

ARTÍCULO ORIGINAL

Cuantificación del colesterol en glóbulos rojos de distintos tamaños. Valores obtenidos en personas con riesgo cardiovascular.

Chiari J.

Calle 154 N° 3935 1885 Plátanos, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: Chiari J.; josechisari@gmail.com.ar

Resumen

El glóbulo rojo humano es una célula incompleta. Entre los componentes mayoritarios de la bicapa lipídica está bien establecido que el colesterol juega un papel importante en las propiedades fisicoquímicas regulando su resistencia y fluidez. La incorporación de colesterol a la membrana plasmática afecta directamente sus propiedades reológicas. El objetivo del presente trabajo es analizar la influencia del volumen celular al cuantificar el colesterol proveniente de la membrana plasmática de los glóbulos rojos y establecer un parámetro independiente de medición y su relación con la población de riesgo cardiovascular y el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL). Para la determinación de colesterol en la membrana plasmática del glóbulo rojo, se utilizó el clásico método extractivo con alcohol éter y la posterior determinación del colesterol por el método enzimático. Los parámetros hematológicos se evaluaron en un contador hematológico y el C-HDL se obtuvo por precipitación selectiva con cloruro de magnesio y dextrán sulfato y posterior medición del colesterol en el sobrenadante. Los resultados obtenidos en los tres grupos: Control, Cardiología y Diabetes se exponen en una tabla. Para la cuantificación del colesterol en la membrana eritrocitaria se utilizaron dos expresiones: microgramos de colesterol por cada 10 millones de hematíes y microgramos de colesterol por cada 10 millones de hematíes por cada 90 fentolitros. La primera expresión mostró correlación lineal positiva con el volumen corpuscular medio. Ambos parámetros presentaron relación inversa con el C-HDL. La expresión microgramos de colesterol por cada 10 millones de hematíes es un parámetro dependiente del volumen corpuscular medio y como tal no puede explicar aumentos de colesterol, independientemente de las fluctuaciones del tamaño celular. Al incluir el volumen celular en los cálculos se obtuvo la expresión: microgramos de colesterol por cada 10 millones de hematíes por cada 90 fentolitros el cual es un parámetro independiente del volumen celular y se encontró aumentado en pacientes con riesgo cardiovascular asociado a C-HDL bajo.

Palabras clave: colesterol, tamaño del glóbulo rojo, cardiovascular, reología.

Abstract

Human red blood cells are incomplete cells. Based on their size, they can be classified into: macrocytes, normocytes and microcytes. Their plasma membrane is responsible for their morphology and elasticity and contributes to their deformability. Their rheological properties reflect their structure. They are flexible to access the smallest capillaries and adapt to the blood flow, and the incorporation of cholesterol to their plasma membrane directly affects their rheological properties. The aims of this study were to analyze the influence of cell volume to quantify the cholesterol from red blood cells and to establish an independent measurement parameter and its relation to patients with cardiovascular risk and HDL-C. To determine cholesterol in the plasma membrane of red blood cells, we used the classical extraction method with alcohol ether and subsequent determination of cholesterol by the enzymatic method. Haematological parameters were determined in a haematology analyser and serum HDL-C was determined by fractional precipitation with magnesium chloride and dextran sulfate. The amount of cholesterol in red blood cells was expressed both as micrograms of cholesterol per 10 million red blood cells and as micrograms of cholesterol per 10 million red blood cells for every 90 femtoliters, and grouped into three groups: control, heart and diabetes. Both parameters showed inverse relationship with HDL-cholesterol. The parameter micrograms of cholesterol per 10 million red blood cells depends on the mean corpuscular volume and it cannot explain increases in cholesterol, independently of variations in cell size. Including cell volume in calculations, the following was obtained: micrograms of cholesterol per 10 million red blood cells per every 90 femtoliter, which showed no correlation with cell volume and was increased in patients with high cardiovascular risk associated with low HDL-C levels.

Keywords: cholesterol, erythrocyte size, cardiovascular, rheological, red blood cell.

Introducción

El glóbulo rojo humano maduro es una célula que no posee núcleo ni sistemas de endomembranas. Cada célula está llena de hemoglobina, proteína soluble que se une y transporta casi todo el oxígeno de la sangre. Este tipo de célula es lo suficientemente flexible para pasar por los capilares más pequeños. Son incompletas, incapaces de reproducirse, sobreviven unos 120 días y su función principal es transportar hemoglobina, la cual está disuelta en concentración muy alta en el citosol.

La reología es la ciencia que estudia la respuesta de los fluidos complejos en términos de dos parámetros principales: esfuerzo y deformación (flujo). La sangre humana es un fluido de reología muy compleja, porque la viscosidad de la sangre no es proporcional al esfuerzo aplicado, es decir es un fluido no newtoniano que cuenta con características pseudoplásticas: cuanto mayor sea el esfuerzo aplicado, menor es su viscosidad. Ésta está determinada por la viscosidad plasmática y por la concentración celular, deformación y agregación de glóbulos rojos¹. La deformación de estos glóbulos es muy importante en la microcirculación, pues deben atravesar capilares con diámetro inferior al celular. Entre los factores que regulan la rigidez del glóbulo rojo están: su geometría (relación superficie / volumen), viscosidad interna (función de la hemoglobina) y las propiedades elásticas de la membrana celular¹.

Entre los componentes mayoritarios de la bicapa lipídica, está bien establecido que el colesterol juega un papel importante en las propiedades fisicoquímicas, regulando su resistencia y fluidez. La incorporación de colesterol en la membrana plasmática del glóbulo rojo afecta sus propiedades reológicas, traducándose en una reducción en la deformidad celular y un aumento en la fragilidad osmótica³.

En pacientes con esclerosis múltiple, la composición de lípidos de la membrana plasmática del glóbulo rojo resultó alterada y parece ser que dicha alteración junto con la fluidez de la membrana está influenciada por el estado inflamatorio⁴. En perros con una dieta a base de colesterol y aceite de coco, se observó un aumento en la relación colesterol / fosfolípidos del glóbulo rojo, con disminución de la fluidez de la membrana, alcanzando un máximo a las 12 semanas, en cambio el hematocrito declinó a partir de la sexta semana⁵.

El aumento de colesterol en la membrana plasmática del glóbulo rojo se correlaciona con el sexo, edad, presión arterial sistólica, diastólica, tabaquismo, hipertrigliceridemia, hiperfosfolipemia y alteraciones en el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL)⁶.

El colesterol libre es la forma predominante en la membrana plasmática del hematíe. Tanto el colesterol libre como el esterificado se incrementa en pacientes con angina estable crónica, en comparación con los que presentan síndrome coronario agudo. Estos hallazgos sugieren que la cantidad de colesterol en la membrana plasmática del hematíe es más importante que el tipo de colesterol presente en la membrana del eritrocito, lo que sería uno de los determinan-

tes de la progresión de la placa aterosclerótica⁷.

En niños con hipercolesterolemia familiar, pero sin lesión vascular detectable, la relación colesterol / fosfolípidos de la membrana plasmática del glóbulo rojo está aumentada con respecto al grupo control e inversamente relacionada con el C-HDL⁸. En adolescentes obesos se determinaron cambios en la composición lipídica del glóbulo rojo comparados con adolescentes de peso normal⁹.

En hipercolesterolemia, causa importante de enfermedad cardíaca coronaria, la membrana plasmática del glóbulo rojo se ve afectada, según estudios realizados en glóbulos rojos de ratas¹⁰.

Este trabajo tiene por objeto analizar cómo influye el volumen celular al cuantificar el colesterol en glóbulos rojos, obtener un parámetro de medida independiente y observar su relación frente al C-HDL sérico en pacientes con distinto riesgo cardiovascular.

Materiales y Métodos

Para el desarrollo del trabajo se comenzó por la toma de muestra sanguínea de cada persona por punción venosa, separándolas en tres grupos:

Controles: personas que en su historial de laboratorio no presentaban valores bajos de C-HDL y todos sus parámetros metabólicos dentro del rango normal y no estaban medicados.

Grupo cardiología: muestras sanguíneas de personas que ya tuvieron un episodio cardiovascular y que por su condición estaban medicados con hipocolesteremiantes y en su historial de laboratorio presentaban valores C-HDL menores a 40 mg/dl.

Grupo diabetes: muestras de personas que en su historial se encontraban glucemias de más de 170 mg/dl y hemoglobina glicosilada de más de 7 % y estaban medicadas con hipoglucemiantes.

Para determinar los parámetros hematológicos se utilizó un contador hematológico Mindray BC-3000. Se determinó el C-HDL por precipitación selectiva, empleando solución de cloruro de magnesio / sulfato de dextran (PM 50.000) provisto por Wiener Lab. Para el dosaje del colesterol de la membrana del glóbulo rojo se tomó una alícuota de 0,2 ml sangre entera, la que fue lavada cuatro veces con solución fisiológica, posteriormente el colesterol fue extraído con la mezcla extractante, que contiene un tensioactivo. Luego, se agitó vigorosamente, se dejó reposar, y después se centrifugó obteniendo un sobrenadante lípido del que se tomó una alícuota de 50 mililitros y se determinó el colesterol por reacción colorimétrica enzimática. Este método presentó un CV % de 11,7 %.

Análisis estadístico: para las correlaciones se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. En todos los casos los valores presentados corresponden a la media aritmética \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas entre las medias de las poblaciones de interés fueron analizadas mediante análisis de varianza paramétrico (ANOVA) y no paramétrico (Kruskal-Wallis); un valor $p < 0,05$ fue considerado significativamente diferente.

Resultados

Los resultados se exponen en la tabla I. Las columnas muestran los tres grupos: Control, Cardiología, y Diabetes. Mientras que las filas expresan: hematocrito en % (v / v), recuento de glóbulos rojos en millones por milímetro cúbico, volumen corpuscular medio en fl, las absorbancias del método de cuantificación de colesterol en glóbulos rojos, el C- HDL en mg/dl, microgramos de colesterol por cada 10 millones de glóbulos rojos (Col. Glo. Ro), microgramos de colesterol por cada 10 millones de glóbulos rojos por cada 90 fl (COL / VCM - 90).

Se observó, en general, una relación inversa entre el colesterol en la membrana plasmática del glóbulo rojo y el C-HDL (r = -0,27, p < 0,05). Además, el coeficiente de correlación entre Col. Glo. Ro y el volumen corpuscular medio fue 0,169 (p < 0,05).

Por otra parte, el colesterol en glóbulos rojos (COL / VCM-90) expresados en microgramos de colesterol cada 10 millones de glóbulos rojos por cada 90 fl muestra diferencias significativas al comparar los grupos de riesgo (Cardiología y Diabetes) con el grupo Control (p < 0,05).

Discusión

Distintos autores han demostrado aumento de colesterol en la membrana del glóbulo rojo por distintas patologías: obesidad⁹, estado inflamatorio en esclerosis múltiple⁴, hipertensión sistólica y diastólica disminución del C-HDL, edad, sexo⁶ y pacientes con padres con antecedentes cardiovasculares⁸. En estas patologías es habitual encontrar alteraciones en el tamaño celular. Estos autores no explicaron si dichos aumentos del colesterol en la membrana eritrocitaria se deben al aumento en el tamaño celular.

En este trabajo se discutió y se comprobó la importancia de definir un parámetro independiente, que no guarde relación lineal con el volumen corpuscular medio, ya que uno de los factores de aumento del tamaño células es el cardiovascular.

El glóbulo rojo maduro es incapaz de sintetizar lípidos, por tanto una variación de lípidos en su membrana debe ser por el intercambio de colesterol con el plasma y su concentración en la membrana plasmática puede disminuir por la

alimentación, fitoesteroles, que pueden incorporarse a la membrana plasmática o por el uso de estatinas¹¹. En cuanto a la aplicación COL / VCM - 90 como parámetro de riesgo cardiovascular, el aumento de colesterol en la membrana plasmática del glóbulo rojos afecta sus propiedades reológicas³ y la alteración de la reología sanguínea está considerada como factor de riesgo cardiovascular¹². Este parámetro coincidió con valores elevados en muestras con riesgo cardiovascular, aun cuando han mejorado su valor de C- HDL e independientemente de las fluctuaciones del tamaño celular.

En conclusión, existe relación inversa entre el colesterol en la membrana plasmática del glóbulo rojo y el C- HDL. La expresión Col.Glo.Ro es un parámetro dependiente del volumen corpuscular medio y, como tal, no puede explicar los aumentos de colesterol independientemente de las fluctuaciones en el tamaño celular.

Al incluir el volumen celular en los cálculos se obtuvo la expresión COL / VCM - 90, el cual es un parámetro independiente del volumen celular. Este parámetro se encontró aumentado en pacientes con riesgo cardiovascular asociado a bajo HDL.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Chien, Shu. Physiological and pathophysiological significance of hemorheology. En Clinical hemorheology. Pp. 125-164. Springer Netherlands, 1987.
- Gennaro AM, Luquita A, Rasia M. Comparison between internal microviscosity of low-density erythrocytes and the microviscosity of hemoglobin solutions: an electron paramagnetic resonance study. Biophys J. 1996;71(1):389-93.
- Dumas D, Didelon J, Humbert JC, Gigout T, Valverde JR, Rasia RJ, Stoltz JF. Influencia del colesterol en membrana sobre la deformidad y la fragilidad osmótica eritrocitaria. ABCL 1998;32(2):265-268.
- Hon GM, Hassan MS, van Rensburg SJ, Abel S, van Jaarsveld P, Erasmus RT, Matsha T. Red blood cell membrane fluidity in the etiology of multiple sclerosis. J Membr Biol. 2009;232(1-3):25-34.
- Cooper RA, Leslie MH, Knight D, Detweiler DK. Red cell

Tabla I. Parámetros evaluados.				
	Grupo Control (N=92)	Grupo Cardiología (N=16)	Grupo Diabetes(N=17)	p
Hematocrito (%)	41,2 ± 0,02	40,2 ± 0,05	40,2 ± 0,05	NS
Glóbulos rojos (x 10 ⁶ / mm ³)	4,51 ± 0.02	4,61 ± 0.025	4,70 ± 0.03	NS
VCM (fl.)	90,9 ± 0,2	91,9 ± 0.1	84,3 ± 0,1	NS
C-HDL (mg/dl)	56,71 ± 0.5	51,5 ± 0,12	46,8 ± 0,12	NS
Colesterol de glóbulos rojos (µg / 10 ⁷)	1,73 ± 0,01	2,03 ± 0,01	1,80 ± 0,01	NS
Colesterol / VCM-90 (µg / 10 ⁷ / 90 fl)	1,72 ± 0,01	1,99 ± 0,01	1,93 ± 0,01	0,002

► VCM, volumen corpuscular medio; C-HDL, colesterol de las lipoproteínas de alta densidad; NS, no significativo. colesterol.

- cholesterol enrichment and spur cell anemia in dogs fed a cholesterol-enriched atherogenic diet. *J Lipid Res.* 1980;21(8):1082-9.
6. Koblik T. [Cholesterol and phospholipid levels in erythrocyte membrane of patients with blood lipid disorders and hypertension]. *Przegl Lek.* 1990;47(11):750-5.
 7. Tziakas DN, Chalikias GK, Stakos D, Tentes IK, Chatzikyriakou SV, Mitrousi K, Kortsaris AX, Boudoulas H, Kaski JC. Cholesterol composition of erythrocyte membranes and its association with clinical presentation of coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2008;19(8):583-90.
 8. Martínez M, Vayá A, Gil L, Martí R, Dalmau J, Aznar J. The cholesterol/phospholipid ratio of the erythrocyte membrane in children with familial hypercholesterolemia. Its relationship with plasma lipids and red blood cell aggregability. *Clin Hemorheol Microcirc.* 1998;18(4):259-63.
 9. Perona JS, González-Jiménez E, Aguilar-Cordero MJ, Sureda A, Barceló F. Structural and compositional changes in erythrocyte membrane of obese compared to normal-weight adolescents. *J Membr Biol.* 2013;246(12):939-47.
 10. Sengupta A, Ghosh M. Effect of sterol esters on lipid composition and antioxidant status of erythrocyte membrane of hypercholesterolemic rats. *J Oleo Sci.* 2014;63(5):439-47.
 11. Tziakas DN, Chalikias GK, Stakos D, Tentes IK, Thomaidi A, Chatzikyriakou S, Mitrousi K, Kortsaris AX, Kaski JC, Boudoulas H, Konstantinides S. Statin use is associated with a significant reduction in cholesterol content of erythrocyte membranes. A novel pleiotropic effect? *Cardiovasc Drugs Ther.* 2009;23(6):471-80.
 12. Levenson J, Simón A. Reología sanguínea y riesgo Cardiovascular. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 2000;19(1):5-10.