manchester, Reino Unido).

3. ANALISIS ESTADISTICO.

Hemos determinado los valores medios y la desviación estándar de las determinaciones séricas, colesterol, fosfolípidos mayoritarios y ácidos grasos de dichos fosfolípidos de la membrana, así como de los flujos basales, velocidad máxima y constante de afinidad de los diferentes transportadores de Na⁺ en hipertensos y controles. Las diferencias entre las medias se compararon según la t de Student para datos pareados en los casos en que la distribución previamente había sido definida como de distribución normal y mediante el test de Mann-Whitney en aquellos sin distribución normal. Las correlaciones se han realizado empleando el test de regresión lineal de Pearson. Para el estudio estadístico se utilizó el paquete RSIGMA.

Se consideraron estadísticamente significativas los valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS.

1. DATOS GENERALES DEL PLASMA.

Las características generales de la población sana y de hipertensos objetos del estudio quedan expresados en la **TABLA 1**. Estuvo constituida por 15 sujetos hipertensos y 13 controles. La distribución por sexos fue de 6 varones y 9 mujeres en los hipertensos y de 5 varones y 8 mujeres en los controles. En cuanto a la edad, ambos grupos estuvieron en la misma década de la vida, siendo la edad media del grupo de hipertensos de 39.1 ± 11.6 años y la de normotensos de 34.6 ± 5.7 años. La masa corporal se estimó mediante el índice de Quetelet (Kg/m^2) fue en el primer grupo de $24.8 \pm 2.5 \text{ Kg}/\text{m}^2$ y en el segundo grupo de $22.5 \pm 2.7 \text{ Kg}/\text{m}^2$, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos para estos dos parámetros.

Como característica de diferenciación entre ambas poblaciones, la PAS, PAD, y PAM fué significativamente mayor en hipertensos que en controles ($p < 0.001$) tal como se expresa en la **TABLA 1**.

El perfil bioquímico básico y los lípidos plasmáticos de ambos grupos queda reflejado en la **TABLA 2**. En cuanto a los valores de glucemia no existieron diferencias significativas entre ambos grupos siendo la media entre los hipertensos de $92.8 \pm 5.0 \text{ mg}/\text{dl}$ y de los controles $91.5 \pm 10.3 \text{ mg}/\text{dl}$. Con una significación de $p < 0.05$ se expresa la diferencia entre las medias de creatinina sérica en hipertensos ($0.9 \pm 0.2 \text{ mg}/\text{dl}$) y controles ($0.72 \pm 0.1 \text{ mg}/\text{dl}$), siendo en todos y cada uno de los pacientes estudiados en cualquier caso inferiores a $1,3 \text{ mg}/\text{dl}$, es decir, en el rango de normalidad de nuestro laboratorio.

Tampoco el colesterol total mostró diferencias significativas, si bien la media en los hipertensos (215.5 ± 56.9 mg/dl) se mostró superior que la de los controles de (200.8 ± 31.2 mg/dl), más próximo a las cifras desables para la población general.

Lo mismo ocurrió con el colesterol HDL, cuyas diferencias no alcanzaron la significación a pesar de que la media en los hipertensos era inferior (42.2 ± 15.7 mg/dl) a la de los normotensos (51.2 ± 15.5 mg/dl).

El colesterol vehiculizado en las LDL mostró la misma tendencia a la del colesterol total, es decir, la media en los hipertensos, de 151.5 ± 51.6 mg/dl fue claramente superior a la de los controles 130.0 ± 32.3 mg/dl, si bien no se alcanzó la significación estadística.

Si fueron significativas las diferencias ($p < 0.05$) entre la subfracción HDL₂ de ambas poblaciones, siendo de 6.54 ± 3.7 mg/dl la media para los hipertensos y de 10.09 ± 2.4 mg/dl para los controles. No fue diferente sin embargo la comparación entre las medias de la HDL₃ para ambos grupos tal y como queda recogido en la **TABLA 2.**

2. SODIO INTRAERITROCITARIO Y VALORES BASALES Y DE CINÉTICA DE TRANSPORTADORES IONICOS.

2.1. Resultados del estudio basal.

Como se expresa en la **TABLA 9**, los valores medios de Na^+ intracelular y los basales de los distintos transportadores transmembranarios fueron muy similares, encontrando sin embargo una clara tendencia a estar más elevado en hipertensos, a excepción del contratransporte basal estimado por la técnica de **Garay**.

Hicimos subgrupos en cada uno de los transportadores en hipertensos y controles según la actividad basal estuviera por encima o por debajo de 1 y 2 desviaciones estándar, pero el pequeño tamaño de la muestra impidió hacer comparaciones en estos subgrupos.

2.2. Resultados del estudio cinético.

En el estudio realizado con hematíes sobrecargados con Na^+ , no se objetivaron diferencias significativas entre el grupo control y el de hipertensos, en lo referente a la velocidad máxima (**V_{max}**) y constante de afinidad (**K_m**) de ATPasa, cotransporte y contratransporte; tampoco se observó diferencia cuando la actividad del transportador se expresaba como el cociente $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$.

Tan solo reflejó una diferencia significativa ($p < 0.05$) el contratransporte Na^+ - Li^+ cuantificado por técnica de Canessa, encontrándose como se halla descrito en la literatura una media superior en hipertensos (388.60 ± 185.0) que en controles (241.8 ± 67.8).

3. DATOS DE COMPOSICION LIPIDICA DE MEMBRANA.

3.1. Composición en colesterol y fosfolípidos.

Para el analisis cuantitativo e identificación del contenido en colesterol y fosfolípidos de la membrana, se analizaron las membranas de 8 hipertensos y 6 controles y se hallaron las medias en cuanto a su composición.

Las diferencias fueron muy significativas en la mayoría de los parámetros estudiados. En la **TABLA 3** puede observarse que el contenido en colesterol fue el doble en hipertensos (50.8 ± 3.4 %) que en controles (25.96 ± 1.6 %) alcanzándose amplia significación estadística ($p < 0.001$).

También se hallaron diferencias en las cantidades de fosfolípidos de la membrana, sobre todo en lo que se refiere a la esfingomielina (**SM**), que mostró una media de 15.04 ± 1.2 % en los hipertensos frente a 28.1 ± 0.66 % en los controles ($p < 0.001$). Con una $p < 0.01$ se expresó la diferencia entre las medias halladas de lisofosfatidilcolina (**IPC**), que fue de 1.12 ± 0.3 % en los hipertensos frente a 6.65 ± 1.02 en los controles. La fosfatidilserina (**PS**) reveló una diferencia significativa entre la media de los hipertensos (2.16 ± 0.4 %) versus la de los normotensos (8.44 ± 1.2 %). No se hallaron diferencias significativas entre las medias del contenido de la membrana en fosfatidiletanolamina (**PE**) ni en fosfatidilcolina (**PC**). Estas diferencias quedan esquematizadas en la **Figura 4**.

Como consecuencia de lo anterior, el índice colesterol/fosfolípido fue claramente superior en hipertensos (1.14 ± 0.2) que en controles (0.35 ± 0.03) ($p < 0.001$).

A continuación se calcularon los porcentajes relativos de fosfolípidos, es decir la cantidad real de cada fosfolípido frente al porcentaje total de los fosfolípidos de la membrana. A este respecto en la **TABLA 4** queda expresado que todos los fosfolípidos se distribuyeron de forma diferente en hipertensos y en controles. Con una $p < 0.05$ fue superior el contenido en **PC** en hipertensos (27.79 ± 2.1 %) que en controles (20.57 ± 1.5 %). Con una $p < 0.001$ se mostraron diferentes la **PE** (33.65 ± 0.6 % en hipertensos, y 21.00 ± 1.2 % en los controles) y la **IPC** (1.72 ± 0.8 en hipertensos y 8.85 ± 1.2 % en controles). Con una $p < 0.01$ se expresa la diferencia del contenido relativo en **SM** (31.34 ± 1.04 % en hipertensos y 37.97 ± 0.8 % en controles) y en **PS** (5.21 ± 0.6 en hipertensos y 11.22 ± 1.5 % en controles). Esta diferente distribución de los fosfolípidos puede observarse gráficamente en la **Figura 5**.

De forma global la cuantificación del contenido en colesterol y los tres fosfolípidos mayoritarios de la membrana eritrocitaria (**SM**, **PC** y **PE**) resultó valorada en un 92.79 ± 1.0 % en el caso de los hipertensos y del 79.54 ± 2.6 en los controles ($p < 0.01$).

3.2. Composición en ácidos grasos de fosfolípidos mayoritarios de membrana.

Para estimar el contenido en los distintos ácidos grasos (**AG**) en el global de la membrana, habiéndolos medido directamente de los 3 fosfolípidos mayoritarios estimamos mediante técnica ya descrita el porcentaje que cada fosfolípido constitutivo de la membrana representaba en hipertensos y controles (**TABLA 5**), siendo el sumatorio de **SM**, **PC**, y **PE** el 79.54 % en controles y el 92.79 % en hipertensos. El resto hasta el 100% estaba constituido por **PS**, **IPC** y otros fosfolípidos minoritarios, en los que no se midió el contenido en **AG** en este estudio.

Al objeto de conocer con una aproximación razonable el porcentaje de cada AG en el conjunto de los tres fosfolípidos mayoritarios, que a su vez representaba la práctica totalidad de los fosfolípidos de membrana, sobre todo en el caso de los HT, realizamos un cálculo indirecto en base a la siguiente formula:

$$\frac{\% \text{ AG en SM} \times \% \text{ SM} + \% \text{ AG en PE} \times \% \text{ de PE} + \% \text{ AG en PC} \times \% \text{ en PC}}{\Sigma (\text{SM}+\text{PC}+\text{PE})}$$

En la TABLA 5 se expresan la medias y desviaciones estándar de los AG de hipertensos frente a controles. La comparación de sus medias reveló diferencias significativas en algunos ácidos grasos. Este es el caso del ácido palmítico (16:0) un AG saturado cuya media fue superior en hipertensos (27.78±7.4 %) que en controles (20.65±2.3 %) (p<0.05). Asimismo resultó superior la media del alfa-linolénico (18:3 n-3) en hipertensos (2.03±0.9 %) que en controles (0.9±0.7 %) (p<0.05). Igualmente, con una p<0.05, fue superior la media del 20:1 (n-9) en hipertensos (0.6±0.3 %) frente a controles (0.29±0.1 %). La diferencia de medias encontrada en el ácido araquidónico (20:4 n-6) alcanzó también la significación estadística (p<0.01), hallándose la media de los hipertensos en 6.60±3.3 % y los controles en casi el doble (11.35±2.2%).

Tras el cálculo de los sumatorios de los AG saturados, monoinsaturados, diinsaturados y poliinsaturados, se estableció la comparación de las medias en ambos grupos, encontrándose diferentes (p<0.05) las medias de los poliinsaturados de los hipertensos (20.49±7.3 %) frente a los controles (26.42±2.6), siendo en este grupo superior como puede observarse en la TABLA 5, expresando la bondad de composición de sus membranas. Asimismo fue superior el índice Σ saturados/ Σ poliinsaturados en hipertensos (3.38±1.9) frente a controles (2.41±0.4), estando esta



diferencia próxima a la significación estadística. Aun cuando tampoco resultó significativa la diferencia, se encontró un índice linoleico/araquidónico muy superior en hipertensos (3.31 ± 2.7) que en controles (1.50 ± 0.4). Para valorar la actividad de la delta 5 desaturasa se calculó el índice $20:4(n-6)/20:3$. Este índice fue significativamente ($p < 0.01$) inferior en hipertensos (5.15 ± 3.6) que en controles (9.76 ± 2.9), traduciendo una menor actividad de la enzima en el grupo de pacientes.

3.3. Distribucion de ácidos grasos en la esfingomielina.

Tal y como queda reflejado en la TABLA 6, se encontró un aumento significativo ($p < 0.05$) del ácido palmítico (16:0) en hipertensos (17.70 ± 7.2 %) frente a controles (12.38 ± 3.5 %). Con la misma significación estadística se expresó la diferencia de medias encontradas en el ácido linoleico (18:2) (14.21 ± 9.0 % en hipertensos frente a 5.86 ± 2.8 % en controles) y el ácido aráquico (20:0) (1.20 ± 0.7 % en hipertensos frente a 0.55 ± 0.5). Con una $p < 0.001$ se diferenció la media del ácido araquidónico (20:4 *n*-6) en hipertensos (5.12 ± 3.9 %) versus controles (13.44 ± 5.5 %). Las diferencias encontradas en 22:5 *n*-6 en hipertensos (0.76 ± 0.5 %) y en controles (1.88 ± 1.1 %) tuvieron una significación de $p < 0.05$.

Asimismo el sumatorio de poliinsaturados fue claramente superior en controles (33.12 ± 8.8 %) que en hipertensos (22.56 ± 7.4 %) ($p < 0.05$). Lo contrario se observó en lo referente al sumatorio de los saturados (49.67 ± 8.7 % en hipertensos frente a 43.19 ± 10.0 % en controles) no alcanzando sin embargo estos datos la significación estadística.

3.4. Distribución de ácidos grasos en la fosfatidilcolina.

En la **TABLA 7** se expresan los valores medios de los **AG** constituyentes de este fosfolípido de membrana.

Como puede observarse fueron estadísticamente significativas las diferencias de medias del 20:3 (1.11 ± 0.9 % en hipertensos frente a 2.01 ± 0.6 % en controles) y del ácido araquidónico, 20:4 ($n=6$), (3.04 ± 2.5 % en hipertensos frente a 5.97 ± 2.4 % en controles) ambos con una $p < 0.05$.

No encontramos ninguna diferencia entre los grupos estudiados en los sumatorios e índices propuestos.

3.5. Distribución de ácidos grasos en la fosfatidiletanolamina.

Por lo que respecta a la **PE**, (**TABLA 8**), se mostraron diferentes y con significación estadística las medias de ácido linoleico en hipertensos ($5.65 \pm 2.4\%$) y en controles (9.96 ± 2.3 %) con una $p < 0.01$. Asimismo y como en los demás fosfolípidos estudiados, el araquidónico fue superior en controles (18.39 ± 5.6 %) que en hipertensos (11.96 ± 7.8 %) ($p < 0.05$). Con esta misma significación se expresó la diferencia de medias hallada en el 22:4 ($n=6$) con una media de 3.55 ± 2.6 % en hipertenso frente a 5.83 ± 1.5 % en controles. Al igual que se había visto en la **SM**, el ácido palmítico era superior en hipertensos (25.06 ± 11.1 %) que en controles (20.35 ± 5.3 %), sin embargo esta diferencia no alcanzó la significación estadística.

Tal y como se había observado en la SM, la PE reveló un sumatorio de saturados muy superior en hipertensos (42.90 ± 13.2 %) que en controles (32.63 ± 7.9 %) ($p < 0.05$); también fue estadísticamente superior la media de poliinsaturados en controles (35.41 ± 8.4 %) que en hipertensos (22.10 ± 10.9 %) ($p < 0.01$).

4. RELACION ENTRE LA COMPOSICION LIPIDICA DE MEMBRANA Y LA ACTIVIDAD DE LOS TRANSPORTADORES DE SODIO.

Mediante el paquete estadístico RSIGMA pudimos establecer todas y cada una de las correlaciones lineales entre la totalidad de los parametros de actividad basal y cinética de cada uno de los transportadores estudiados y los valores medios de el colesterol, fosfolípidos mayoritarios y **AG** de cada uno de los fosfolípidos (**SM**, **PC**, **PE**) y de los fosfolípidos totales así como los sumatorios e índices propuestos. De la enorme cantidad de cálculos efectuados, hemos seleccionado las siguientes correlaciones por su significación estadística ($p < 0.05$) y/o su relación con los objetivos de este trabajo:

En el grupo de **controles** la $[Na^+]$ intracelular se correlacionó de forma directa con el contenido global de PUFA en la membrana celular ($r = 0.62$) y de forma inversa con el sumatorio de **AG** saturados ($r = -0.79$) y con el índice saturados/poliinsaturados ($r = -0.79$). La actividad basal del Cotransporte y el contenido global de PUFA se correlacionaron con una r de -0.68 . Por su parte, el contratransporte basal, estimado según la técnica de **Garay** se correlacionó directa y claramente con el índice saturados/poliinsaturados de el conjunto de los fosfolípidos mayoritarios ($r = 0.78$). En cuanto a **AG** de fosfolípidos concretos, son de destacar las correlaciones del ácido araquidónico (20:4 *n*-6) de la **SM** con la V_{max} del Cotransporte ($r = 0.81$) y la del Contratransporte estimada por la técnica de **Canessa** ($r = -0.61$) y las del mismo **AG** pero contenido en la **PC** con la $[Na^+]$ intracelular ($r = 0.60$), la $V_{máx}$ de la ATPasa Na^+-K^+ ($r = 0.88$) y la V_{max} del Cotransporte ($r = 0.85$).

El el grupo de hipertensos estudiados no encontramos ninguna correlación estadísticamente significativa con los sumatorios de los **AG** en fosfolípidos totales,

pero si lo hicimos con el contenido específico en araquidónico (20:4 *n-6*), tanto global como en fosfolípidos concretos. Este **AG**, considerado el conjunto de los fosfolípidos mayoritarios, se correlacionó inversamente con la K_m del Cotransporte ($r = -0,78$), mientras el que se dispuso en la **SM** lo hizo directamente con la V_{max} del mismo transportador ($r = 0,81$) e inversamente con el contratransporte estimado por la técnica de **Canessa** ($r = -0,61$). Con el araquidónico de la **PC** encontramos correlaciones directas con la $[Na^+]_{intracelular}$ ($r = 0,60$) y con la V_{max} de la ATPasa Na^+-K^+ ($r = 0,88$) y del Cotransporte ($r = 0,85$).

TABLAS Y GRAFICOS.

TABLA 1
CARACTERISTICAS DE LA POBLACION ESTUDIADA

	HIPERTENSOS (n=15)	CONTROLES (n=13)	p-value
Edad (años)	39.13±11.6	34.66± 5.8	NS
Sexo (V/M)	6 / 9	5 / 8	NS
Masa corporal (Kg/m²)	24.86± 2.5	22.50± 2.7	p<0.05
PAS (mm Hg)	146.86±16.8	110.91±14.6	p<0.001
PAD (mm Hg)	90.86± 9.9	69.54±14.4	p<0.001
PAM (mm Hg)	111.40±13.6	86.18±12.1	p<0.001

PAS= Presión arterial sistólica. PAD= Presión arterial diastólica. PAM= Presión arterial media.
 Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

TABLA 2
PERFIL BIOQUIMICO BASICO Y DATOS LIPIDICOS
PLASMATICOS EN HIPERTENSOS Y CONTROLES.

	HIPERTENSOS (n=15)	CONTROLES (n=13)	p-value
Glucemia	92.80± 5.0	91.58±10.3	NS
Creatinina	0.90± 0.2	0.72± 0.1	p<0.05
Colesterol total	215.50±56.9	200.83±31.3	NS
LDL colesterol	151.57±51.6	130.66±32.2	NS
HDL ₁ colesterol	42.28±15.8	51.25±15.5	NS
HDL ₂	6.54± 3.7	10.09± 2.4	p<0.05
HDL ₃	36.01±15.6	41.12±14.2	NS
Triglicéridos	101.92±51.1	91.50±58.6	NS
Fosfolípidos	190.46±36.7	186.75±28.1	NS
Apo AI	148.46±33.1	152.08±26.7	NS
Apo B	120.92±35.8	100.00±27.9	NS

Los datos se expresan en mg/dl, como medias ± desviación estándar.

TABLA 3
COMPOSICION EN COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS DE
MEMBRANA DE HEMATIES DE HIPERTENSOS Y CONTROLES

	HIPERTENSOS (n=8)	CONTROLES (n=6)	p-value
Colesterol	50.87±3.4	25.96±1.6	p<0.001
Esfingomielina	15.04±1.2	28.10±0.6	p<0.001
Fosfatidilcolina	14.39±1.1	15.09±0.8	NS
Fostatidiletanolamina	15.96±1.3	15.45±0.5	NS
Fosfatidilserina	2.16±0.4	8.44±1.2	p<0.01
Lisofosfatidilcolina	1.12±0.3	6.65±1.0	p<0.01
Indice Colesterol/fosfolípido	1.14±0.2	0.35±0.03	p<0.001

Los valores se expresan en porcentajes, como medias ± desviación estándar.

TABLA 4
COMPOSICION EN FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANA
DE HEMATIES DE HIPERTENSOS Y CONTROLES

	HIPERTENSOS (n=8)	CONTROLES (n=6)	p-value
Esfingomielina	31.34±1.0	37.97±0.1	p<0.01
Fosfatidilcolina	27.79±2.2	20.57±1.5	p<0.05
Fostatidiletanolamina	33.65±0.6	21.00±1.2	p<0.001
Fosfatidilserina	5.21±0.6	11.22±1.5	p<0.01
Lisofosfatidilcolina	1.72±0.8	8.85±1.2	p<0.001
SUMATORIO SM + PC + PE	92.79±1.0	79.54±2.6	p<0.01

Los valores se expresan en porcentajes, como medias ± desviación estándar.
 SM= Esfingomielina. PC= Fosfatidilcolina. PS= fosfatidilserina.

TABLA 5
COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS EN FOSFOLIPIDOS MAYORITARIOS
(ESFINGOMIELINA, FOSFATIDILCOLINA Y FOSFATIDILETANOLAMINA)
DE MEMBRANA DE HEMATIE EN HIPERTENSOS Y CONTROLES

ACIDOS GRASOS	HIPERTENSOS (n=15)	CONTROLES (n=11)	p-value
14:0 (<i>Mirístico</i>)	1.24±0.8	0.96±0.3	NS
16:0 (<i>Palmítico</i>)	27.78±7.4	20.65±2.3	p<0.05
16:1 (<i>Palmitoleico</i>)	1.52±0.8	1.20±0.6	NS
16:4	1.38±0.8	1.19±0.6	NS
18:0 (<i>Estearico</i>)	18.36±4.2	21.60±4.4	NS
18:1 (n-9) (<i>Oleico</i>)	15.90±3.8	14.16±1.2	NS
18:1 (n-7)	1.13±0.8	0.87±0.4	NS
18:2 (<i>Linoleico</i>)	10.31±4.7	10.02±2.1	NS
18:3 (n-3) (<i>Alfalinolénico</i>)	2.07±1.2	0.90±0.7	p<0.05
20:0 (<i>Aráquico</i>)	0.67±0.2	0.64±0.4	NS
20:1 (n-9)	0.60±0.3	0.29±0.1	p<0.05
20:2 (n-6)	0.99±0.6	0.68±0.5	NS
20:3 (<i>Eicosatrienoico</i>)	1.61±0.8	1.25±0.4	NS
20:4 (n-6) (<i>Araquidónico</i>)	6.60±3.3	11.35±2.2	p<0.01
22:1 (n-11)	1.13±0.5	0.86±0.5	NS
22:4 (n-6) (<i>Docosatetraenoico</i>)	2.30±1.4	2.19±0.7	NS
22:5 (n-6)	1.08±0.6	1.21±0.6	NS
22:6 (n-6)	1.70±0.8	1.93±1.7	NS
22:5 (n-3)	2.64±1.2	3.22±0.9	NS
22:6 (n-3)	2.11±1.0	2.49±1.2	NS
SUMATORIOS			
SATURADOS	46.53±9.1	43.81±4.3	NS
MONOINSATURADOS	20.10±5.1	17.32±1.8	NS
DIINSATURADOS	10.91±8.4	11.25±2.9	NS
POLIINSATURADOS	20.49±7.3	26.41±2.6	p<0.05
INDICES			
SATURADOS/POLIINSATURADOS	3.38±1.9	2.41±0.4	NS
LINOLEICO/ARAQUIDONICO	3.31±2.7	1.50±0.4	NS
20:4 (n-6)/20:3	5.15±3.6	9.76±0.4	p<0.01

Los valores se expresan en porcentajes, como medias ± desviación estándar.

TABLA 6
DISTRIBUCION PORCENTUAL EN HIPERTENSOS Y CONTROLES DE ACIDOS
GRASOS EN LA ESFINGOMIELINA DE MEMBRANA DE HEMATIE.

ACIDOS GRASOS	HIPERTENSOS (n=15)	CONTROLES (n=11)	p-value
14:0 (<i>Mirístico</i>)	1.14± 0.7	1.13± 0.5	NS
16:0 (<i>Palmitico</i>)	17.70± 7.2	12.38± 3.5	p<0.05
16:1 (<i>Palmitoleico</i>)	1.55± 0.6	1.70± 0.9	NS
16:4	1.47± 1.3	1.18± 1.1	NS
18:0 (<i>Esteárico</i>)	26.20±12.9	30.31±11.2	NS
18:1 (n-9) (<i>Oleico</i>)	10.77± 3.9	9.66± 3.1	NS
18:1 (n-7)	0.66± 0.5	0.45± 0.5	NS
18:2 (<i>Linoleico</i>)	14.21± 9.0	5.86± 2.8	p<0.05
18:3 (n-3) (<i>Alfalinolénico</i>)	1.23± 1.2	1.19± 1.5	NS
20:0 (<i>Aráquico</i>)	1.20± 0.7	0.55± 0.5	p<0.05
20:1 (n-9)	0.51± 0.7	0.32± 0.3	NS
20:2 (n-6)	0.60± 0.9	0.67± 0.9	NS
20:3 (<i>Eicosatrienoico</i>)	1.48± 1.9	1.61± 1.7	NS
20:4 (n-6) (<i>Araquidónico</i>)	5.12± 3.9	13.44± 5.5	p<0.001
22:1 (n-11)	1.22± 1.2	0.64± 0.5	NS
22:4 (n-6) (<i>Docosatetraenoico</i>)	1.72± 1.3	2.35± 1.6	NS
22:5 (n-6)	0.76± 0.5	1.88± 1.1	p<0.05
22:6 (n-6)	3.08± 3.2	1.33± 1.3	NS
22:5 (n-3)	4.05± 2.8	4.84± 2.6	NS
22:6 (n-3)	4.13± 3.7	3.51± 2.5	NS
SUMATORIOS			
SATURADOS	49.67± 8.7	43.19±10.1	NS
MONOINSATURADOS	14.82± 4.9	12.68± 4.2	NS
DIINSATURADOS	10.42± 9.9	8.15± 6.8	NS
POLIINSATURADOS	25.56± 7.4	33.12± 8.8	p<0.05
INDICES			
SATURADOS/POLIINSATURADOS	1.96± 1.1	1.46± 0.6	NS
LINOLEICO/ARAQUIDONICO	0.98± 1.3	0.91± 1.6	NS

Los valores se expresan en porcentajes, como medias ± desviación estándar.

TABLA 7
DISTRIBUCION PORCENTUAL EN HIPERTENSOS Y CONTROLES DE ACIDOS
GRASOS EN LA FOSFATIDILCOLINA DE MEMBRANA DE HEMATIE.

ACIDOS GRASOS	HIPERTENSOS (n=15)	CONTROLES (n=11)	p-value
14:0 (<i>Mirístico</i>)	1.00± 0.8	0.67± 0.3	NS
16:0 (<i>Palmítico</i>)	36.13± 9.4	35.69± 4.5	NS
16:1 (<i>Palmitoleico</i>)	0.78± 0.7	0.39± 0.3	NS
16:4	0.90± 0.8	0.71± 0.3	NS
18:0 (<i>Esteárico</i>)	16.13± 3.6	15.51± 3.2	NS
18:1 (n-9) (<i>Oleico</i>)	14.49± 5.9	16.56± 1.8	NS
18:1 (n-7)	1.12± 0.8	1.29± 0.8	NS
18:2 (<i>Linoleico</i>)	14.54± 7.5	15.48± 7.7	NS
18:3 (n-3) (<i>Alfalinolénico</i>)	1.28± 1.5	0.51± 0.5	NS
20:0 (<i>Aráquico</i>)	0.34± 0.3	0.34± 0.3	NS
20:1 (n-9)	0.29± 0.3	0.25± 0.1	NS
20:2 (n-6)	0.29± 0.3	0.27± 0.1	NS
20:3 (<i>Eicosatrienoico</i>)	1.11± 0.9	2.01± 0.6	p<0.05
20:4 (n-6) (<i>Araquidónico</i>)	3.04± 2.5	5.97± 2.4	p<0.05
22:1 (n-11)	0.16± 0.1	0.23± 0.2	NS
22:4 (n-6) (<i>Docosatetraenoico</i>)	0.27± 0.2	0.21± 0.1	NS
22:5 (n-6)	0.38± 0.3	0.65± 0.9	NS
22:6 (n-6)	0.43± 0.5	0.42± 0.6	NS
22:5 (n-3)	2.36± 3.0	1.67± 1.3	NS
22:6 (n-3)	1.24± 2.4	0.77± 1.1	NS
SUMATORIOS			
SATURADOS	53.77±11.7	52.08± 4.9	NS
MONOINSATURADOS	17.69± 7.3	18.91± 1.2	NS
DIINSATURADOS	14.76± 7.6	15.70± 7.7	NS
POLIINSATURADOS	14.42± 9.3	13.96± 7.5	NS
INDICES			
SATURADOS/POLIINSATURADOS	5.72± 4.02	4.59± 1.6	NS
LINOLEICO/ARAQUIDONICO	4.18± 2.1	3.20± 1.7	NS

Los valores se expresan en porcentajes, como medias ± desviación estándar.

TABLA 8
DISTRIBUCION PORCENTUAL EN HIPERTENSOS Y CONTROLES DE ACIDOS
GRASOS EN LA FOSFATIDILETANOLAMINA EN LA MEMBRANA DE HEMATIE.

ACIDOS GRASOS	HIPERTENSOS (n=15)	CONTROLES (n=11)	p-value
14:0 (<i>Mirístico</i>)	1.28± 0.9	0.77± 0.5	NS
16:0 (<i>Palmítico</i>)	25.06±11.1	20.37± 5.3	NS
16:1 (<i>Palmitoleico</i>)	1.55± 1.2	0.93± 0.8	NS
16:4	1.10± 0.8	0.63± 0.4	NS
18:0 (<i>Estearico</i>)	13.66± 6.4	11.01± 2.3	NS
18:1 (n-9) (<i>Oleico</i>)	20.36± 6.4	21.06± 5.7	NS
18:1 (n-7)	0.89± 0.6	0.87± 0.4	NS
18:2 (<i>Linoleico</i>)	5.65± 2.4	9.96± 2.3	p<0.01
18:3 (n-3) (<i>Alfalinoléxico</i>)	0.72± 0.8	1.31± 1.5	NS
20:0 (<i>Aráquico</i>)	0.42± 0.3	0.48± 0.4	NS
20:1 (n-9)	0.52± 0.4	0.35± 0.2	NS
20:2 (n-6)	0.90± 1.3	1.18± 1.2	NS
20:3 (<i>Eicosatrienoico</i>)	1.38± 1.3	1.07± 0.6	NS
20:4 (n-6) (<i>Araquidónico</i>)	11.96± 7.8	18.39± 5.6	p<0.05
22:1 (n-11)	1.23± 0.9	0.96± 0.5	NS
22:4 (n-6) (<i>Docosatetraenoico</i>)	3.55± 2.6	5.83± 1.5	p<0.05
22:5 (n-6)	1.72± 1.3	1.54± 1.2	NS
22:6 (n-6)	0.35± 0.4	0.18± 0.1	NS
22:5 (n-3)	4.46± 3.7	3.78± 2.4	NS
22:6 (n-3)	0.23± 0.2	1.24± 2.0	NS
SUMATORIOS			
SATURADOS	42.90±13.2	32.63± 7.9	p<0.05
MONOINSATURADOS	25.78± 8.6	24.42± 5.7	NS
DIINSATURADOS	7.12± 3.4	8.43± 4.0	NS
POLIINSATURADOS	22.10±10.9	35.41± 8.4	p<0.01
INDICES			
SATURADOS/POLIINSATURADOS	1.86± 1.5	1.29± 1.1	NS
LINOLEICO/ARAQUIDONICO	0.42± 0.1	0.85± 1.0	NS

Los valores se expresan en porcentajes, como medias ± desviación estándar.

TABLA 9
VALORES DE SODIO INTRACELULAR Y ACTIVIDAD DE LOS DISTINTOS TRANSPORTADORES
EN HIPERTENSOS Y CONTROLES

	HIPERTENSOS (n=15)	CONTROLES (n=11)	p-value
Na⁺ intracelular (mmol/litro de célula)	6.82±1.3	6.52±1.02	NS
Difusión pasiva	18.60±8.2	17.05±4.5	NS
ATPasa (Basal)	1474.72±230.0	1421.75±172.3	NS
ATPasa (Km)	17.84±7.4	19.14±6.9	NS
ATPasa (V _{max})	7016.64±2949.7	8320.60±2683.2	NS
COTRANSPORTE	144.92±97.8	105.58±51.1	NS
Cotransporte (Km)	11.99±7.7	16.37±12.7	NS
Cotransporte (V _{max})	387.24±203.9	303.63±145.4	NS
CONTRATRANSPORTE	102.43±105.2	105.18±32.1	NS
Contratransporte (Km)	3.12±2.4	6.61±6.5	NS
Contratransporte (V _{max})	208.01±54.1	255.78±146.2	NS
CONTRATRANSPORTE (Canessa)	384.55±185.0	241.81±67.8	p<0.05

Los flujos basales y las V_{max} se expresan como medias ± desviación estándar en μmol/litro de célula/hora.
 Las Km se expresan como medias ± desviación estándar en μmol/litro de célula.

PRINCIPALES SISTEMAS DE TRANSPORTE DE SODIO

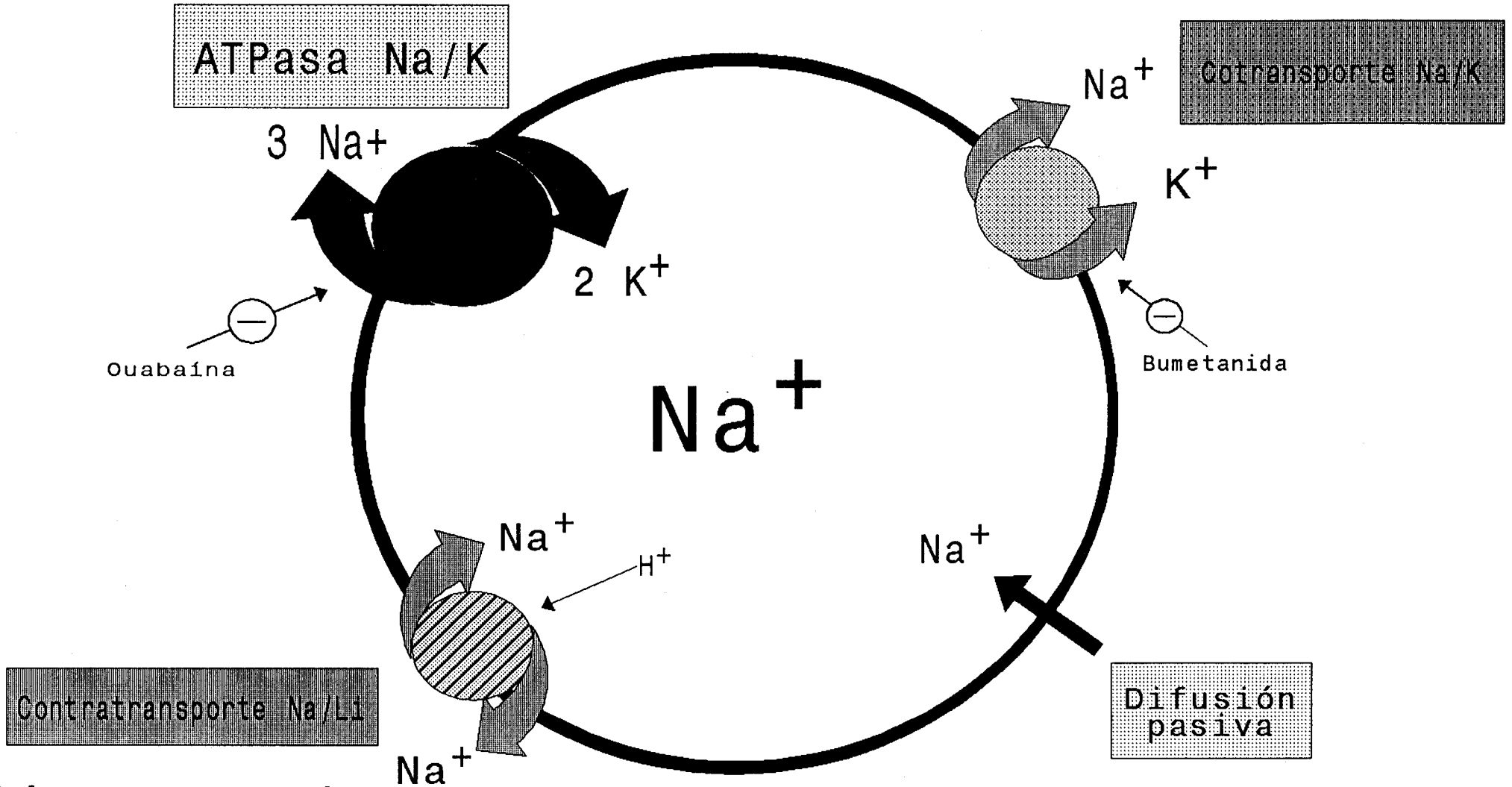
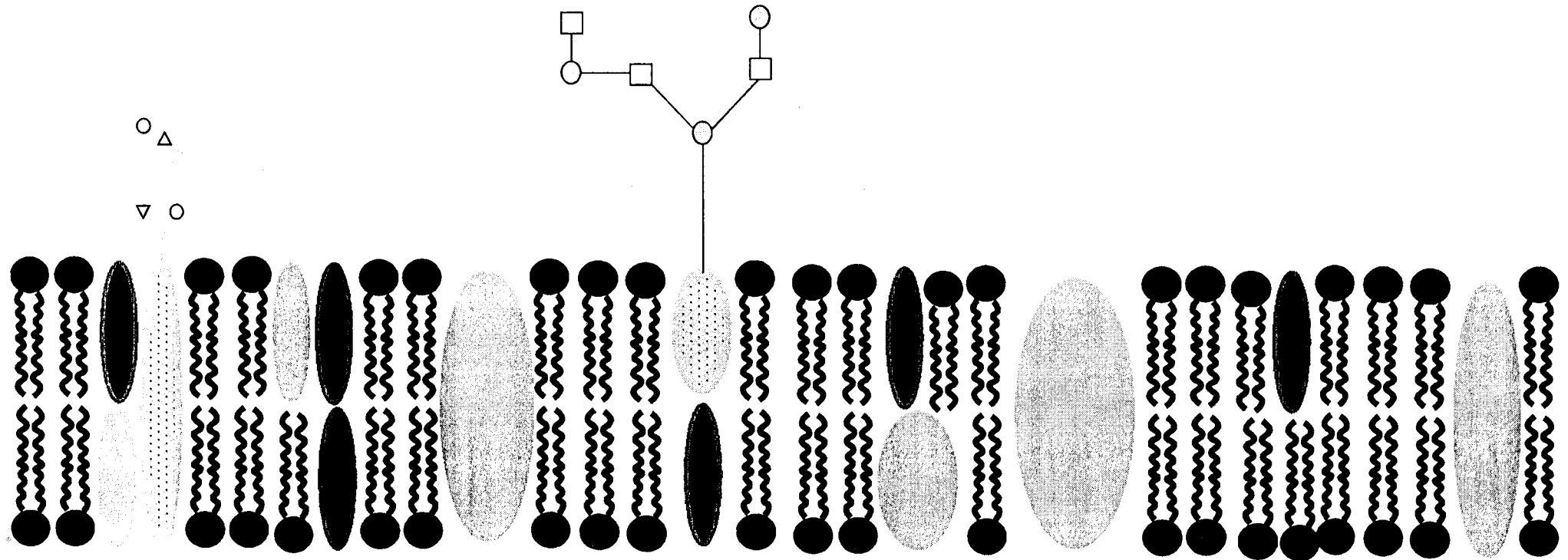






Figura 1



-  Fosfolípidos
-  Proteínas
-  Colesterol
-  Glucoproteínas

Modelo de membrana celular (Mosaico fluido)

Figura 2

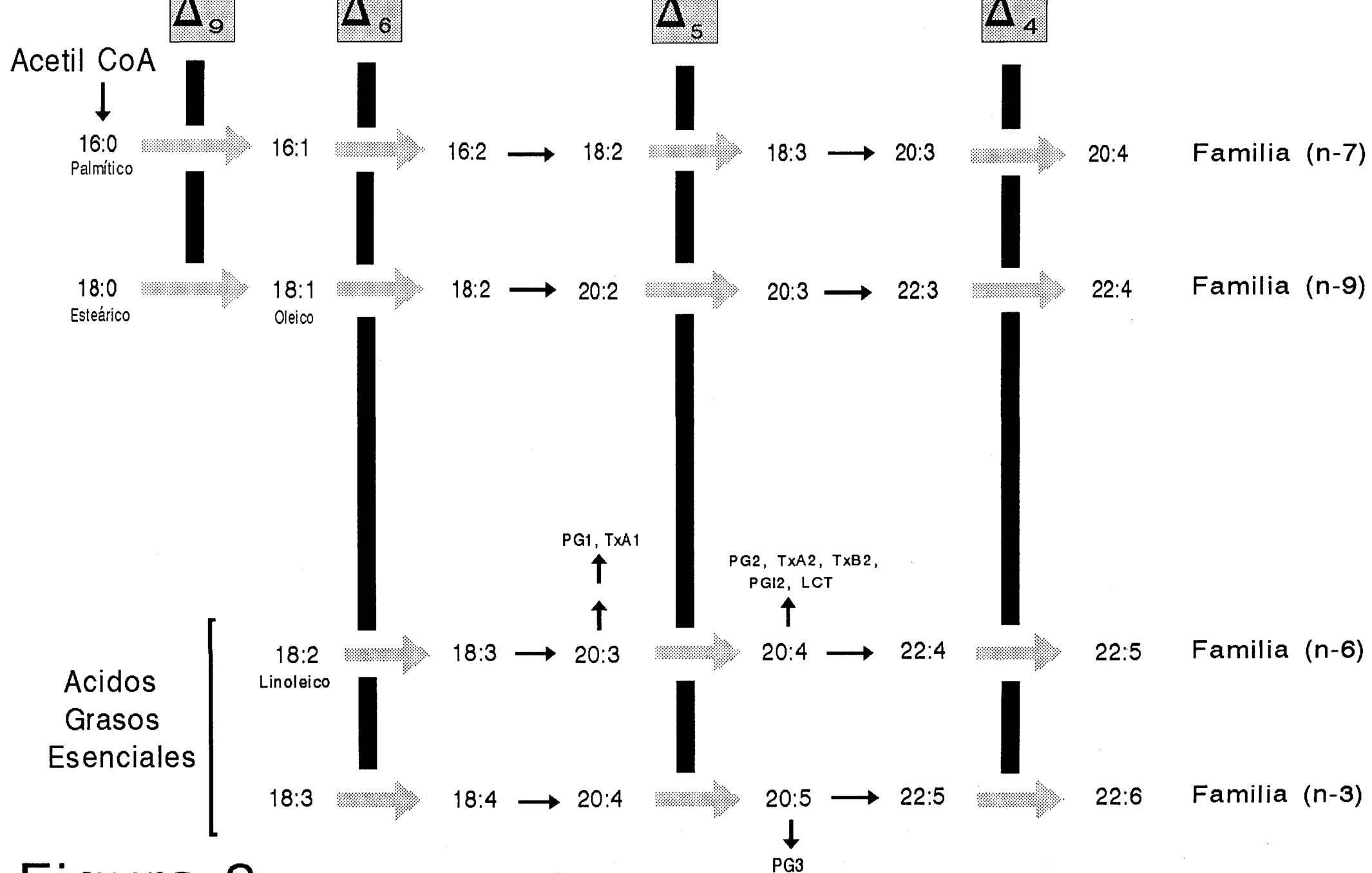
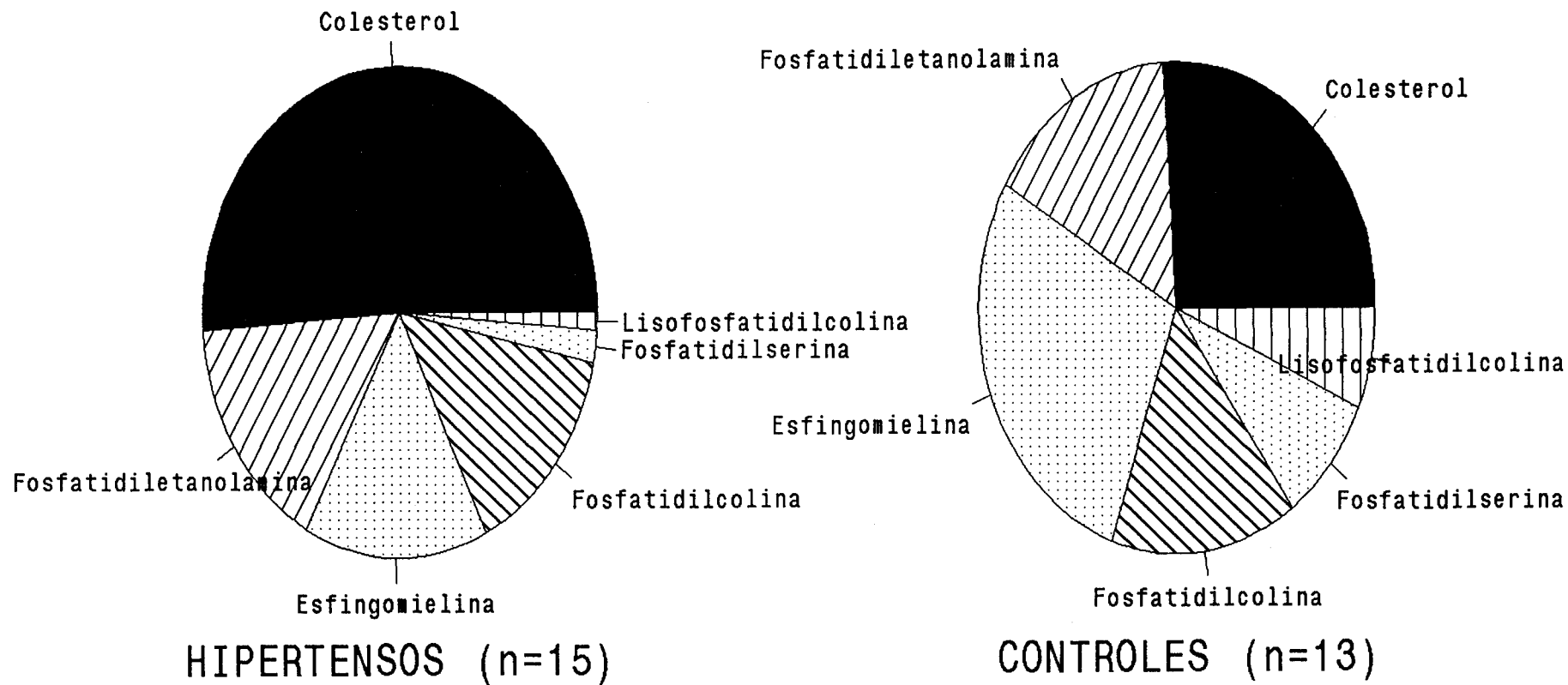


Figura 3



COMPOSICION DE MEMBRANA EN COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS

Figura 4

COMPOSICION DE MEMBRANA EN FOSFOLIPIDOS

HIPERTENSOS (n=15)

CONTROLES (n=13)

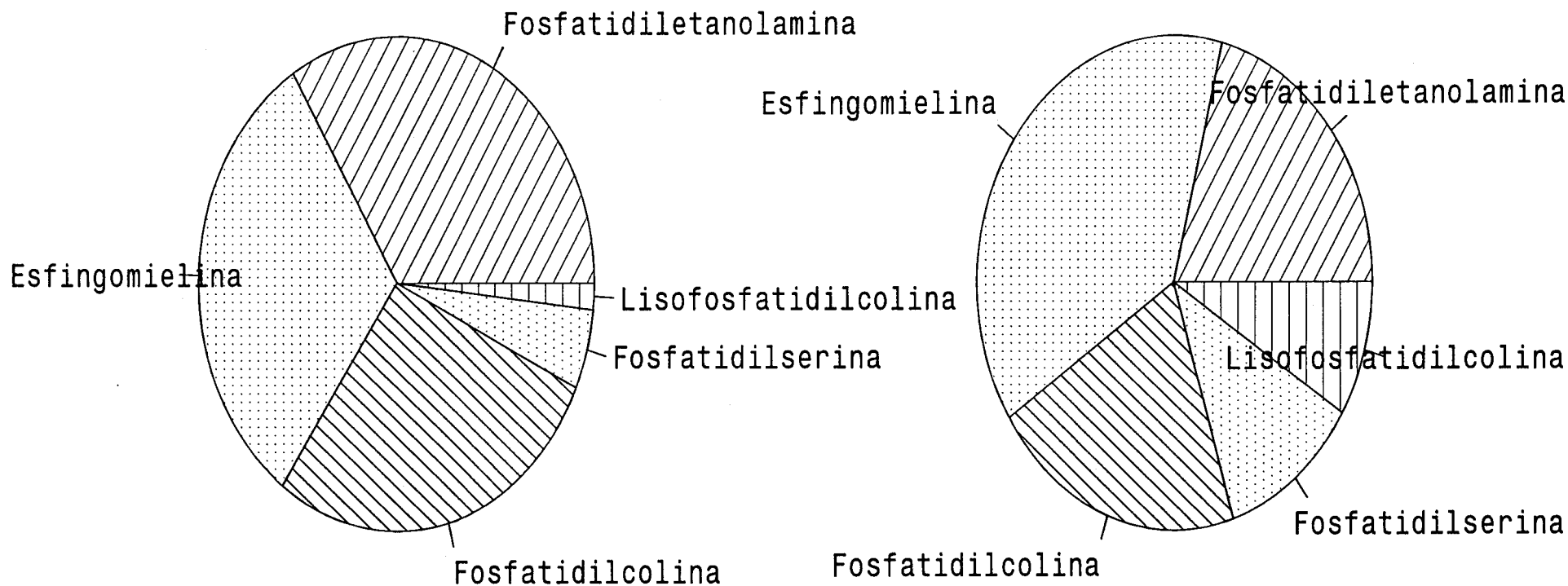


Figura 5

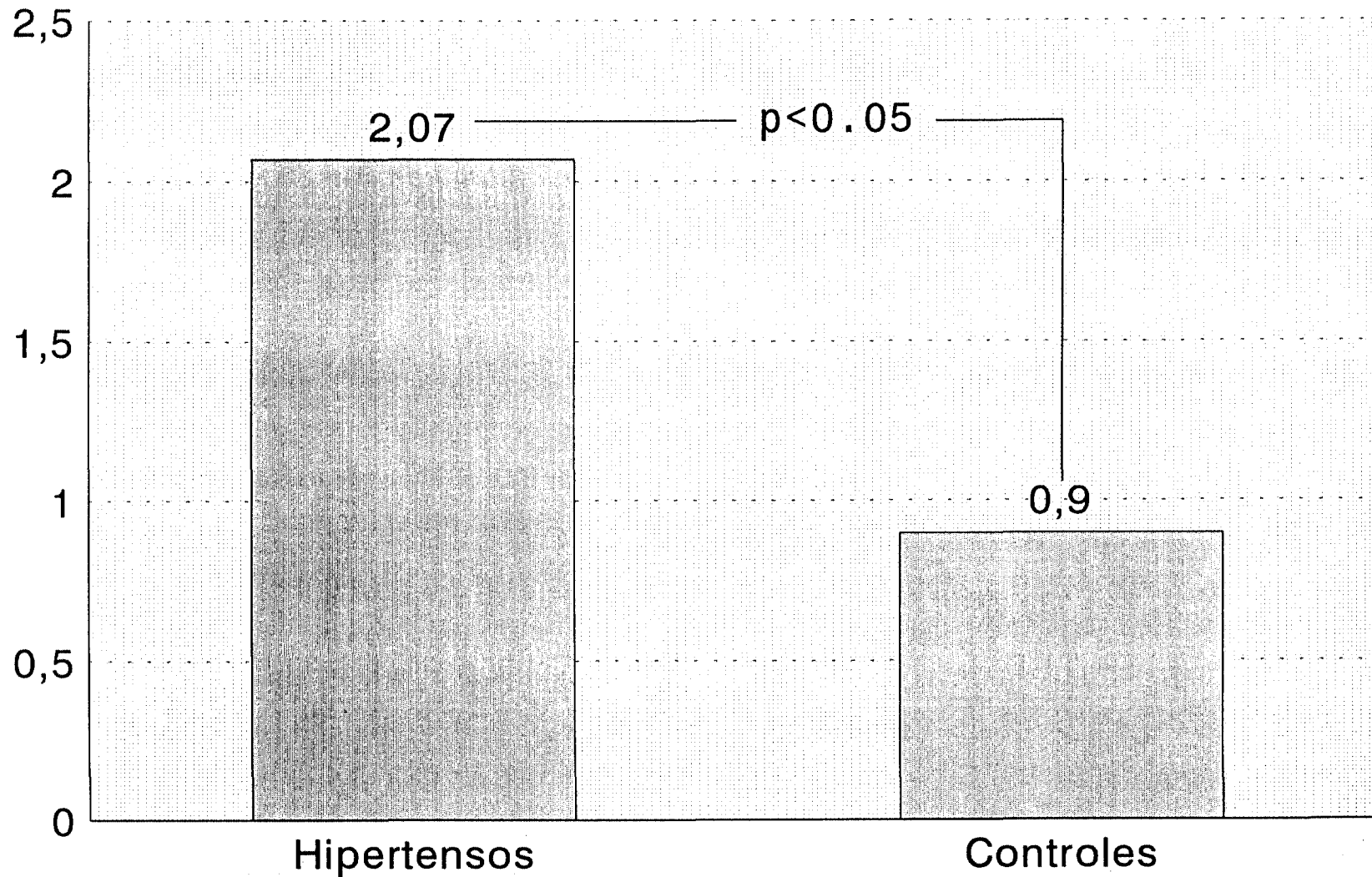


FIGURA 6

Algalinolénico de fosfolípidos totales en hipertensos y controles.

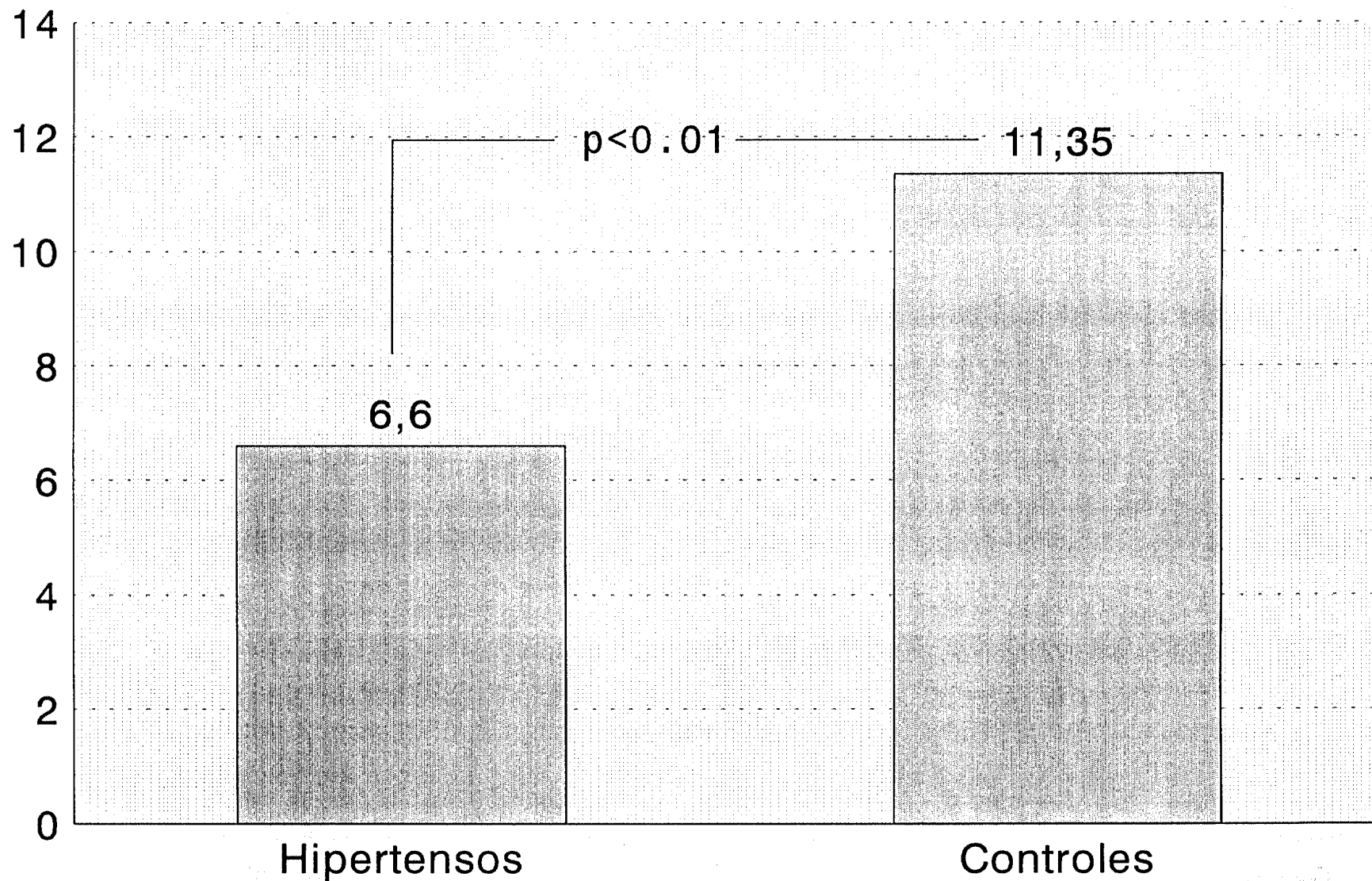


FIGURA 7

Araqidónico de fosfolípidos totales en hipertensos y controles.

Sumatorios de ácidos grasos de fosfolípidos totales en hipertensos y controles.

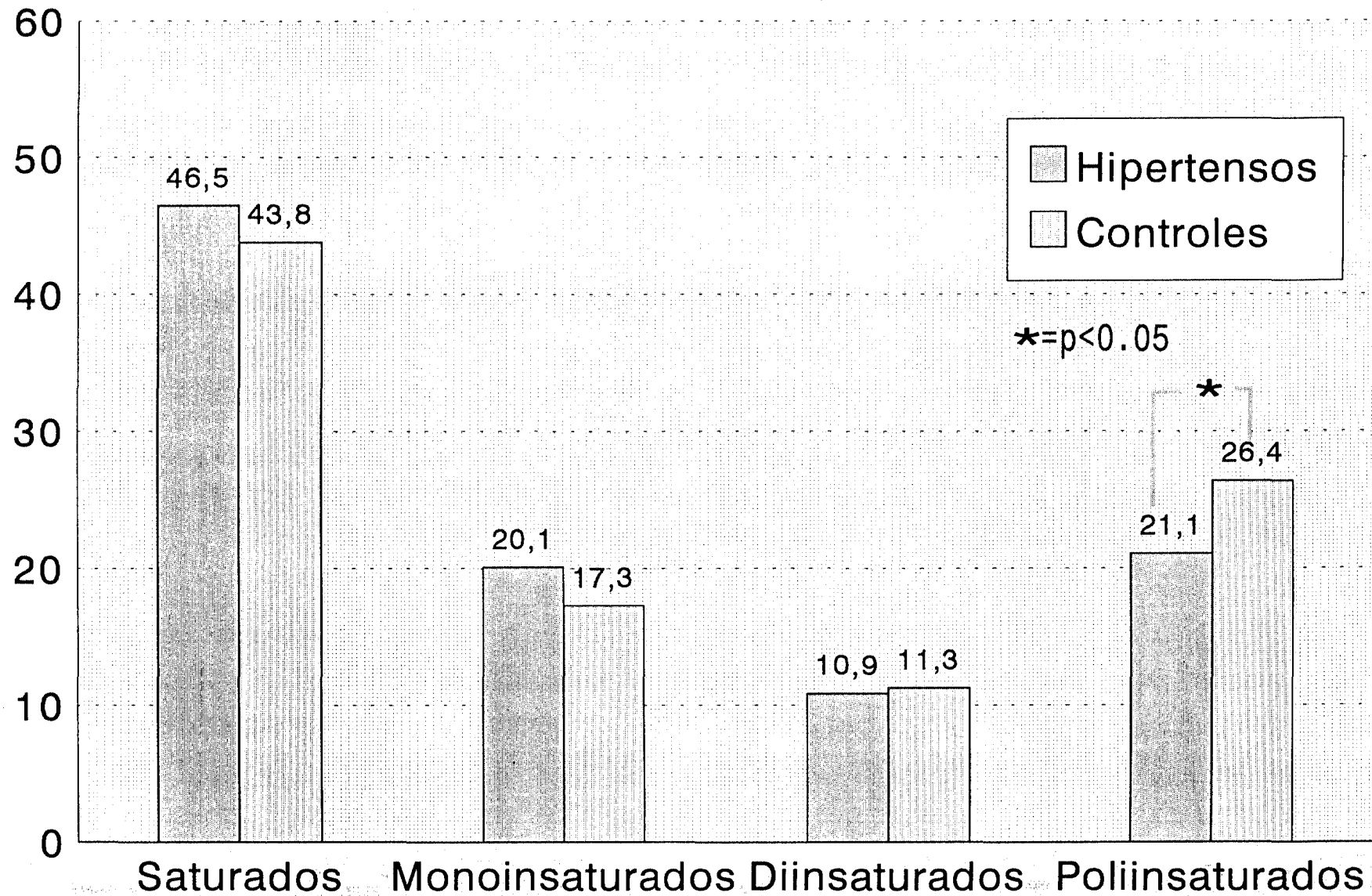


Figura 8

Índice de insaturación en hipertensos y controles.

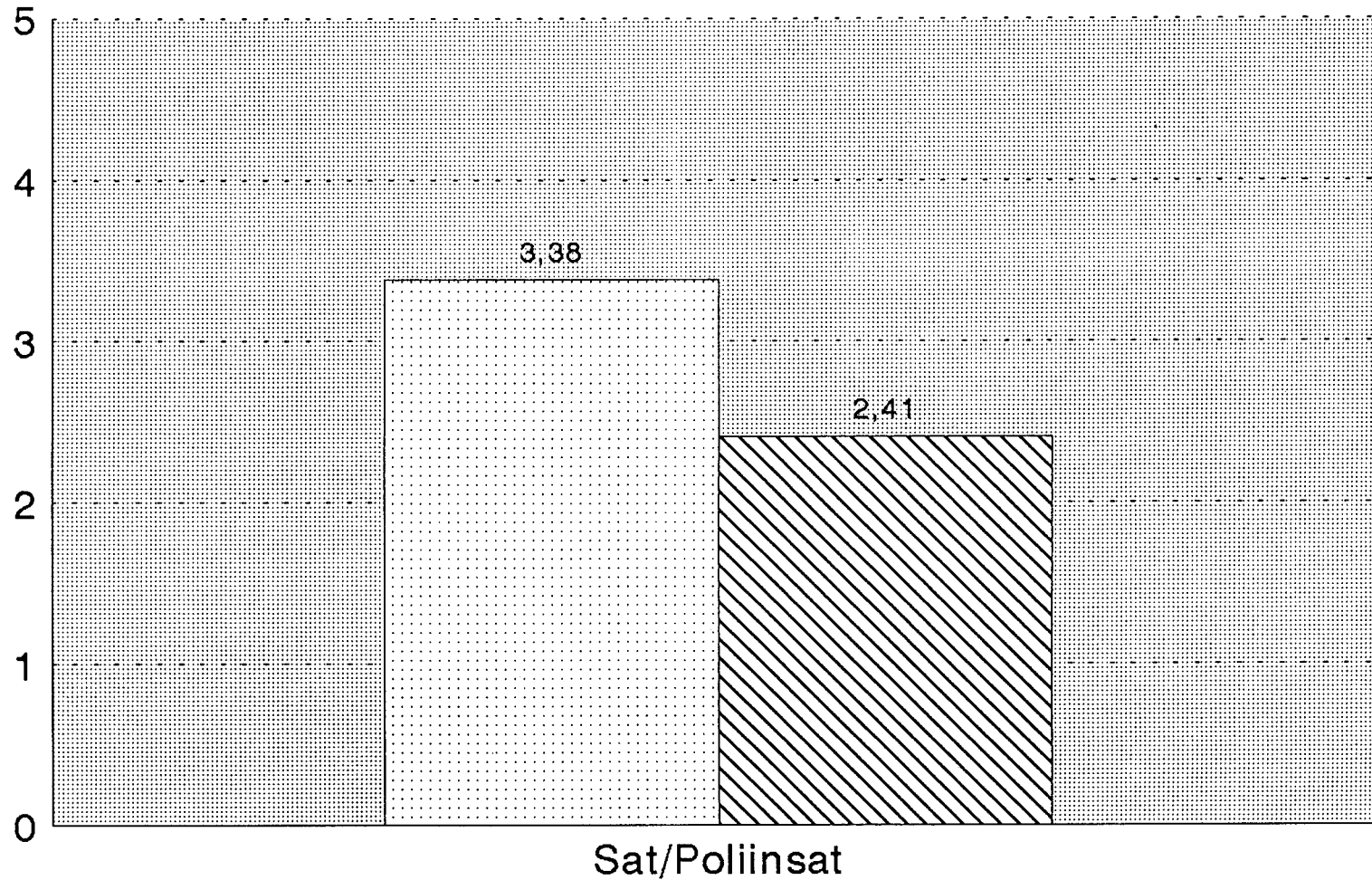


Figura 9

Indice 20:4 (n-6)/20:3

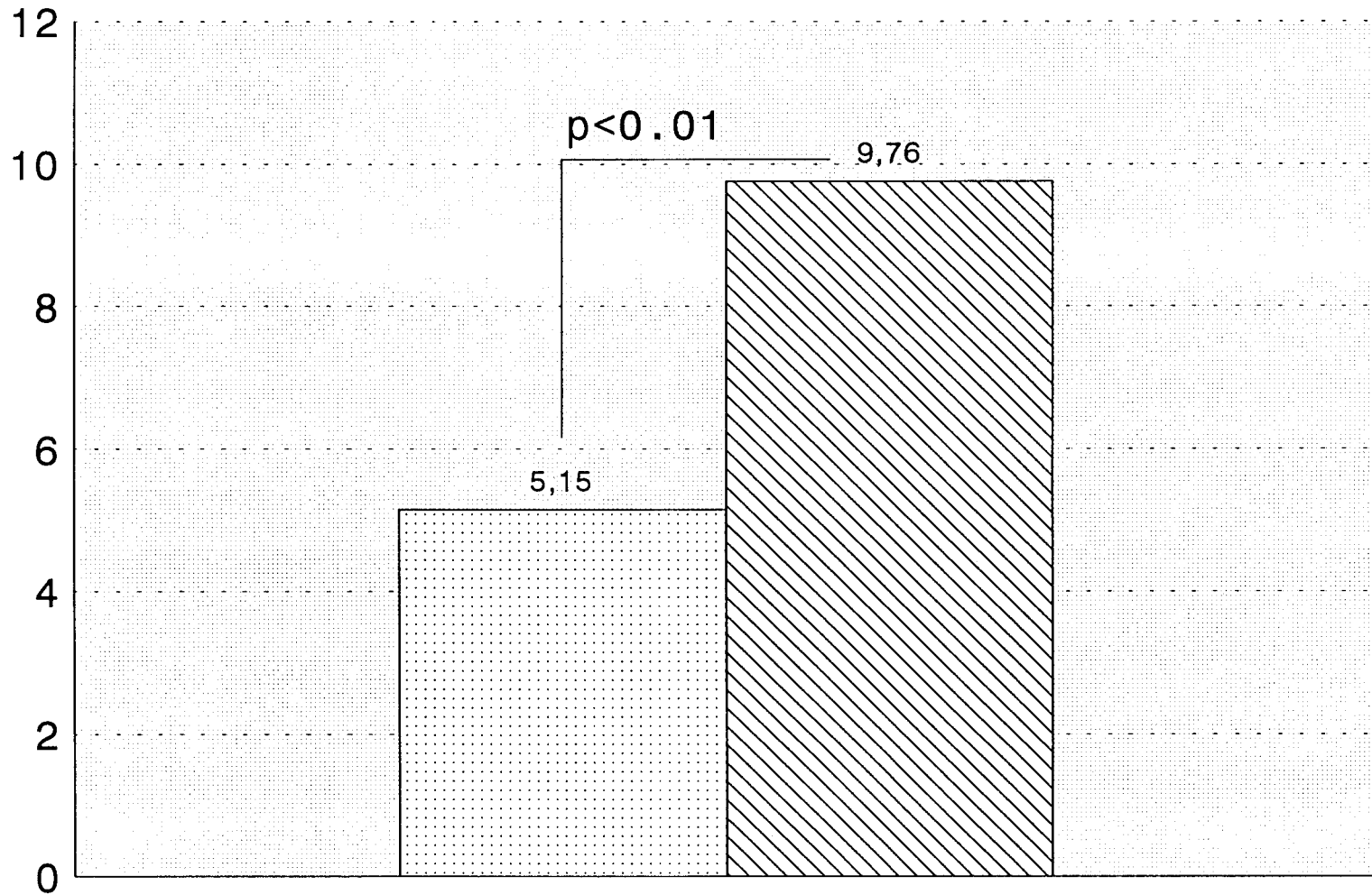


Figura 10

DISCUSSION.

1. TRANSPORTE IONICO TRANSMEMBRANA.

Desde hace dos décadas se viene acumulando literatura que sugiere que en el origen de la HTA intervienen distintas anomalías de la membrana celular que afectando al transporte iónico a su través inciden, finalmente, sobre el contenido intracelular de calcio libre. Esta concepción ha permitido que en nuestros días se pueda proponer que la HTA es, en definitiva, una enfermedad de membrana^{192,193}. Esta "membranopatía" tendría las siguientes características:

1. Asienta sobre anomalías físico-químicas, ultraestructurales y funcionales de la membrana plasmática celular.
2. Se expresa en células muy distintas del organismo, por lo que probablemente es de distribución universal.
3. Está presente en la HTA primaria, pero no en la secundaria;
4. Precede al desarrollo de la propia HTA y es, presumiblemente, hereditaria.

Existen distintos argumentos, como por ejemplo la selección de ratas genéticamente hipertensas cuya HTA depende de la sal, que sugieren que alguna anomalía heredada del transporte transmembrana de Na^+ podría estar implicada en la fisiopatología de la HTA. Esta hipótesis ha propiciado la búsqueda de esa anomalía genética en las células de los pacientes hipertensos. Por su accesibilidad la mayoría de los investigadores han utilizado las células sanguíneas para el estudio del transporte transmembrana. Ello se fundamenta en dos presupuestos: 1) Las anomalías de las células sanguíneas representan un fenómeno generalizado^{13,14,22,23} y, 2) la presencia de esas anomalías en las células diana del proceso

hipertensivo (pared vascular, túbulo renal, sistema nervioso, etc.) podría tener implicaciones tanto en la patogenia como en las consecuencias de la HTA^{23,24,50,68}.

Los primeros estudios sobre el transporte de Na⁺ en la HTA presentaban una limitación fundamental: los resultados eran excesivamente dispares cuando se contrastaban las observaciones efectuadas en distintos laboratorios. Por todo ello en los últimos años se han efectuado estudios metodológicamente más elaborados, controlados y reproducibles en los que se analiza cinéticamente la actividad de cada mecanismo de transporte de Na⁺ de la membrana celular^{194,195}. A partir de dichos estudios cinéticos se puede afirmar: 1) que no hay una anomalía única que caracterice a toda la población de pacientes hipertensos y 2) que dentro de la población hipertensa existen diversos subgrupos de pacientes con anomalías diferentes del transporte de Na⁺. Trabajos anteriores de nuestro grupo, con una muestra mas amplia, corroboran la hipótesis de **Canessa et al**³⁸ en el sentido de que la población hipertensa esencial es heterogénea con respecto a las anomalías de los sistemas de transporte y que no existe un defecto único que caracterice a todos los hipertensos^{196,197}.

En este estudio por el reducido número de enfermos incluidos no hemos podido hacer subgrupos según las distintas alteraciones de los transportadores que cada uno expresa. Al realizar el estudio basal y de cinética de transporte transmembranario de Na⁺ no hemos obtenido diferencias significativas entre el grupo control y el de hipertensos en todas las variables de transporte definidas de forma similar a lo que observan otros autores^{4,7,12,51,198}, a excepción del contratransporte estimado según la técnica de Canessa, cuya velocidad máxima fue superior en los hipertensos y esta diferencia fue estadísticamente significativa. Los niveles altos de la Vmax de este transportador no sólo han sido considerados como un marcador genético de hipertensión, sino que se han correlacionado con un incremento de la hipertrofia ventricular izquierda y el riesgo vascular en general.

2. COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA CELULAR.

La composición lipídica de las membranas celulares juega un papel importante en la determinación de su fluidez y funcionalidad metabólica. Estudios previos han mostrado alteraciones en el contenido de colesterol y fosfolípidos, así como en las distintas clases de fosfolípidos en distintas situaciones patológicas^{110,111,131,132,134}.

La cantidad relativa de colesterol y fosfolípidos que encontramos en la membrana eritrocitaria, su relación molar colesterol/fosfolípidos (C/F), así como los distintos ácidos grasos (AG) constituyentes de los fosfolípidos, aportan a la membrana celular mayor o menor fluidez. La fluidez de la membrana es un importante atributo que influencia la actividad de distintos receptores de membrana y características de permeabilidad celular^{199,200}. El cociente C/F es el mayor condicionante del grado de fluidez de la membrana, disminuyendo ésta en caso de un aumento del contenido en colesterol o de una disminución en el contenido relativo de fosfolípidos. Estas alteraciones han sido propuestas como "responsables" de las alteraciones metabólicas de distintas situaciones patológicas. **Dominizak et al**^{178,179} piensan que la mayor micro-viscosidad (menor fluidez) del *bilayer* lipídico de células de hipertensos es un defecto generalizado y que es responsable de las anomalías múltiples de los sistemas de transporte a través de membrana que han sido descritos en la HTA genética¹⁹³. En este estudio los autores comparan la microviscosidad de la membrana, la composición en fosfolípidos y el metabolismo en un cultivo de células de músculo vascular de arteria mesentérica de ratas espontáneamente hipertensas, y lo comparan con ratas normotensas. Sus resultados son concordantes con otros trabajos que utilizan eritrocitos de ratas y humanos^{174,176,201,202}. Todos estos autores coinciden en señalar que estas anomalías del *bilayer* lipídico de hipertensos son potenciales agentes que afectan la

funcionalidad de distintas proteínas transportadoras que al verse alteradas modifican la permeabilidad de la célula a Na^+ , K^+ y $\text{Ca}^{++179,182}$.

2.1. Alteraciones en la relación molar colesterol/fosfolípido.

A este respecto han sido muchas las aportaciones hechas por distintos autores que objetivan cambios en la relación molar C/F así como en la proporción de fosfolípidos de la membrana de células de pacientes hipertensos^{202,203}.

Nuestros datos se orientan en este mismo sentido, ya que en la membrana del grupo de hipertensos analizados en este trabajo se encuentra casi el doble de colesterol que en el grupo control, hablando ésto a favor de que la fluidez de su membrana se encuentre disminuida (mayor microviscosidad).

Estos datos son coincidentes con los de **Bialeck y Tulenko**¹⁸⁴, ya que éstos observaron una relación directa entre la microviscosidad de la membrana y su permeabilidad; al aumentar la incorporación de colesterol en la membrana de la musculatura lisa vascular, se incrementa la microviscosidad y se incrementa asimismo la permeabilidad al Ca^{++} , hecho de gran importancia en células de pacientes hipertensos. Este aumento de la viscosidad de la membrana secundario a un aumento del contenido en colesterol de la membrana celular ha sido comunicado por muchos otros autores^{204,205}.

Owen et al⁹⁷ estudian la fluidez de la membrana del eritrocito de 30 pacientes con distintas enfermedades hepáticas por técnicas de polarización de fluorescencia, y la comparan con la encontrada en 25 sujetos normales. Esta fluidez fue significativamente menor en el grupo de enfermos, y fue atribuida a un aumento en la relación C/F. Esta relación C/F en enfermos es de 1.05 ± 0.14 en su trabajo y de 1.14 ± 0.2 en nuestro grupo de hipertensos. Ellos encuentran un

coeficiente de correlación de 0.89 al comparar esta variable con la fluidez de membrana. Valores similares en la relación C/F han encontrado Corrocher y Pagnan en un estudio sobre mujeres hipertensas²⁰⁶.

La diferencia en la ratio C/F de la membrana eritrocitaria de hipertensos frente a controles, ha sido también recientemente descrita por Anceschi *et al*²⁰⁷. Estos autores basan su estudio en 3 grupos de mujeres, uno de ellos incluye a pacientes con HTA inducida por el embarazo, otro de embarazadas no hipertensas y el último de normotensas no embarazadas. La relación molar C/F en estos tres grupos decrece en ese mismo orden, es decir, el de mayor índice es el formado por las embarazadas hipertensas, y el de menor, el de las no embarazadas no hipertensas. Concluyen estos autores que el aumento en la relación C/F en membrana eritrocitaria, representa un factor implicado en la fisiopatología y constituye un posible marcador de enfermedad. Esto coincide en su totalidad con nuestros datos; aunque en nuestros dos grupos (hipertensos y normotensos), las diferencias son más marcadas cuantitativamente.

La proporción C/F y la distribución de los distintos fosfolípidos encontrados en los distintos estudios son en casi todos los casos coincidentes en la bibliografía revisada^{122,125,153,165,203}; sin embargo no se encuentra una uniformidad en los valores absolutos expresados con respecto a la *ratio* C/F por los distintos autores; creemos que esto pueda deberse a que la valoración de estas cantidades algunos autores la refieran a miligramos de proteína, y otros^{126,200}, como nosotros lo expresen como mol de colesterol/mol de fosfolípido; esta última forma de expresión nos parece más acertada ya que la cantidad de proteína de membrana puede diferir sustancialmente de una membrana a otra, sobre todo cuando se trata de comparar membranas de controles sanos frente a membranas de hipertensos, cuyos receptores de membrana (proteínas), pueden estar alterados tanto cualitativa como cuantitativamente^{31,33,38,59}.

El colesterol no esterificado del eritrocito es fácilmente intercambiable con el colesterol no esterificado del plasma y más específicamente con el colesterol de las LDL plasmáticas²⁰⁸. Varios autores encuentran una correlación positiva entre el contenido en colesterol de la membrana eritrocitaria y el colesterol-LDL, pudiendo explicarse que altos niveles de colesterol-LDL puedan inducir a un incremento en el contenido eritrocitario de colesterol^{209,210}. Esta relación entre colesterol-LDL y colesterol de membrana, ha sido también encontrada por nosotros a pesar de no alcanzar significación estadística. Como ya ha sido comentado, la relación molar C/F fue significativamente mayor en hipertensos que en controles, y el LDL-colesterol medio en plasma superó en 20 mg% la de los controles.

2.2. Diferencias en los fosfolípidos de la membrana eritrocitaria.

La fluidez de las membranas celulares también está influenciada por la composición en los distintos fosfolípidos. A este respecto *Owen et al*⁹⁷ encontraron un aumento en la relación PC/SM en los eritrocitos de pacientes hepatópatas; estos cambios habían sido ya observados por otros investigadores en otros grupos de enfermos, encontrando una relación entre el aumento de esta ratio y la alteración de la fluidez de membrana²¹⁴.

Nuestros hipertensos muestran una ratio PC/SM de 0.95 frente a 0.53 de los controles. Estas diferencias también han sido encontradas recientemente por *Anceschi et al* en su grupo de hipertensas embarazadas²⁰⁷. Esta disminución del contenido en esfingomielina (SM) en la membrana eritrocitaria de hipertensos frente a controles, no es sin embargo evidenciada por el grupo estudiado por *Proença et al*²¹¹, que encontraron tan sólo una disminución del sumatorio total de fosfolípidos de la membrana. *Caimi et al* sin embargo no encuentran ninguna diferencia en hipertensos frente a controles en ninguno de los parámetros por ellos

estudiados: contenido total de Ca^{++} en eritrocito, Ca^{++} citosólico libre, relación C/F y cuantificación de fosfolípidos individuales²¹².

Por tanto, aunque la mayoría de autores encuentran diferencias muy apreciables en la composición de membrana de eritrocito en distintas patologías incluida la HTA, hacen falta más estudios que acrediten a éstos cambios como los posibles responsables del origen fisiopatológico de ésta y otras enfermedades.

2.3. Composición en ácidos grasos de la membrana eritrocitaria.

Las alteraciones en la función celular también pueden estar producidas por distintas modificaciones en la longitud y grado de insaturación de los AG constituyentes de los fosfolípidos¹³⁸.

Tal y como ya hemos comentado, un aumento en el contenido en AG insaturados de los fosfolípidos de la membrana afecta a las propiedades de distintos receptores celulares que en ella se encuentran, así como en la síntesis de distintas prostaglandinas. En este sentido una reciente publicación de MAZEAUD *et al*²¹³ muestra las alteraciones bioquímicas y funcionales de las plaquetas de pacientes hipertensos con hipercolesterolemia. Estos autores encuentran en las plaquetas de este grupo de pacientes marcados cambios en la composición en AG de sus membranas, en el contenido en AMPc y en la respuesta a agentes proagregantes.

Por otra parte, Rillaerts *et al*²¹⁴, a partir de modificaciones en la composición de la grasa dietética de un grupo de pacientes diabéticos insulino dependientes (sustitución isocalórica de AG poliinsaturados *n-6* por *n-3*), objetivan cambios tanto en los niveles lipídicos e índice aterogénico en suero como en parámetros homeostáticos, demostrándose que las alteraciones lipídicas se acompañan de cambios en la viscosidad sanguínea, aún en presencia de control metabólico estable en estos

pacientes. Para la valoración del buen cumplimiento de la dieta se midieron los valores de *n-3* y *n-6* en la membrana del eritrocito, confirmándose un significativo aumento del contenido en **AG** de la serie *n-3*. Este método de evaluación del cumplimiento de la dieta es recomendada también por otros autores²¹⁵.

Bordoni et al²¹⁶ sometieron a un grupo de ratas a dieta hiperlipemiante y, aún no encontrando diferencias en la composición de grasa total en la membrana del eritrocito de dichos animales, objetivan cambios en el contenido de **AG** polinsaturados de la serie *n-6*, que aumentan, y de la serie *n-3*, que disminuyen, y que son acompañados de un aumento de la fluidez de membrana medida por polarización de fluorescencia y de una disminución de la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en el grupo de ratas sometido a cambio dietético con respecto al control. Otros autores²¹⁷ objetivan como últimos responsables de los cambios en la actividad de los receptores de membrana a los **AG**, no habiendo encontrado cambios en la relación molar C/F. El grupo citado estudia en 11 voluntarios sanos la relación entre el receptor de insulina en los eritrocitos, el número de receptores por célula, y la afinidad de estos a la insulina, y por otro lado los **AG** de los fosfolípidos y la relación molar C/F. Encuentran una correlación negativa entre el receptor específico y la proporción de **AG** esenciales *n-6* (fundamentalmente linoleico y araquidónico). El número de receptores por célula y la afinidad de este no se correlacionó con la composición en **AG** de los fosfolípidos. No encontraron sin embargo correlación alguna entre las características del receptor de insulina y la relación molar C/F, sugiriendo estos autores que el patrón de **AG** de los fosfolípidos de membrana puede modificar las propiedades del receptor de insulina.

En este mismo terreno **Hessel et al**¹⁵⁶ estudiaron el efecto de una dieta rica en aceite de pescado durante 12 semanas sobre la deformabilidad y agregación artificial de la membrana del hematíe de 20 sujetos sanos. La deformabilidad eritrocitaria presentó una correlación lineal positiva con la dosis tomada de este aceite rico en **AG** poliinsaturados (**PUFA**) de la serie *n-3*, mientras que la agrega-

ción artificial de los hematíes disminuyó igualmente de forma dosis-dependiente, lo que sugiere que incluso pequeños cambios en el perfil de los PUFA de la membrana eritrocitaria causan modificaciones importantes en las propiedades viscoelásticas y agregación artificial de los hematíes.

Las diferencias encontradas en nuestro estudio en cuanto a los AG de los fosfolípidos de nuestros pacientes hipertensos versus controles corren también en este sentido. La cantidad total de ácido palmítico (16:0) fue significativamente superior en membranas de hipertensos. La proporción de 18:3(*n*-3) y 20:1(*n*-9) fue igualmente superior de forma estadísticamente significativa en los hipertensos con respecto a los controles. Pero la diferencia más llamativa la encontramos en el porcentaje total de ácido araquidónico (20:4(*n*-6), ácido graso esencial). En nuestro estudio, la membrana eritrocitaria de los hipertensos tiene casi la mitad de ácido araquidónico que el control sano, siendo esta diferencia muy significativa.

Los sumatorios totales de AG saturados expresaron una clara tendencia a ser superiores en los hipertensos, pero estas diferencias no alcanzaron significación estadística. El sumatorio de poliinsaturados expresó sin embargo lo contrario, siendo significativamente superior en los controles que en los pacientes hipertensos. El índice saturados/poliinsaturados fue por ello casi el doble en hipertensos, y esta diferencia alcanzó significación estadística. Estas diferencias se refieren a los AG de fosfolípidos totales, siendo la variación más marcada si estudiamos fosfolípido a fosfolípido (ver TABLAS 6, 7 y 8).

Todos estos resultados están en consonancia no sólo con otros autores^{127,149,151,156,178,193} sino también con la hipótesis de trabajo que nos llevó a realizar el presente estudio; es decir, la composición en AG de los fosfolípidos de la membrana de los pacientes hipertensos esenciales muestran menor "calidad o bondad" que los controles con los que se compararon, ya que el índice de insaturación es menor y mayor el de saturación. Estas diferencias probablemente condicionan, como ya

DISCUSION

ha sido comentado, mayor rigidez a la membrana celular de los hipertensos, alejándola quizás de una buena funcionalidad global. No deben ser en principio estas diferencias atribuibles a un diferente patrón dietético de las dos poblaciones estudiadas, ya que en el caso de los hipertensos se trata de pacientes sin antecedentes previos de otra patología, en primera consulta y sin anterior tratamiento, pudiendo por tanto quedar incluidos dentro de la población general de donde también fueron seleccionados los controles. Mas bien habría que buscar una explicación metabólica a estas diferencias.

Tal y como se expresa en la **figura 3**, las distintas familias de ácidos poliénicos (**AG**), que difieren entre sí por el número de átomos de carbono y la existencia o no de dobles enlaces en su molécula, reciben el nombre de su **AG** precursor, concretamente: palmitoleico (*n-7*), oleico(*n-9*), linoleico (*n-6*) y linolénico (*n-3*). Estos **AG** constituyentes de los fosfolípidos son sintetizados en el retículo endoplásmico de la célula a partir de ácido linoleico y linolénico (**AG** esenciales), que mediante reacciones alternadas de desaturación y elongación dan lugar a **AG** mas insaturados y de mayor peso molecular.

De las dos reacciones microsómicas, desaturación y elongación, son las de desaturación las que desempeñan un papel primordial en la biosíntesis de ácidos poliénicos y están catalizadas por las *delta-9*, *delta-6* y *delta-5* desaturasas (se postula la existencia de una *delta-4* desaturasa). Todas estas enzimas utilizan como sustrato un **AG** unido a Coenzima A. En general las desaturasas muestran mayor afinidad por el sustrato más insaturado, compitiendo los distintos sustratos por la enzima en el siguiente orden de preferencia: familia del linolénico >linoleico >oleico >palmitoleico. La *delta-6* desaturasa ocupa una posición clave en la ruta biosintética de los **PUFA**, ya que regula la síntesis del ácido araquidónico (20:4 *n-6*), catalizando la conversión de ácido linoleico (18:2 *n-6*) a linolénico (18:3 *n-6*); así una modificación en su actividad repercutiría rápidamente en la biosíntesis de todos los **AG** superiores. Esta *delta-6* desaturasa está influenciada por distintos factores alimenta-

rios, hormonales y ambientales. La falta de AG esenciales aumenta su actividad, y los poliinsaturados de cadena larga la disminuyen por un proceso de retroinhibición.

La *delta*-5 desaturasa cumple también una función importante en la desaturación de AG de 20 átomos de carbono, principalmente en la conversión del 8-11-14 eicosatrienoico (20:3 *n*-6) al 5-8-11-14 eicosatetraenoico (20:4 *n*-6, araquidónico), ambos precursores de los prostanoïdes. La actividad de esta enzima está también influenciada por el ambiente hormonal y dietético, y sometida a mecanismos competitivos y de inducción.

Por todo esto las desaturasas desempeñan un papel fundamental para la provisión de estructuras adecuadas para determinar las propiedades fisicoquímicas convenientes de las membranas celulares y servir además de precursores de sustancias específicas de gran actividad biológica. Por ello en situaciones patológicas como diabetes mellitus, ingestión crónica de alcohol, o resección intestinal, las alteraciones de la composición química de las membranas podrían deberse a cambios en la actividad de estas desaturasas, lo que daría lugar a variaciones de las propiedades fisicoquímicas de dichas membranas y como consecuencia, en las características de los distintos sistemas de transporte.

Tal como se expresa en la TABLA 5 las diferencias observadas en los AG de nuestro grupo de hipertensos frente al de controles son explicables por alteraciones a nivel su metabolismo microsomal. Nuestro grupo de hipertensos esenciales muestran una extraordinaria disminución de ácido araquidónico (20:4 *n*-6) en sus fosfolípidos frente a los controles (6.60 vs 11.35 %) adquiriendo esta diferencia alta significación ($p < 0.01$).

A este dato se le suma un gran aumento en la proporción de 18:3 *n*-3 (*alfalinolénico*), su precursor en la cadena biosintética, en el grupo de hipertensos

frente a controles ($p < 0.05$), dato que iría a favor de un fallo en la actividad o función de la *delta* 5 desaturasa (**figura 3**).

Recientemente **Borkman et al**²¹⁸ proponen el estudio del cociente 20:4 (*n*-6)/-20:3 para la valoración de la actividad y funcionalidad de la *delta* 5 desaturasa y el de 20:3/18:2 para la valoración de la *delta* 6. Según estos autores nuestro grupo de hipertensos con una *ratio* 20:4/20:3 de 5.15 ± 3.6 mostrarían una actividad deprimida de la *delta* 5, ya que los controles muestran una relación de 9.76 ± 2.9 , como puede observarse en la **TABLA 5**.

En cuanto a la cantidad de **AG** saturados, sobre todo de 16:0 (*ácido palmítico*), está también notablemente aumentada siendo el sumatorio de poliinsaturados muy inferior en hipertensos que en controles ($p < 0.05$), por lo que la relación saturados/poliinsaturados se muestra muy superior, casi del doble ($p < 0.05$).

Todo esto no hace más que evidenciar que desde el nivel microsomal, las membranas de los hipertensos parecen ser de "peor calidad": mayor cantidad de colesterol, mayor cantidad de fosfolípidos rigidificantes (**PC**) y menor de fosfolípidos fluidificantes (**SM**); mayor cantidad de saturados y menor de insaturados, sobre todo de araquidónico, de vital importancia en la formación de prostaglandinas (**PG**) y tromboxanos.

3. INFLUENCIA DE LOS CAMBIOS EN LA COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA EN LA ACTIVIDAD DE LOS TRANSPORTADORES DE SODIO.

¿Que explicación podría darse a la hora de implicar a estos ácidos grasos como responsables de las modificaciones tensionales en nuestros pacientes? En 1994, el grupo de **McLeod y Haagerty**²¹⁹ mediante modificación de la dieta a un grupo de ratas observan por primera vez que el aumento en la ingesta de PUFA de la serie *n*-3, modifican la respuesta arterial femoral de contracción-relajación frente al estímulo adrenérgico. Estos resultados podrían explicar los efectos de disminución de la presión arterial que se adjudica al aceite de pescado y en general a los PUFA.

Las PG provienen del ácido araquidónico, cuyo precursor es el ácido linoleico; es bien sabido que la eliminación de éste de la dieta produce un déficit en la síntesis de PG. Estas sustancias se sintetizan en la mayoría de las células y no se almacenan, por lo que tienen una vida media extremadamente corta, entre 30 segundos y 5 minutos, ejerciendo su función como autacoides, en el mismo territorio donde han sido sintetizadas. Intervienen en el control del tono vascular, en la excreción renal de Na⁺ y agua, en la secreción de varias hormonas y son capaces de modular la actividad nerviosa²²⁰. Además tienen efectos sobre la coagulación y los mecanismos de aterogénesis, es decir, su funcionalidad es básica en la homeostasis del sistema cardiovascular²²¹.

El ácido araquidónico se incorpora a los fosfolípidos de la membrana celular y a estructuras subcelulares, y a partir de este depósito es liberados por la acción de dos fosfolipasas la A2 y la C. Sin embargo solo un pequeño porcentaje del ácido

es posteriormente oxigenado, siendo la mayor parte del mismo reincorporado a la membrana celular. Por acción de la ciclooxigenasa, el oxígeno se incorpora al araquidónico para dar lugar a los endoperóxidos cíclicos (PGG₂ y PGH₂). Esta no es, sin embargo, la única vía de oxigenación. En el riñón y en otros tejidos, existen otras dos vías metabólicas: la de la lipooxigenasa que da lugar a la síntesis de los leucotrienos, y la del citocromo P-450 monooxigenasa que produce los ácidos eicosatetraenoicos. Como podemos observar en la figura, a partir de la formación de los endoperóxidos y tras la actuación de distintas enzimas, se originan la prostaciclina (PGI₂), el tromboxano A₂ (TXA₂), la PGE₂ y la PGD₂ de la que deriva la PGD₂₀. Todas las PG son metabolizadas por una deshidrogenasa muy abundante en los pulmones, Excepto la PGI₂, que escapa a esta vía metabólica y que puede aparecer en la circulación general²²².

En cuanto a sus efectos, ya desde su descubrimiento por **Von Euler**²²³, se conoce su capacidad para relajar el músculo liso vascular. Sin embargo, las diferentes PG pueden ejercer acciones diferentes dependiendo de la dosis empleada, el territorio donde estén e incluso de la especie animal. La prostaciclina, es el metabolito del ácido araquidónico que tiene más claros efectos vasculares a nivel sistémico; su administración a dosis farmacológicas en animales de experimentación produce un descenso de la presión arterial debido a una disminución en la resistencia vascular acompañado de un aumento en el gasto cardiaco²²⁴. La PGI₂ se produce en las células endoteliales, en donde también se sintetiza el ERDF (factor relajante derivado del endotelio), hoy identificado como óxido nítrico (NO). La reciente demostración de que el receptor que media la secreción de prostaciclina también produce la secreción de NO abre nuevas e interesantes vías para comprender mejor la regulación del tono vascular y sus alteraciones²²⁵.

Otras PG como la PGE₂ y la PGD₂ son vasodilatadoras, específicamente la PGE₂ es más potente que la prostaciclina en aumentar el flujo sanguíneo renal. Por el contrario el TXA₂ y la PGF₂₀ son vasoconstrictoras. Un mecanismo por el que

DISCUSION



las PG vasodilatadoras (I2, E2 y D2) pueden intervenir en el control del tono vascular es a través de su función moduladora de la respuesta presora a los vasoconstrictores. Así se ha demostrado en sujetos normotensos, que la inhibición de la síntesis de PG con indometacina potencia los efectos presores de la angiotensina II²²⁶.

Independientemente de su efecto sobre el flujo sanguíneo, las PG tienen un efecto tubular renal directo. La PGE₂ inhibe la reabsorción tubular de Na⁺ en la *pars recta* del tubo contorneado proximal²²⁷, en el segmento grueso del asa ascendente de Henle²²⁸ y en el túbulo colector²²⁹.

A pesar de todo esto existen dudas acerca de la participación efectiva de las PG en el control de la presión arterial, por tratarse de autacoides implicados en acciones locales, y mayores dificultades se presentan al estudiar su relación etiológica o fisiopatológica con la HTA. Sin embargo en relación a la hipertensión existen dos hechos ampliamente aceptados: el aumento de las resistencias vasculares periféricas y las alteraciones de la función renal, y en ambos podrían participar ciertos tipos de PG.

Otro camino por el que se ha estudiado el papel patogénico de las PG en la HTA es a través de la manipulación de las dietas administradas a animales de experimentación o a pacientes hipertensos. La administración de ácido linoleico que aumenta los metabolitos del ácido araquidónico disminuye la presión arterial en ratas hipertensas, mientras que el consumo de una dieta rica en PUFA ha demostrado ser beneficiosa en pacientes con altos niveles de presión arterial. Los mecanismos por los que esta dieta pueden tener resultados favorables son múltiples y no dependen solo de la síntesis aumentada de ciertas prostaglandinas sino también de cambios en la actividad enzimática y en la afinidad de los receptores de las células diana²³⁰.

Independientemente de la explicación que pueda darse o atribuirse a todos estos hechos, como ya hemos comentado, la membrana de nuestros hipertensos es claramente deficiente en araquidónico con respecto a la membrana de los normotensos con los que se los compara, por lo que puede especularse que la síntesis de PG en nuestros pacientes pudiera estar disminuida.

Se ha sugerido por distintos autores que la alteración de la composición lipídica de la membrana es un factor subyacente común de varias de las alteraciones de los sistemas de transporte catiónico descritas en eritrocitos de pacientes con HTA esencial y sus descendientes^{178,193,231}. A su vez, estas alteraciones pueden depender de cambios en la estructura de las proteínas membranaarias²³² o estar en relación con cambios fisicoquímicos secundarios a modificaciones en la composición lipídica de la membrana²³³.

Como ya ha sido ampliamente comentado, la composición lipídica de la membrana determina su fluidez, y a través de esta puede condicionarse la actividad de los mecanismos de transporte iónico¹⁶¹. Aunque el contenido en colesterol y fosfolípidos de la membrana puede estar genéticamente determinado, también puede estar influenciado por la composición lipídica de la sangre. Así se ha comprobado que en condiciones de hipercolesterolemia aumenta el contenido de colesterol de la membrana eritrocitaria, con lo que aumenta el cociente colesterol/fosfolípidos de la misma, y secundariamente también disminuye su fluidez^{126,234}.

Asimismo las alteraciones de la proporción de AG saturados e insaturados en las cadenas aciloterminales de los fosfolípidos de membrana influyen en la fluidez de esta, en el transporte de cationes, y en la actividad de la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa^{162,235}.

En este sentido, y ya que nuestros hipertensos mostraban un intenso déficit de ácido araquidónico (ácido graso esencial) en sus membranas con respecto a los

controles, intentamos correlacionar este dato con alguno que objetivara actividad de transporte iónico transmembrana. Así obtuvimos una correlación negativa ($r = -0.82$) del ácido araquidónico de la **SM** frente a la K_m del cotransporte Na^+-K^+-Cl , y positiva ($r = 0.64$) frente a la $V_{m\acute{a}x}$ de dicho transportador; es decir, al disminuir el ácido araquidónico en la esfingomielina (dato objetivado en el grupo de hipertensos esenciales), disminuye la $V_{m\acute{a}x}$ del transportador y aumenta su K_m (afinidad frente al sustrato). Igualmente encontramos coelaciones positivas y significativas entre el contenido de araquidónico en la **PE** y la V_{max} del Contra-transporte estimado por la técnica de **Garay** ($r = 0,76$) y del mismo **AG** en la **PC** con el contratransporte medido según el método de **Canessa** ($r = 0,65$).

Además de las anteriores correlaciones en hipertensos, encontramos que en controles existían correlaciones significativas entre varios de los parámetros de transporte y de composición lipídica. Así pudimos comprobar que en este grupo la $[Na^+]$ intracelular se correlaciona en sentido inverso con el contenido global de **AG** saturados ($r = -0.79$) y en sentido directo con el de **PUFA** ($r = 0.62$). Con el sumatorio de estos últimos, considerados globalmente los fosfolípidos mayoritarios, igualmente se correlacionó de forma inversa y estadísticamente significativa la actividad basal del Cotransporte ($r = 0.68$).

Estos datos nos parecen, como poco, sugerentes de que probablemente existe una relación clara entre la composición de la membrana plasmática y la actividad de los transportadores iónicos en ella incluidos. Se podría intentar encontrar una explicación a los cambios en la actividad de los transportadores observados en la HTA esencial, teniendo en cuenta que los centros activos de los sistemas enzimáticos $Na^+-K^+-ATPasa$ y $Ca^{++}-Mg^{++}-ATPasa$ "miran" o se disponen hacia la monocapa interna de la célula, y es precisamente en esta monocapa donde hemos objetivado, en un estudio recientemente publicado por nuestro grupo, que se encuentra la mayor cantidad de colesterol existente en la membrana de hematíes de los hipertensos esenciales¹²⁶.

DISCUSION

También pueden modificarse los flujos de Na^+ y K^+ resistentes a la ouabaína debido a los cambios de las propiedades fisicoquímicas de la membrana eritrocitaria, como ya habían referido en su trabajo **Wiley y Cooper**. Estos autores aumentaron la concentración de colesterol de membrana *in vitro* en sujetos normales y observaron un aumento del contenido eritrocitario de Na^+ .

En este mismo sentido el reciente trabajo de **Lijnen et al**²³⁶ muestra que al grupo de pacientes hipercolesterolémicos tratados con pravastatina les disminuye la concentración de Na^+ intraeritrocitario e intraplaquetario, a la vez que se observa un aumento de la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$. En este estudio se pudo comprobar que estos cambios eran coincidentes con una disminución clara en la concentración de colesterol de membrana y parecen ser responsables de la estimulación de la bomba de $\text{Na}^+\text{-H}^+$ plaquetaria y eritrocitaria durante el tratamiento con pravastatina; sin embargo debería tenerse en cuenta también que la inhibición de la HMG CoA reductasa puede tener efectos intracelulares, independientes de los cambios de los lípidos de membrana, como los descritos para la simvastatina por **Davies et al**²³⁷.

Weder et al²³⁸ también ha descrito un descenso de la concentración de Na^+ intraeritrocitario en pacientes tratados con lovastatina, junto con una disminución de la respuesta del volumen sensible a amiloride de las plaquetas frente a la acidificación del citoplasma, lo que representa una supresión de la actividad de intercambio $\text{Na}^+\text{-H}^+$ plaquetario. Sin embargo la actividad de intercambio de $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ no se modificó a pesar de los descensos relativamente importantes del colesterol-LDL y el colesterol total en plasma alcanzados con el tratamiento.

Se sabe perfectamente que los lípidos de la membrana se encuentran en equilibrio dinámico con los lípidos plasmáticos²³⁹. Tanto los fosfolípidos como el colesterol son componentes fundamentales de las membranas eritrocitarias y son

fácilmente intercambiables con los del plasma^{240,241}. Se ha descrito que grandes elevaciones de las concentraciones plasmáticas de colesterol y fosfolípidos en pacientes con colestasis crónica están asociadas con un aumento de la proporción colesterol/fosfolípido en la membrana del eritrocito, y con un aumento de la actividad de intercambio Na^+ - Li^+ . También se ha descrito en pacientes con colestasis crónica la existencia de disminución de la velocidad de flujo de Na^+ sensible a ouabaína y furosemida²³⁴. Todos los datos pues presentes en la literatura actual sugieren que los sistemas de transporte catiónicos transmembrana y las concentraciones de cationes intracelulares pueden ser afectados por los cambios del contenido lipídico de la membrana^{242,244}.

Asimismo nosotros hemos encontrado que la membrana eritrocitaria de nuestro grupo de hipertensos esenciales, tiene un porcentaje de colesterol significativamente superior a la de los controles; aunque el pequeño número de muestras que por motivos técnicos pudo analizarse impide correlacionar dichos hallazgos con la actividad y cinética de los distintos transportadores estudiados, se apunta una tendencia en el grupo de hipertensos (mayor colesterol membranario), al mayor contenido de Na^+ intracelular y sobretodo a la mayor actividad del contra-transporte Na^+ - Li^+ estimado por la técnica descrita por Canessa.

Parece por tanto que un aumento en el contenido en colesterol de la membrana eritrocitaria podría ser de efecto negativo para la normal extrusión de Na^+ por parte de la célula, alteración tantas veces descrita en la HTA esencial.

CONCLUSIONES.

1. Los hipertensos estudiados mostraron una mayor cantidad de Na^+ intracelular que los controles, presentando mayores niveles de difusión pasiva y de actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. La actividad del contratransporte $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ estimada por la técnica de Canessa, fue significativamente mayor en hipertensos que en controles.

2. Las membranas eritrocitarias de nuestro grupo de hipertensos esenciales mostraron una composición lipídica diferente a los controles, que, al menos teóricamente, las hace menos fluidas:
 - 2.1. La relación molar colesterol/fosfolípidos fue significativamente superior en hipertensos, que puede ser responsable de una menor fluidez de las membranas de estos enfermos.

 - 2.2. La cantidad neta de cada fosfolípido mayoritario también fue distinta, siendo la proporción PC/SM mayor en los hipertensos.

- 2.3. Observamos una disminución del ácido araquidónico en el grupo de hipertensos estudiados, y un gran aumento en su precursor alfa-linoléico, expresión de una menor actividad de la *delta*-5 desaturasa.
- 2.4. La proporción saturados/poliinsaturados fué también en los hipertensos, lo que contribuye a una mayor rigidez a sus membranas.
3. No pudimos encontrar una relación estadística clara entre las alteraciones lipídicas de las membranas de los hipertensos y las alteraciones descritas en los transportadores iónicos.

BIBLIOGRAFIA.

1. Dahl LK, Heine M, Tassinari L. **Effects of chronic salt ingestion. Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension.** *J Exp Med* 1962, 115: 1173-1190.
2. Loose H, Wehmeyer H, Wessels F. **Der wasser und elektrolytgehalt von erythrocyte bei artieller hypertonie.** *Klin Wochenschr* 1960, 38: 393-395.
3. Wessels F, Zumkey H. **Sodium metabolism of RBC in hypertensive patients.** En: Zumkey H, Loose H (eds.). *Intracellular electrolytes and arterial hypertension.* Stuttgart, Georg Thieme Verlag 1980: 59-68.
4. De la Sierra A, Coca A, Aguilera MT, Vives JL, Ingelmo M, Urbano-Márquez A. **Actividad de los sistemas de transporte transmembranoso de Na⁺ (ATPasa Na⁺-K⁺, Cotransporte K⁺, Cotransporte Na⁺-Li⁺-Cl⁻, Contratransporte Na⁺-Li⁺-Cl⁻ y Difusión Pasiva de Na⁺) en la HTA esencial.** *Med Clin (Barc)* 1988, 90: 186-189.
5. Garay RP, Adragua N, Canessa M, Tosteson DC. **Otward sodium and potassium cotransport in human red cells.** *J Membrane Biol* 1981, 62:169-174.
6. Garay RP, Nazaret C. **Na⁺ leak in erythrocytes from essential hypertensive patients.** *Clin Sci* 1985, 60: 613-624.
7. De la Sierra A, Coca A, Aguilera MT, Urbano A. **Abnormal erythrocyte sodium leak in a subset of essential hypertensive patients.** *Klin Wochenschr* 1989, 67:31-37.
8. Blaustein MP. **Sodium ions, calcium ions, blood presure regulation and hypertension: a reassement and a hypothesis.** *Am J Physiol* 1977, 232: c165-c173.
9. Insel PA, Motulsky HJ. **A hypothesis linking intracellular sodium, membrane receptors, and hypertension.** *Life Sci* 1984, 34: 1009-1013.



-
10. De Luise M, Blackburn GL, Fher JS. **Reduced activity of the red cell sodium-potassium pump in human obesity.** *N Engl J Med* 1980, 303: 1017-1022.
 11. Diez J, Hannaert P, Garay RP. **A kinetic study of the Na⁺-K⁺ pump in erythrocytes from essential hypertensive patients.** *Am J Physiol* 1987, 252: H1-H6.
 12. De la Sierra A, Coca A, Aguilera MT. **Abnormal Na-K-ATPase kinetics in a subset of essential hypertensive patients.** *Eur J Clin Invest* 1988, 18: 337-342.
 13. Poston L, Jones RB, Richardson PJ, Hilton PJ. **The effect of antihypertensive therapy on abnormal leucocyte sodium transport in essential hypertension.** *Clin Exp Hypertens* 1981, 3: 693-701.
 14. Nielsen JR, Pedersen KE, Johansen T, Klitgards NA. **Ouabain-binding and ⁸⁶rubidium uptake in lymphocytes of normal and borderline subjects.** *Scand J Clin Lab Invest* 1983, 43: 393-399.
 15. Woods KL, Beevers DG, West M. **Familial abnormality of erythrocyte cation transport in essential hypertension.** *Br Med J* 1981, 282: 1186-1188.
 16. Smith JB, Ash KO, Hunt CS. **Three red-cell sodium transport systems in hypertensive and normotensive Utah adults.** *Hypertension*, 1984 6: 159-166.
 17. Cumberbatch M, Zarcian K, Davidson C, Morgan DB, Swaminatan R. **The early and late effects of digoxin treatment on the sodium transport, sodium content and Na⁺-K⁺-ATPase of erythrocytes.** *Br J Clin Pharmacol* 1981, 11: 565-570.
 18. Whittaker J, Hawkins M, Swaminatan R. **Changes in erythrocyte sodium, sodium transport and 3H-ouabain binding capacity during digoxin administration in the pig.** *Life Sci* 1983, 32: 747-754.

-
19. Hasstedt SJ, Wu LL, Ash KO, Kuida H, Williams RR. **Hypertension and sodium-lithium countertransport in Utah pedigrees: evidence for major-locus inheritance.** *Am J Hum Genet* 1988, 43: 14-22.
 20. Garay R, Rosati C, Meyer P. **Sodium transport in primary hypertension.** *Klin Wochenschr* 1987, 65(suppl VIII): 66-68.
 21. Garay R. **Kinetics aspect of red blood cell sodium transport systems in essential hypertension.** *Hypertension* 1987, 10 (5): 11-14.
 22. Garay R. **Anomalies du transport du sodium dans l'hypertension artérielle essentielle.** *Press Med* 1989, 18(22): 1097-1100.
 23. Brock TA, Brugnara C, Canessa M, Gimbrone MA. **Bradykinin and vasopressin stimulate Na-K-Cl cotransport in cultures endothelial cells.** *Am J Physiol* 1986, 250: 888-895.
 24. Owen NE. **Regulation of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport in vascular smooth muscle.** *Biochem Biophys Res Commun* 1985, 125: 500-508.
 25. Canessa M. **The Na-K-Cl cotransport in essential hypertension.** In: Zadunayski *J Membrane Biology*. New York: Plenum publishing 1987.
 26. Garay R, Meyer PA. **New test showing abnormal Na and K fluxes in erythrocytes of essential hypertensives patients.** *Lancet* 1979, 17: 349-353.
 27. Cusi D, Barlassina C, Ferrandi N, Lupi P, Ferrari P, Bianchi G. **Familial aggregation of cation transport anomalies and essential Hypertension.** *Clin Exp Hyertens* 1981, 3: 871-884.
 28. Davidson JS, Opie LH, Keding B. **Sodium-potassium cotransport activity as genetic marker in essential hypertension.** *Br Med J* 1982, 284: 539-541.
-

-
-
29. Lijnen P, Buryramba-Kabangu JR, Fagard R, Groesseneker AR, Staesse JA, Amery AK. **Intracellular concentration and transmembrane fluxes of sodium and potassium in erythrocytes of white normal male subjects with and without a family history of hypertension.** *J Hypertension* 1984, 2: 25-30.
 30. De Mendonça M, Grichois ML, Toumi K. **Furosemide and bumetadine sensitive fluxes in erythrocytes from genetically hypertensive rats (SHR).** *Clin Exp Hypertens* 1981, 3: 885-895.
 31. Saitta MN, Hannaert PA, Rosati C, Soler-Diaz A, Senn N, Garay R. **(Na-K-Cl) cotransport function and dysfunction in different forms of primary hypertension.** *Am J Hypertens* 1988, 1(1): 60-63.
 32. Canessa M, Spalvins A, Adragna N, Falkner B. **Red cell sodium countertransport and cotransport in normotensive and hypertensive blacks.** *Hypertension* 1984, 6: 344-351.
 33. Meyer P, Garay R, Nazaret C. **Inheritance of abnormal erythrocytes cation transport in essential hypertension.** *Br Med J* 1981, 282: 1114-1117.
 34. Garay R, Nazaret C, Hannaert PA, Price M. **Abnormal Na-K cotransport function in a group of patients with essential hypertension.** *Eur J Clin Invest* 1983, 13: 311-320.
 35. Duhm J, Goebel B, Lorenz R, Weder P. **Sodium-lithium exchange and sodium-potassium cotransport in human erythrocytes (part 2): A simple uptake test applied to normotensive and essential hypertensive individuals.** *Hypertension* 1982, 4: 477-482.
 36. Willey JS, Clarke DA, Bonacquisti LA, Scarlett JD, Harra SB, Doyle AE. **Erythrocyte cation cotransport and countertransport in essential hypertension.** *Hypertension* 1984, 6: 360-368.
 37. Birks RI, Langlois S. **Ouabain-insensitive net sodium influx in erythrocytes of normotensives and essential hypertensive humans.** *Proc R Soc Lond B* 1982, 216:53-69.

-
-
38. Canessa M, Bize I, Solomon H. **Sodium countertransport and cotransport in human red cells: function, dysfunction and genes in essential hypertension.** *Clin Exp Hypertens* 1981, 3: 783-795.
 39. Ringel RE, Hamlyn JM, Schaffer J. **Red-cell cotransport activity and sodium content in black men. Relationship to essential hypertension.** *Hypertension* 1984, 6: 724-730.
 40. Adragna N, Canessa M, Solomon H, Slater E, Stoteson D. **Red-cell lithium-sodium countertransport and sodium-potassium cotransport in patients with essential hypertension.** *Hypertension* 1982, 4: 795-804.
 41. Tuck ML, Gross C, Maxwell LH, Brickman AS, Kasnoshteim G, Mayes D. **Erythrocyte of Na-K cotransport and Na-K pump in black and caucasian hypertensive patients.** *Hypertension* 1984, 6:536-544.
 42. Garay R, Nazaret C, Dagher G, Bertrand E, Meyer P. **A genetic approach to the geography of hypertension: examination of Na-K cotransport in Ivory coast africans.** *Clin Exp Hypertens* 1981, 3: 861-870.
 43. Tuck ML, Corry DB, Maxwell M, Stern N. **Kinetic analysis of erythrocyte Na-K pump and cotransport in essential hypertension.** *Hypertension* 1987, 10: 204-211.
 44. Weder AB, Torretti Ba, Julius S. **Racial differences in erythrocytes cation transport.** *Hypertension* 1984, 6: 115-123.
 45. Haas M, Scooter J, Tosteson DC. **Coupling of lithium to sodium transport in human red cells.** *Nature* 1975, 258: 425-427.
 46. Hannaert PA, Garay R. **A kinetic analysis of Na-Li countertransport in human red blood cells.** *J Gen Physiol* 1986, 87: 353-368.
 47. Canessa M, Brugnara C, Escobales N. **The Li-Na exchange and Na-K-Cl cotransport system in essential hypertension.** *Hypertension* 1987,10 (suppl I): I4-I10.

-
-
48. Canessa M, Adragna N, Solomon HS, Connolly TH, Tosteson DC. **Increased sodium lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension.** *The New Eng J Med* 1980, 302: 772-776.
 49. Rosati C, Meyer P, Garay R. **Sodium transport kinetics in erythrocytes from spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension* 1988, 11(1): 41-48.
 50. Weder AB. **Red cell lithium-Sodium countertransport and renal lithium clearance in hypertension.** *The New Eng J Med* 1986, 314: 198-201.
 51. De la Sierra A, Coca A, Aguilera MT, Urbano-Marquez A. **Na-Li countertransport in essential hypertension.** *J Hypertension* 1988, 6: 931-937.
 52. Cooper R, Trevisan M, Ostrow D, Sempos C, Stamler J. **Blood pressure and sodium-lithium countertransport: finding in population based surveys.** *J Hypertension* 1984, 2: 467-471.
 53. Corrocher R, Steimayr M, Ruzzenente O. **Elevation of red cell sodium-lithium countertransport in hyperlipidemias.** *Life Sci* 1985, 36: 649-655.
 54. Brugnara C, Corrocher R, Foroni L, Steimayr M, Bofanti F, De Sanche G. **Lithium-sodium countertransport in erythrocytes of normal and hypertensive subjects. Relation with age and plasma-renin activity.** *Hypertension* 1983, 5: 529-534.
 55. Woods JW, Parker JC, Watson BS. **Perturbation of sodium-lithium countertransport in red cells.** *The New Eng J Med* 1983, 308(21): 1258-1261.
 56. Woods JW, Watson BS. **Red cell sodium-lithium countertransport in sons of normotensive and hypertensive patients: a Follow-up study.** *The New Eng J Med* 1984, 310(18): 1191.

-
-
57. Woods JW, Falk RJ, Pittman AW, Klemer PJ, Watson Bs, Namboodiri K. **Increased red-cell sodium-lithium countertransport in normotensive sons of hypertensive parents.** *The New Eng J Med* 1982,306 (10): 593-595.
 58. Williams RR, Hunt SC, Kuida H, Smith Jb, Ahk KO. **Sodium-lithium countertransport in erythrocytes of hypertension prone families in Utah.** *Am J Epidemiol* 1983, 118: 338-344.
 59. Haastedt SJ, Wu LL, Ash KO, Kuida H, Williams RR. **Hypertension and sodium-lithium countertransport in Utah pedigrees: evidence for mayor-locus inheritance.** *Am J Hum Genet* 1988, 43(1): 14-22.
 60. Weder AB, Schork NJ, Julius S. **Linkage of MN locus and erythrocyte lithium-sodium countertransport in Tecumseh, Michigan.** *Hypertension* 1991, 17(2): 977-981.
 61. Turner ST, Johnson M, Boerwinkle E, Richardson E, Taswell HF, Sing CF. **Sodium-lithium countertransport and blood pressure in healthy donors.** *Hypertension* 1985, 7: 955-962.
 62. Mangili R, Bending JJ, Scott G, Li LK, Gupta-Aviderti V. **Increased sodium- lithium countertransport activuty red cells of patients with insulin-dependent diabetes and nephropaty.** *The New Eng J Med* 1988, 318(3): 146-150.
 63. Relimpio F,Stiefel P, Salinas MD, Acosta D, Carneado J, García-Donas MA, Astorga R. **Erythrocyte transmembrane sodium transport in type I(Insulin dependent) diabetes mellitus.** *Diabetologia* 1992, 35(1): 57.
 64. Hunt SC, Williams RR, Smith JB, Ash KO. **Associations of three erythrocyte cation transport systems with plasma lipids in Utah subjctcs.** *Hypertension* 1986, 8: 30-36.
 65. Trevisan M, Ostrow D, Cooper RS, Sempos C, Stamler J. **Sex and race differences in sodium-lithium countertransport and red cell sodium concentrations.** *Am J Epidem* 1984, 120: 537-541.
-
-

-
-
66. Canessa M, Adragna N, Bize I. **Ouabain insensitive cation transport in the red cell of normotensive and hypertensive patients.** *En: Zuckley J, Loose H. Intracellular electrolytes and arterial hypertension. First international symposium. Stuttgart, New York: Georg thieme Verlag 1980:239-249.*
67. Weder AB, Torreti B, Kach VL, Rochini AP. **The antihypertensive effects of caloric restriction in obese adolescents: dissociation of effects on erythrocyte countertransport and cotransport.** *J Hypertes 1984, 2: 507-514.*
68. Sacks FM, Stamler MJ, Muñoz A, McMamus K, Canessa M, Kass HE. **Effects of linoleic and oleic acids on blood pressure blood viscosity and erythrocyte cation transport.** *J Am Coll Nutr 1987, 6: 179-185.*
69. McCarron DA, Morris CD, Henry HJ, Staton JL. **Blood pressure and nutrient intake in the United States.** *Science 1984, 224: 1392-1398.*
70. Harlan WR, Landis JR, Schomouder RL, Goldstein NG, Harlan LC. **Blood lead and blood pressure; relationship in adolescent and adult U.S. population.** *Jama 1985, 253: 530-534.*
71. McCarron DA, Morris CD. **Oral Ca²⁺ in mild to moderate hypertension: a randomized, placebo-controlled trial.** *Clin Res 1984, 32: 335A.*
72. Ramussen H. **Cellular calcium metabolism.** *Ann Int Med 1983, 98: 809-816.*
73. Zideck W, Vetter HD, Dorst KG, Zumkley H, Loose H. **Intracellular Na and Ca activities in essential hypertension.** *Clin Sci 1982, 63: 41s-43s.*
74. Lew PD; Favre L, Waldrogl FA, Walloton MB. **Cytosolic free calcium and intracellular calcium stores in neutrophils from hypertensive subjects.** *Clin Sci 1985, 69: 227-230.*
-
-

-
-
75. Oshima T, Matsura HG, Kisd K. **Abnormalities in intralymphocytic sodium and free calcium in essential hypertension: relation to plasma renin activity.** *J Hypertens* 1986, 4(suppl 6): 334-336.
 76. Cooper RS, Shamsi N, Katz S. **Intracellular calcium and sodium in hypertensive patients.** *Hypertension* 1987, 9: 230-235.
 77. Erne P, Bolli P, Burgisser E, Buhler FR. **Correlation of platelet calcium with blood pressure . Effect of the antihypertensive therapy.** *The New Eng J Med* 1984, 310: 1084-1088.
 78. Zideck W, Sachinidis A, Spieker C, Storkebaum W. **Effect of hypertensive plasma on Ca²⁺ transport in human neutrophils.** *Atherosclerosis* 1988, 69: 185-190.
 79. MacLenan D. **Purification and properties of the adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum.** *J Biol Chem* 1970, 245: 4508-4518.
 80. Rasmussen H. **The calcium messenger system.** *The New Eng J Med* 1986, 314:1094-1101.
 81. Vicenzi FF, Larsen FL. **The plasma membrane calcium pump: regulation by a soluble Ca²⁺ binding protein.** *Fed Proc* 1980, 39: 2427-2431.
 82. Vezzolli G, Elli AA, Tripodi G, Branchi G, Carafoli E. **Calcium ATPase in erythrocytes of spontaneously hypertensive rats of the Milan Strain,** *J Hypertens* 1985, 3: 645-648.
 83. Orosulongo OO, Okodolo BE, Lawal DA, Falase AO. **Erythrocyte membranes Ca²⁺-pumping ATPase of hypertensive humans: reduced stimulation by calmodulin.** *Bioscience Rep* 1985, 5: 525-531.
 84. Vicenzi FF, Morris CD, Kinsed LB, Kenny M, McCarron DA. **Decreased calcium pump adenosine triphosphatase in red blood cells of hypertensive subjects.** *Hypertension* 1986, 8: 1058-1066
-
-

-
-
85. Dagher G, Amar M, Khalif A. **Red blood cells Ca²⁺ pump is not altered in essential hypertension of humans and Kyoto rats.** *Biochem Biophys Acta* 1987, 903: 218-228.
86. De la Sierra A, Hannaert P, Oliviers P, Seen N, Garay Rp. **Kinetic study of the Ca²⁺ pump in erythrocytes from essential hypertensive patients.** *J Hypertens* 1990, 8: 334-336.
87. Reuter H, Seitz N. **The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and the external ion composition.** *J Physiol* 1968, 195: 451-470.
88. Blaustein MD, Nelson MT. **Sodium-calcium exchange: its role in the regulation of cell calcium.** En: **Membrane transport of calcium.** *Carafoli Ed London Academic Press:217-236.1982.*
89. Escobales N, Canessa M. **Ca²⁺-activated Na fluxed in human red cells. Amiloride sensitivity.** *J Biol Chem* 1985, 260(22): 11914-11923.
90. Escobales N, Rivera A. **Na for H exchange in rabbit erythrocytes.** *J Cell Physiol* 1987, 132: 73-80.
91. Schomouder RL, Weder AB. **Platelet sodium-proton exchange is increased in essential hypertension.** *J Hypertens* 1989, 7: 325-330.
92. Vallega GA, Canessa M, Berck BC, Brock TA, Alexander RW. **Vascular smooth muscle Na-H exchanger kinetics and its activation by angiotensin II.** *Am J Physiol.* 1988, 254: 751-758.
93. Stewart Dj. **Monitoring of sodium: proton exchange in hepatocytes by electronic cell sizing.** *Hepatology* 1989, 10(6): 986-994.
94. Ramaswamy K, arig JM, Kleiman JG, Harris MS, Barry JA. **Sodium-proton exchange in human ileal brush border vesicle membrane.** *Biochim Biophys Acta* 1989, 981(2): 193-199.
-
-

-
-
95. Milanick MA. **Proton fluxes associated with the Ca pump in human red blood cells.** *Am J Physiol* 1990, 258(3): 552-562.
 96. Spector A, Yoreck MA. **Membrane lipid composition and cellular function.** *J Lipid Res* 1985, 26: 1015-1032.
 97. Owen Js, Bruckdorfer KR, Day RC, McIntyre N. **Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease.** *J Lipid Res* 1982, 23: 124-130.
 98. Owen JS, McIntyre N, Gillet PT. **Lipoproteins cell membranes and cellular functions.** *TIBS* 1984: 283-292.
 99. Singer SJ, Nicholson GL. **The fluid mosaic model of the structure of cellular membranes.** *Science* 1972, 175: 720-731.
 100. Kahlemberg A, Banjo B. **Involvement of phospholipids in the D-glucose uptake activity of isolated human erythrocyte membranes.** *J Biol Chem* 1972, 247: 1156-1160.
 101. Stubb CD, Smith AD. **The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function.** *Biochim Biophys Acta* 1984, 779: 89-137.
 102. Sanderman H. **Regulation of membrane enzymes by lipids.** *Biochim Biophys Acta* 1978, 515: 209-235.
 103. Rothman JE, Lenard J. **Membrane asymetry.** *Science* 1977. 195: 743-753.
 104. Bergelson LD, Barsukov LI. **Topological asymetry of phospholipids in membranes.** *Science* 1977, 197: 224-230.
 105. Smith RL, Ofdfeld E. **Dynamic structure of membranes by dueterium NMR.** *Science* 1984, 225: 280-288.
-
-

-
-
106. Spector AA, Mathur S, Kaduce TL, Hynan BT. **Lipid nutrition and metabolism of cultured mammalian cells.** *Prog Lipid Res* 1981, 19: 155-186.
107. Brûlet P, McConnell HM. **Lateral hapten movility and immunochemistry of model membranes.** *Pro Natl Acad Sci USA* 1976, 73: 2977-2981.
108. Armond PA, Staenin LA. **Lateral and vertical displacement of integral membrane proteins during lipid phase transition in *Anacystis nudulans*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76: 1901-1905.
109. Borochoy H, Abbott RE, Schacher D, Shinitzky M. **Modulation of erythrocyte membrane proteins by membrane cholesterol and fluidity.** *Biochemistry* 1979, 18: 251-255.
110. Hutchai H, Cooper RA, Forster RE. **Erythrocyte water permeability. The effects of anesthetic alcohols and alterations in the level of membrane cholesterol.** *Biochem Biophys Acta* 1980, 600: 542-552.
111. Renooij W, Van Golde IMG. **The exchange of phospholipids between rat erythrocyte and plasma, and the translocation of phosphatidylcholine across the red cell membrane, are temperature dependent processes.** *FEBS Lett* 1976; 71: 321-324.
112. Borochoy H, Zahler P, Wilbrandt W, Shinitzky KM. **The effect of phosphatidylcholine to sphingomyelin mole ratio of the dynamic properties of sheep erythrocyte membrane.** *Biochim Biophys Acta* 1977, 470: 382-388.
113. Cooper RA, Durocher RJ, Leslie MH. **Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia.** *J Clin Invest* 1977, 60: 115-121.
114. Cooper RA. **Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease.** *N Engl J Med* 1977, 297: 371-377.
-
-

-
-
115. Jänig F. **Structural order of lipids and proteins in membranes: evaluation of fluorescence anisotropy data.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76: 6361-6365.
116. Chapman D, Gomez-Fernandez JC, Goñi FM. **Intrinsic protein-lipid interactions. Physical and biochemical evidence.** *Febs Lett* 1979, 98: 211-223.
117. Cooper RA, Arnen EC, Willey JS, Shattil SJ. **Modification of the red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersion. A model for the primary spur cell defect.** *J Clin Invest* 1975, 51: 393-398.
118. Cooper RA. **Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and red cell function in human red blood cells.** *J Supramol Struct* 1978, 8: 413-430.
119. Cooper RA, Leslie MH, Fischkoff S, Shinitzky M, Shattil J. **Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro: production of red cells possessing more than two cholesterol per phospholipid.** *Biochemistry* 1978, 17: 327-331.
120. Day RC, Harry DS, McIntyre N. **Plasma lipoproteins and the liver.** In: *Liver and biliary disease. Pathophysiology Diagnosis management.* R Wrigth, KGG Alberti, S Karran and HG Millward-Sadler, editors. WB Saunders, London, 1979: 63-82.
121. Cooper RA, Diloy-Puray M, Lando P, Greenberg MS: **An analysis of lipoproteins, bile acids and red cell membranes associated with target cells and spur cells in patients with liver disease.** *J Clin Invest* 1970, 51: 3182-3192.
122. Owen JS; McIntyre N. **Erythrocyte lipid composition and sodium transport in human liver disease.** *Biochim Biophys Acta* 1978, 510: 168-176.
123. Hidenbrand K, Nicolau C. **Nanosecond fluorescence anisotropy decays of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in membranes.** *Biochim Biophys Acta* 1979, 553: 365-377.
-
-

-
-
124. Hare F, Amiell J, Lussan C. **Is an areage viscosity tenable in lipid bilayer and membranes? A comparison of semi-empirical equivalent viscosities given by unbound probes: a nitroxide and fluorophore.** *Biochem Biophys Acta* 1979, 555: 388-408.
125. Roelofsen B, Van Meer G, Opdenkamp JA. **The lipids of red cell membranes. Compositional, structural and functional aspects.** *Scand J Clin Lab Invest* 1981, 41(156): 111-115.
126. Muriana FJG, García-Donas MA, Villar J, Ruiz-gutierrez V. **Distribution of erythrocyte membrane cholesterol in human essential hypertension.** *J Hypertens* 1994, 12: 1383-1386.
127. Roelofsen B, Kuypers FA, Op de Kamp DN, Van Deenen LM. **Influence of phosphatidylcholine molecular species composition on stability of the erythrocyte membrane.** *Biochem Soc Trans* 1989, 17: 284-286.
128. Schoroeder F, Nemezc G, Wood W, Joiner C, Morrot G, Ayrant-Jarrier M. **Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte.** *Biochim Biophys Acta* 1991, 1066: 183-192.
129. Van Meer G, Poorthumus BJ, Wirtz KA, Op de Kamp JA, Van Deenen LL. **Transbilayer distribution and movility of PC in intact erythrocyte membranes. A study with PC exchange protein.** *Eur J Biochem* 1988, 103:283.
130. Hullin F, Bossant MJ, Salem N. **Aminophospholipid molecular species asymetry in the human erythrocyte plasma membrane.** *Biochem Bioophys Acta* 1991, 1061: 15-25.
131. Vanderkooi J, Fischhoff S, Chance B, Cooper RA. **Fluorescent probe analysis of the lipid architecture of natural and experimental cholesterol-rich membranes.** *Biochemistry* 1974, 13:1589-1595.
132. Sheetz MP, Singer SJ. **Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanisms of drug-erythrocyte interaction.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1974, 71: 44-57.
-
-

-
-
133. Fuji T, Tamura A. **Asymmetric manipulation membrane lipid bilayer of intact human erythrocytes with phospholipases A, C or D induces a change in cell shape.** *J Biochem* 1979, 86: 1345.
134. Roelofsen B, Siberius TM, Verheif H, Zevenbergen HJ. **The action of cobra venom phospholipase A2 isoenzymes toward intact human erythrocytes.** *Biochem Biophys Acta* 1980, 600: 1012.
135. Wali R, Jaffe S, Kumar D, Kalra V. **Alterations in organization of phospholipids in erythrocytes as factor in adherence to endothelial cells in diabetes mellitus.** *Diabetes* 1988, 37: 104-111.
136. Roelofsen B, Schatzmen HJ. **The lipid requirement of the (Ca⁺⁺-Mg⁺⁺)ATPase in the human erythrocyte membrane as studied by various highly purified phospholipases.** *Biochem Biophys Acta* 1977, 464: 17.
137. Molina MT, Vázquez CM, Ruiz-Gutiérrez V. **Metabolismo del colesterol: su regulación a nivel hepático e intestinal.** *Grasas y Aceites*, 1991, 42: 298-308.
138. Rhoatds DE, Osburn L, Peterson N, Raghupathy E. **Release of neurotransmitter amino-acids from synaptosomes: enhancement of calcium independent efflux by oleic and arachidonic acid.** *J Neurochem* 1983, 41: 531-537.
139. Chan P, Karlan R, Fichman R. **Reductions of aminobutyric acid and glutamate uptake and Na-K-ATPase activity in brain slices and synaptosomes by arachidonic acid.** *J Neurochem* 1983, 40: 309-316.
140. Messineo FC, Rathier M, Faureau C, Watras J, Takenaka H. **Mechanisms of fatty acid effects on sarcoplasmic reticulum.** *J Biol Chem* 1984, 259: 1336-1343.
141. Gerzer R, Hamet P, Ross A, Lawson J, Hardman J. **Calcium-induced release from platelet membranes of fatty acids that modulate soluble guanylate-cyclase.** *J Pharmacol Exp Ther* 1983, 226: 180-186.
-
-

-
142. Pasternak C, Bergenon JM. **Turnover of mammalian phospholipids. Stable and unstable components in neoplastic mast cells.** *Biochem J* 1970, 119: 473-480.
 143. D'Sousa C, Clarke J, Cook H, Spencer M. **Studies on the turnover of endogenous choline-containing phospholipids of cultured neuroblastoma cells.** *Biochem Biophys Acta* 1983, 752: 467-473.
 144. Ginsberg B, Brown T, Simon I, Spector A. **Effect of membrane lipid environment on the properties of insulin receptors.** *Diabetes* 1981, 30: 773-780.
 145. Ginsberg B, Jabour J, Spector A. **Effect of alterations in membrane lipid saturation on the properties of the Insulin-R of Ehrlich ascites cells.** *Biochim Biophys Acta* 1982, 690: 157-164.
 146. Pelikanova T, Kohut M, Hilgertova J, Rase J, Farska I, Valek J. **Insulin binding to erythrocytes and fatty acid composition of erythrocyte membrane phospholipids in healthy men.** *Clin Chim Acta* 1989, 179: 197-200.
 147. Lee G, Consiglio E, Habig W, Dyer S. **Structure-function studies of receptors for thyrotropin and tetanus toxin: lipid modulation of effector binding to the glycoprotein receptor component.** *Biochim Biophys Res Commun* 1978, 83:313-320.
 148. Ho W, Cox B. **Reduction of opioid binding in neuroblastoma X glioma cells grown in medium containing unsaturated fatty acids.** *Biochim Biophys Acta* 1982, 688: 211-217.
 149. Needleman S, Spector A, Hoak JC. **Enrichment of human platelet phospholipids with linoleic acid diminishes thromboxane release.** *Prostaglandins* 1982, 24: 607-621.
 150. Holman RT. In "New trends in nutrition, lipid research, and cardiovascular diseases". Holman RT ed. AR Liss Pub, New York 1981 p:25-42.
 151. Navarro X, Cañete J, Prat J, Segura R. **Fatty acids of plasma and red blood cell lipids in a normal population.** *Rev Esp Fisiol* 1988,44: 387-394.
-

-
-
152. Putnan J, Celson S, Devoe P, Berness L. **The effect of variations in dietary fatty acids on the fatty acid composition of erythrocyte phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in human infants.** *American J Clin Nutr* 1982, 36: 106-114.
153. De Luchi C, Pita ML, Faus MJ, Periago JL, Gil A. **Influences of diet and postnatal age on the lipid composition of red blood cell membrane in newborn infants.** *Am Nutr Metab* 1988, 32: 231-239.
154. Kamada T, Yamashita T, Baba Y, Kai M, Setoyama S, Chuman Y, Otsuji S. **Dietary sardine oil increased erythrocyte membrane fluidity in diabetic patients.** *Diabetes* 1986, 35: 604-611.
155. Loschiavo C, Ferrari C, Aprili F, Grigolini L, Faccini G, Maschio G. **Modification of serum and membrane lipid composition induced by diet in patients with chronic renal failure.** *Clin Nephrol* 1990, 34: 267-271.
156. Hessel E, Agren J, Paulitschke M, Hanninen O, Hanninen A, Lerche D. **Fresh water fish diet affect lipid composition, deformability and aggregation properties of erythrocytes.** *Atherosclerosis* 1990, 82: 37-42.
157. Engelhard V, Esko J, Storm D, Glaser M. **Modification of adenylate cyclase activity in LM cells by manipulation of membrane phospholipids composition in vivo.** *Proc Natl Acad Sci* 1976, 73: 4482-4486.
158. Engelhard V, Glaser M, Storm D. **Effect of membrane phospholipid compositional changes on adenylate cyclase in LM cells.** *Biochemistry* 1978, 17: 3191-3200.
159. Sinha A, Shattil R, Colman W. **Cyclic AMP metabolism in cholesterol-rich platelets.** *J Biol Chem* 1977, 252: 3310-3314.
160. Rothblat GH, Mahlberg FH, Johnson W, Phillips MC. **Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux.** *J Lipid Res* 1992, 33: 1091-1097.
-
-

-
-
161. Willey J, Cooper RA. **Inhibition of cation cotransport by cholesterol enrichment of human red cell membranes.** *Biochem Biophys Acta* 1975, 413: 425-431.
162. Kimelberg HK. **Alterations in phospholipids dependent Na-K-ATPase activity due lipid fluidity. Effects of cholesterol and Mg.** *Biochim Biophys Acta* 1975, 413: 143-156.
163. Rossi J, Caride AJ. **Inhibition of the phosphatase activity of the red cell membrane Ca⁺⁺-pumping by acidic phospholipids.** *Biochem Biophys Acta* 1991, 1061: 49-55
164. Thomas P, Verkley A. **The disimilar interactions of the calcium antagonist flunarizine with different phospholipid classes and molecular species: a differential scanning calorimetry study.** *Biochim Biophys Acta* 1990, 1030: 211-222.
165. Cesar JM, Fernández I, Nevarro JL. **Determinacion de fosfolípidos en hematías, plasma y plaquetas en una enferma con esferocitosis hereditaria.** *Sangre* 1989, 4: 300-302.
166. Cunnane S, Ho SY, Duffy P, Ells K, Horrobin DF. **Essential fatty acid and lipid profiles in plasma and erythrocytes in patients with multiple sclerosis.** *Am J Clin Nutr* 1989, 50: 801-806.
167. Martinez M. **Polyunsaturated fatty acid changes suggesting a new enzymatic defect in Zellweger Syndrome.** *Lipids* 1989, 24: 261-265.
168. Vajreswari A, Narayanareddy K, Srinivasa P. **Fatty acid composition of erythrocyte membrane lipid obtained from children suffering from Kwashiorkor and marasmus.** *Metabolism* 1990, 39: 779-782.
169. Korf I, Tsagikian TA, Mescheriakanova VA, Lerchev M, Arutiunova MB. **Changes in fatty acid composition of the plasma and erythrocytes in osteocondrosis.** *Vopr Med Klin* 1989, 4: 81-84.
-
-

-
-
170. Mazzanti L, Rabini R, Testa I, Bertoli E. **Modifications induced by diabetes on the physicochemical and functional properties of erythrocyte plasma membrane.** *Eur J Clin Invest* 1989, 1: 84-89.
171. Gironcoli M, Gandini A, Girrelli D, Ferrari S. **Membrane fatty acids and erythrocyte Li⁺-Na⁺ countertransport in nephrotic syndrome and their relationship.** *Ric Clin Lab* 1989, 2: 149-156.
172. Pagnan A, Corrocher R, Ambrossio GB, Ferrari S, Guarini P, Piccolo D, Opportuno A, Bassi A. **Effects of an olive oil rich diet on erythrocyte membrane lipid composition and cation transport systems.** *Clin Sci* 1989, 1: 87-93.
173. Gapon LI, Shafer M, Velizhanina I, Zhuravleva T. **Effect of natriuretic hormone and changes in the lipid spectrum of erythrocyte membranes on the activity on enzymes of transmembrane ion transport in patients with essential hypertension.** *Tex Arkh* 1990, 12: 40-44.
174. Aragon-Birlouez I, Montenay-Garestier T, Devinck MA. **Further analysis of cell membrane changes in genetic hypertension in rats by diphenylhexatriene fluorescence polarization.** *Clin Sci* 1986, 66: 717-723.
175. Naftilan Aj, Dzau VJ, Loscalzo J. **Preliminary observations on abnormalities of membrane structure and function in essential hypertension.** *Hypertension* 1986, 8 (suppl II): 19-24.
176. Orlov SN, Postnov YV. **Ca⁺⁺ binding and membrane fluidity in essential and renal hypertension.** *Clin Sci* 1982, 63: 281-284.
177. Tsuda K, Tsuda S, Minatogawa Y, Ywahashi H, Kido R, Masuyama Y. **Decreased membrane fluidity of erythrocytes and cultures vascular smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats: An electron spin resonance study.** *Clin Sci* 1988, 75: 477-480.
-
-

-
-
178. Dominizack AF, Lazar DF, Das AK, Bohr DF. **Lipid bilayer in genetic hypertension.** *Hypertension* 1991 18(6):748-757.
179. Dominizak AF, Bohr DF. **The primary of membrane microviscosity in genetic hypertension.** *Am J Hypertens* 1991,4: 963-969.
180. Furspan PB, Bohr DF. **Lymphocyte abnormalities in three types of hypertension in the rat.** *Hypertension* 1985, 7: 860-866.
181. Furspan PB, Bohr DF. **Calcium related abnormalities in lymphocytes from genetically hypertensive rats.** *Hypertension* 1986, 8 (supplIII): 123-126.
182. Van Breemen C, Cauvin C, Johns A, Leitjen P, Yamamoto H. **Ca²⁺ regulation of vascular smooth muscle.** *Fed Proc* 1986, 45: 2746-2751.
183. Jones AW, Hart RG. **Altered ion transport in aortic smooth muscle during deoxycorticosterone acetate hypertension in the rat.** *Circ Res* 1975, 37: 333-341.
184. Bialecki RA, Tulenko TN. **Excess membrane cholesterol alters calcium channels in arterial smooth muscle.** *Am J Physiol* 1989, 257: C306-C314.
185. Okamoto H, Kawaguchi H, Minami M, Saito H, Yasuda H. **Lipid alterations in renal membrane of stroke-prone spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension* 1989,13: 456-462.
186. Garay RP, Garrahan PJ. **The interaction of sodium and potassium with the sodium pump in red cells.** *J Physiol Lond* 1973; 231: 297-253.
187. Dagher G, Brossard M, Feray JC, Garay RP. **Modulation of erythrocyte Na⁺ transport pathways by excess Na⁺ intake.** *Life Sci* 1985; 37: 243-253.
188. Rose HG, Oklander M. **Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes.** *J Lipid Res* 1965; 6: 428-431.
-
-

-
-
189. Peutchant E, Wolff R, Salles E, Jensen R. **One-step extraction of human erythrocyte lipids allowing rapid determination of fatty acid composition.** *Anal Biochem* 1989; 181: 341-344.
190. Tsuchiya Y, Sugai J. **Effect of mycoplasma pneumoniae infection on human erythrocytes changes in osmotic fragility, lipid composition, sialic acid content, Ca²⁺ ATPase activities and ATP concentration.** *Biochem Med* 1982; 28: 256-265.
191. Vitiello F, Zanetta P. **Thin-layer Chromatography of phospholipids.** *J Chromatograph* 1978; 166: 637-640.
192. Blaustein MP. **How does sodium cause hypertension?. A hypothesis.** In "Intracellular electrolytes and arterial hypertension". Ed. H. Zumkey y H. Loose. Thieme Stuttgart 1980: 151-157.
193. Postnov Y. **An approach to the cell membrane alteration in hypertension.** *Hypertension* 1990, 15: 332-337.
194. Mongeau GJ. **Erythrocyte cation fluxes in essential hypertension of children and adolescents.** *Int J Pediatr Nephrol* 1985, 6: 41-46.
195. De La Sierra A, Coca A, Aguilera MT, Ingelmo M, Urbano A. **Clinical profiles and erythrocyte Na⁺ transport abnormalities of four major types of primary hypertension in Spain.** *Kidney Int* 1989, 36: 114-119.
196. Stiefel P. **Actividad del transportador de membrana sodio/proton (Na⁺/H⁺) en la hipertension arterial esencial.** Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, 1991.
197. Caballero A. **Patología de membrana e hipertensión arterial esencial. Actividad de los sistemas de transporte.** Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. 1994.
-
-

-
-
198. De la Sierra A, Coca A, Aguilera MT, Urbabo A. **Outward Na-K-Cl cotransport function in erythrocytes from spanish essential hypertensives.** *J Human Hypertens* 1989, 3: 1-8.
199. De Gier J, Mandersloot JG, Van Deenen LLM. **Lipid composition and permeability of liposomes.** *Biochim Biophys Acta* 1968, 150: 666-675.
200. Berlin E, Bathena J, Judd J, Nair PP, Jones Y, Taylor PR. **Dietary fat and hormonal effects on erythrocytes membrane fluidity and lipid composition in adult women.** *Metabolism* 1989, 38(8): 790-796.
201. Yeagle PL. **Lipid regulation of cell membrane structure and function.** *FEBS Lett* 1989, 3: 833-842.
202. Devynek MA, Perouillet MG, Nuñez AM, Aragon I, Montenay-Garestier T, Helene C, Meyer P. **Diffuse structural alterations in cell membranes of spontaneously hypertensive rats.** *Proc Natl Acad Sci* 1982, 79: 5057-5060.
203. Benjamin N, Robinson BF, Graham JG, Wilson RB. **Cholesterol:phospholipid ratio is elevated in platelet plasma membrane in patients with hypertension.** *J Hum Hypertens* 1990, 4: 273-276.
204. Shinitzky M. **Membrane fluidity and cellular functions.** In Shinitzky M (ed): *Physiology of membrane fluidity*. Fla, CRC. Press Inc 1984, 1-51.
205. Sandhagen B, Frithz G, Waern V, Ronquist G. **Increased whole blood viscosity combined with decreased erythrocyte fluidity in untreated patients with essential hypertension.** *J Intern Med* 1990, 228: 623-626.
206. Corrocher R, Pagnan A. **Effect induced by olive-rich diet on erythrocytes membrane lipids and sodium-potassium transports in postmenopausal hypertensive women.** *J Endocrinol Invest* 1992, 15: 369-376.
-
-

-
-
207. Anceschi M, Coata G, Cosmi V. **Erythrocyte membrane composition in pregnancy-induced hypertension: evidence for an altered lipid profile.** *Brith J Obstet Gynaecol* 1992, 99: 503-507.
208. Nelson G in: **Blood lipids and lipoproteins: Quantitation, composition and metabolism.** Nelson G (ed) 1972 Willey, NY 317-386.
209. Gottlieb MH. **Rates of cholesterol exchange between human erythrocytes and plasma lipoproteins.** *Biochim Biophys Acta* 1980, 600: 530-538.
210. Vakakis N, Redgrave TG, Small D, Castelli WP. **Cholesterol content of red blood cells and low-density lipoproteins in hypertriglyceridemia.** *Biochem Biophys Acta* 1983, 751: 280-285.
211. Proença Mc, Ribeiro HM, Nogueira JB, Segurado MD, Nogueira da Costa J, Martins e Silva J. **Microviscosity of erythrocyted membrane in hypertensive patients.** *Acta Med Portuguesa* 1983, 4: 79.
212. Caimi G, Contorno A, Serra A, Presti R. **Red cell membrane dynamic properties and erythrocyte metabolic parameters in essential hypertension: preliminary reports.** *Microcirc Endoth Lymphatics* 1991, 7: 245-255.
213. Mazeaud MM, Driss F, Simon A, Devynck Ma. **Biochemical and functional alterations associated with hypercholesterolemia in platelets from hypertensive patients.** *Atherosclerosis* 1992, 94(2-3): 201-211.
214. Rillaerts EG, Engelman GJ, Van Camp KM, Ivo de Leeuw A. **Effect of omega-3 fatty acids in diet of type I diabetic subjects on lipid values and hemorheological parameters .** *Diabetes* 1989, 38: 1412-1416.
215. Glatz FC, Soffers AE, Katan MB. **Fatty acid composition of serum cholesteryl esters and erythrocyte membranes as indicators of linoleic acid intake in man.** *Am J Clin Nutr* 1989, 49: 269-267.
-
-

-
-
216. Bordoni A, Biagy PL, Castelli G et al. Effects of hyperlipidic diet on lipid composition, fluidity and Na-K ATPase activity of rat erythrocyte membranes. *Membr Biochem* 1989, 8(1): 11-18.
217. Pelikanova T, Kohout M, Hilgertova J, Base J, Farska I, Valek J. Erythrocyte insulin receptor characteristics and erythrocyte membrane lipid composition in healthy men. *Physiol Bohemoslov* 1989, 38(5): 419-425.
218. Berkman M. The relation between insulin sensitivity and fatty acid composition of skeletal- muscle phospholipids. *New Eng Journal of Medicine* 1993, 28: 2230-2235.
219. Macleod DC, Heagerty AM, Bud SJ, Lawal TD, Riemersma RA. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on contraction and relaxation of rat femoral resistance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994, 23(1): 92-98.
220. Orlov SN, Postnov I, Pokudin NI, Kurharenko VY, Postnov YV. Na-K exchange and other ion transport systems in erythrocytes of spontaneously hypertensive rats: a comparative analysis. *J Hypertens* 1989; 7: 781-788.
221. Livne H, Balfe JW, Veitch R, Marquez-Julio J, Grinstein S, Rothstein A. Increased platelet Na-K exchange rates in essential hypertension : application of a novel test. *Lancet* 1987; 1: 533-536.
222. Dudley CR. Evidence for abnormal Na-K antiport activity detected by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy in exercising skeletal muscle of patients with essential hypertension. *Clin Sci* 1990, 79: 491-497.
223. Von Euler VS. On the specific vasodilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals. *J Physiol (London)* 1963; 88: 213-234.
-
-

-
-
224. Kadowitz PJ, Chapnick BM, Feigen LP, Hyman A, Nelson PK. **Pulmonary and systemic vasodilator effects on the newly discovered prostaglandin PGI₂.** *J Appl Physiol* 1978; 45: 408-4132.
225. De Nucci G, Gryglewski RJ. **Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacilin from bovine aortic endothelial cells is coupled.** *Proc Natl Acad Sci.(USA)* 1988; 85: 2334-2338.
226. Lipton HL, Chapnick BM, Kadowith PJ. **Influence of prostaglandins on vasoconstrictor response in the hindquarters vascular bed of the cat.** *Prostaglandins and Med* 1981; 6: 183-202.
227. Dominguez J, Pitts TO, Brown T. **Prostaglandin E₂ and parathyroid hormone: comparisons of their actions on the rabbit proximal tubule.** *Kidney Int* 1984; 26: 404-410.
228. Stokes JB,. **Effect of PEE₂ on chloride transport across the rabbit thick ascending limb of Henle.** *J Clin Invest* 1979; 61: 495.
229. Stokes JB. **Inhibition of sodium transport by prostaglandin E₂ across the isolated, perfused rabbit collecting tubule.** *Prostaglandins* 1977; 22: 715
230. Quilley J, Quilley CP. **En Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management.** Raven Press Ltd. New York 1990.
231. Swales SD. **Functional disturbance of the cell membrane in hypertension.** *J Hypertens* 1990; 8(7): S203-S211.
232. Gulak PV, Orlov SN, Postnov YN. **Investigation of membrane proteins in rat erythrocytes in spontaneous hypertension by means of spin-label technique.** *J Hypertens* 1986;4: 313-317.
-
-

-
-
233. Bing RF, Heagerty AM, Thruston H, Swales JS. **Ion transport on hypertension: Are changes in the cell membrane responsible?** *Clin Sci* 1986; 71: 225-230.
234. Jackson PA, Morgan DB. **The relation between membrane cholesterol and phospholipids and sodium efflux in erythrocytes from healthy subjects and patients with chronic cholestasis.** *Clin Sci* 1982; 62: 101-107.
235. Ruiz-Gutierrez V, Stiefel P, García-Donas MA. **Fatty acid composition of cell membrane and its relationship with sodium transport systems and parameters of monitoring control in insulin dependent diabetic patients.** *J Hypertens* 1992, 10(4):84.
236. Lijnen P, Celis H, Fagard R, Staessen J, Amery A. **Influence of cholesterol lowering on plasma membrane lipids and cationic transport systems.** *J of Hypertens* 1994; 12: 59-64.
237. Davis JE. **Synvastatin and intracellular pH regulation by the Na/H antiport of SV 40 virus transformed human MRC5 fibroblasts.** *Clin Sci* 1993; 84: 633-643.
238. Weder AB, Serr C, Torretti BA, Bassett DR, Weiffer AJ. **Effects of lovastatin treatment on red blood cell and platelet cation transport.** *Hypertension* 1991; 17: 203-209.
239. Shohet SB. **Medical progress: haemodialysis and changes in erythrocyte membrane lipids.** *N Engl J Med* 1972; 286: 577-579.
240. Cooper RA. **Membrane cholesterol. Is enough too much?** *N Engl J Med* 1980; 302: 49-51.
241. Liscum L, Faust JR. **Compartmentation of cholesterol within the cell.** *Curr Opin Lipidol* 1994, 5: 221-226.
-
-

-
-
242. Lijnen P, Fagard R, Staessen J, Thijs L, Amery A. **Erythrocyte membrane lipids and cationic transport system in men.** *J Hypertes* 1992, 10: 1205-1211.
243. Lijnen P, Fenyresi A, Bex M, Bouillon R, Amery A. **Erythrocyte cation transport systems and membrane lipids in Insulin-dependent diabetics.** *Am J Of Hypertens* 1993, 6:763-770.
244. Lijnen P, Petrov V, Amery A. **Relationship between and membrane and plasma lipids in healty men.** *Am J Med Sciences* 1994, 307(1): 146-149.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal de Examen de las Escuelas de Graduados en el día de la fecha, para examinar a los alumnos de

D.ª Cristina Montaña Lopez

titulada Composición lipídica de la Membrana Enfofitaria y estudio de transporte iónico Transmembrana en lipidos vesículas artificiales

acordó otorgarle la calificación de apto con laud

Sevilla, 5 de Julio 1995

El Vocal,



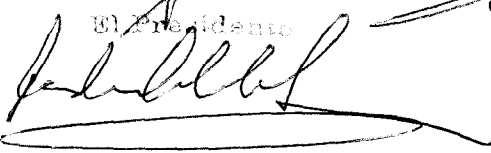
El Vocal,



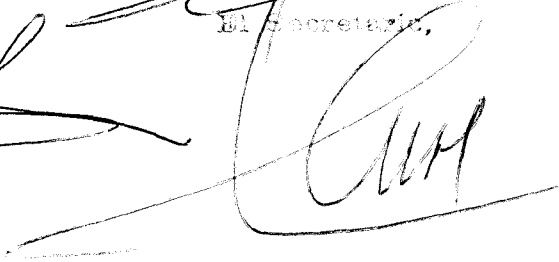
El Vocal,



El Presidente,



El Secretario,



El Doctorado,

