

Depleción del adenosin trifosfato del hematíe en conejos con dieta aterogénica. Su correlación con el incremento del colesterol plasmático

MARIA P. NEUMAN¹, JOSE NEUMAN¹, HECTOR E. MOSSO², ALFREDO D'ORTENCIO³, SARA RODRIGUEZ², HORACIO VERONI¹, LUIS M. SCAVINI², LIC. JUAN M. NEUMAN¹

RESUMEN

En un estudio experimental con conejos sometidos a una dieta aterogénica se investigó la relación entre la hipercolesterolemia y la generación de anemias hemolíticas ya descritas en distintas especies, pero cuya etiopatogenia no estaba aclarada completamente. **Dos grupos de conejos** Nueva Zelanda, **A** y **B**, fueron alimentados con dietas suplementadas con 1 y 0,5 g de colesterol diario, respectivamente. Al cabo de 40 días, el grupo **A** mostró una disminución muy significativa ($p < 0,001$) del adenosin trifosfato de la membrana del hematíe (ATP) en comparación con el control: $0,16 \pm 0,13$ versus $1,09 \pm 0,32$ **mmol/L eritrocito (media \pm DE)**. **Durante evaluaciones periódicas en el grupo B, la disminución** se detectó a los 15 días y fue significativa respecto del valor basal a los 30 días ($p = 0,03$). El adenosin monofosfato eritrocitario tendió a aumentar al día 30 y el fósforo inorgánico plasmático no mostró variaciones. Graficando los valores del ATP eritrocitario de todos los conejos respecto de los niveles de colesterol plasmático se encontró una correlación inversa significativa ($r = -0,6$, $p = 0,001$). Estudios enzimáticos mostraron que la actividad de la piruvato quinasa del hematíe aumentó notablemente el día 30 respecto del valor basal ($p < 0,05$) y que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se redujo al día 15 sin significación estadística. Los valores más bajos del hematócrito y de la hemoglobina se obtuvieron a los niveles más altos del colesterol plasmático mientras que el volumen corpuscular medio se incrementó para alcanzar un pico el día 15. Se sugiere que la hipercolesterolemia, además de su conocido papel en la aterogénesis, provocaría alteraciones funcionales del hematíe con depleción del ATP y generación de anemia hemolítica. REV ARGENT CARDIOL 2002; 70: 194-200.

Palabras clave Adenosin trifosfato - Eritrocito - Dieta aterogénica - Hipercolesterolemia - Piruvato quinasa - Anemia hemolítica - Aterogénesis

INTRODUCCION

En algunos estudios experimentales en animales sometidos a dietas aterogénicas suplementadas con colesterol se registraron, además de lesiones arteriales, anemias hemolíticas (1-3) que se atribuyeron al enriquecimiento de colesterol de la membrana del hematíe con diferentes valores del índice colesterol/fosfolípidos o a la depleción del adenosin trifosfato

(ATP). (4-8) Cooper y colaboradores, (1) en perros alimentados con dieta hipercolesterolemica, observaron fluidez reducida y una morfología espiculada de la membrana del eritrocito que se asemejaba a la anemia hemolítica llamada "de células en espuela", lo cual vincularon al aumento del índice colesterol/fosfolípidos. Asimismo, Westerman y colaboradores (2) observaron las mismas anomalías en conejos con

Instituto Privado de Enfermedades Cardiovasculares

² Catedra de Medicina Nuclear

³ Instituto Angel Roffo, Facultad de Ciencias Médicas, UBA

Trabajo recibido para su publicación: 05/01/02. Aceptado: 06/06/02

Dirección para separates: Dra. María del Pilar Neuman IPEC, Ayacucho 685 - PB - (1026) Buenos Aires, Argentina. [E-mail: mpneuman@ipec.com.ar](mailto:mpneuman@ipec.com.ar)

dietas semejantes y en el estudio de algunas enzimas eritrocitarias encontraron elevacion de la actividad de la triosa-fosfato isomerasa (TPI) en solo dos animales de los seis estudiados. Desde que la formacion irregular del eritrocito se detectaba aun antes del aumento de la concentracion del colesterol de membrana y de la actividad de la TPI, concluyeron que este fenomeno estaria relacionado con otros cambios enzimaticos no determinados en ese experimento.

Por otro lado, algunos autores, en el mismo tipo de investigaciones, evaluaron el ATP como elemento esencial en la estructura morfologica y funcional del hematie y atribuyeron la generacion de anemias hemoliticas a su depletion (7,8) y otros encontraron aumentos de la lipoperoxidacion tanto en el eritrocito como en la aorta. (9-11)

El objetivo del presente estudio fue el de vincular, en un modelo de aterosclerosis experimental en conejos, cuyos resultados anatomopatologicos y lipidicos ya hemos publicado, (12) las modificaciones del ATP de la membrana del eritrocito con el aumento de la colesterolemia, la anemia hemolitica provocada y sus implicaciones en la aterogenesis.

La correlacion inversa progresiva entre la hipercolesterolemia plasmatica y el ATP globular, nuestro hallazgo esencial, ha ido teniendo explicaciones fisiopatologicas a traves del tiempo, aunque los procesos en la membrana globular no estan aclarados completamente y quedan pendientes nuevas investigaciones bioquimicas especificas.

MATERIAL Y METODOS

Una cepa de conejos blancos machos Nueva Zelanda, que pesaban entre 3 y 4 kg, enjaulados individualmente, recibieron dieta estandar (Cargill para conejos). En seis animales (grupo A), la dieta fue suplementada diariamente con 1% de colesterol durante 40 dias, al cabo de los cuales se determinó el contenido de ATP del hematie. El hallazgo de una disminucion significativa de los niveles de ATP eritrocitario en comparacion con un grupo control nos indujo a profundizar esta investigacion con otros seis conejos (grupo B) en los que se obtuvo un aumento progresivo de la colesterolemia con una dieta de 0,5 % de colesterol diario y en los que ademas se evaluaron, simultaneamente con las variaciones lipidicas en el transcurso de la dieta aterogenica, ATP, adenosin difosfato y monofosfato (ADP y AMP) y fosforo inorganico (PI) para determinar el consumo energetico. Para monitorear la generacion de ATP en el eritrocito se determine la actividad de dos enzimas: piruvato quinasa (PK), enzima clave en el catabolismo de la glucosa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) con el fin de objetivar la via de la glucosa monofosfato. Otros seis animales

se mantuvieron como control a lo largo del experimento (dos animales del grupo control murieron antes de finalizar el estudio).

Las muestras periodicas de sangre se obtuvieron por puncion de la vena marginal de la oreja de los animales, una parte fue anticoagulada con EDTA sodico (1 mg/ml) y el resto se coloco inmediatamente en 0,6 N (1/4 vol/vol) y 1,0 N (en partes iguales) de acido perclorico enfriado a hielo para las determinaciones de ATP y de ADP-AMP eritrocitario, respectivamente.

El recuento de los globulos rojos, los niveles del hematocrito y la concentracion de hemoglobina se determinaron por metodos estandares. Se centrifuge la sangre, se separaron el plasma y la capa de leucocitos y los globulos rojos se lavaron tres veces con solution salina. La actividad de la PK y de la G-6-PDH de los eritrocitos, el colesterol plasmatico, asf como los niveles de ATP, ADP y AMP en los extractos neutralizados con perclorato se determinaron enzimaticamente con los *kits* Boehringer Mannheim GmbH. El fosforo inorganico del plasma se midio de acuerdo con Fiske y Subarow, para lo cual se utilize el *kit* de Wiener Lab, Rosario, Argentina.

Analisis estadfstico

Para la evaluation de las diferencias de dos mediciones dentro de los grupos o entre grupos de animales se empleó la prueba de Student para datos apareados o no apareados, respectivamente. El analisis de la signification a dos colas de la correlacion se realice de acuerdo con la prueba de Spearman. Se considero significativa una $p < 0,05$.

RESULTADOS

El grupo de animales alimentados con la dieta de 1% de colesterol diario mostro al cabo de 40 dias una disminucion altamente significativa ($p < 0,001$) de la concentracion de ATP eritrocitario en comparacion con el grupo control de doce animales (Tabla 1).

En el grupo que comenzó con 0,5 % de colesterol diario se observe una reduccion progresiva del ATP del eritrocito que llego a ser significativa respecto

Tabla 1
Valores promedio del ATP eritrocitario en conejos con una dieta con 1% de colesterol en comparacion con controles

Dias de dieta	0	40
Numero de animales	12	6
	mg /dl	
Colesterol plasmatico	54,5	1.266
DE (\pm)	14,9	480
	mmol/L eritrocito	
ATP eritrocitario	1,09	0,16 ($p < 0,001$)
DE (\pm)	0,32	0,13

del valor basal ($p = 0,03$) y respecto del control del mismo día al cabo de 30 días ($p < 0,05$) cuando los niveles de colesterol plasmático alcanzaron un promedio de 648 ± 307 mg/dl. Las concentraciones del ADP no mostraron variaciones y el AMP eritrocitario se elevó a los 30 días de la dieta aterogénica, en relación con el valor basal, con una significación límite ($p = 0,09$) y significativa respecto del control del mismo día ($p = 0,05$) (Tabla 2). Los niveles plasmáticos de Pi permanecieron estables a lo largo del estudio: $6,1 \pm 1,7$, $5,7 \pm 1,7$ y $5,8 \pm 0,5$ (mg/dl \pm DE) a los 0, 15 y 30 días, respectivamente.

Graficando todos los valores de las concentraciones del ATP eritrocitario en diferentes periodos del experimento, en función de los niveles de colesterol plasmático, se encontró una correlación inversa elevada: $r = -0,6$, $p = 0,001$ (Figura 1).

A medida que la dieta de 0,5% de colesterol iba en progreso, la actividad de la enzima PK eritrocitaria aumentaba, para alcanzar una diferencia significativa en el día 30 ($p < 0,05$). La actividad de la G-6-PDH mostró una disminución no significativa en el día 15; esta actividad se elevó nuevamente al día 30 sin que llegara a alcanzar los niveles basales, pero permaneciendo en el rango control (Tabla 3).

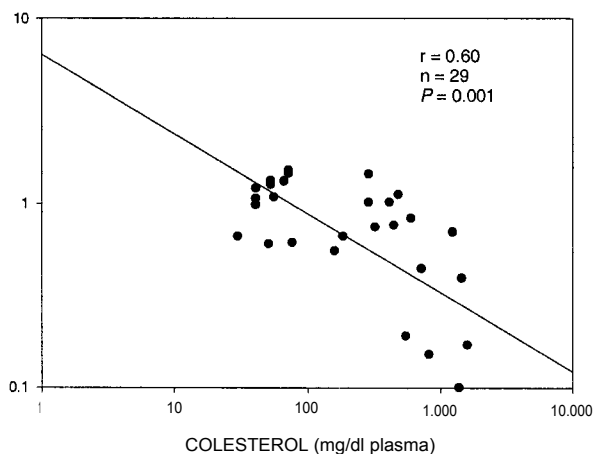


Fig. 1. Correlación entre los niveles de colesterol plasmático y el contenido de ATP eritrocitario en los conejos estudiados.

En cuanto al desarrollo de anemia hemolítica, se observó que la reducción mayor del hematocrito y de la concentración de hemoglobina coincidía cuando se alcanzaban los niveles más altos del colesterol plasmático. El volumen corpuscular medio (VCM) tendió a aumentar y alcanzó un pico en el día 15 (Tabla 4). En el grupo de conejos con la dieta de 1%

Tabla 2
Valores eritrocitarios del ATP, ADP y AMP en conejos en diferentes periodos de una dieta con 0,5% de colesterol

Días de dieta		0	15	30
		mg/L		
Colesterol plasmático	Experimental	$49 \pm 15^*$ (6)	249 ± 71 (5)	648 ± 307 (6)
	Control	60 ± 14 (6)	50 ± 9 (5)	54 ± 12 (4)
		mmol/L eritrocitos		
ATP	Experimental	$1,09 \pm 0,28$ (6)	$0,93 \pm 0,35$ (5)	$0,76 \pm 0,22^{** a}$ (6)
	Control	$1,09 \pm 0,39$ (6)	$1,09 \pm 0,23$ (4)	$1,10 \pm 0,24$ (4)
ADP	Experimental	$0,50 \pm 0,13$ (6)	$0,59 \pm 0,28$ (5)	$0,52 \pm 0,16$ (5)
	Control	$0,34 \pm 0,16$ (5)	$0,36 \pm 0,04$ (3)	$0,39 \pm 0,20$ (4)
AMP	Experimental	$0,03 \pm 0,01$ (6)	$0,03 \pm 0,03$ (4)	$0,09 \pm 0,05^{***}$ (6)
	Control	$0,03 \pm 0,02$ (5)	$0,04 \pm 0,02$ (3)	$0,03 \pm 0,03$ (4)

* Media \pm DE () Numero de animales. ** $p = 0,03$ versus día 0 (prueba de la t para datos apareados). * $p < 0,05$ versus controles del mismo día. † $p = 0,09$ versus día 0. $p = 0,05$ versus controles del mismo día.

Tabla 3
Valores de enzimas eritrocitarias en conejos en diferentes periodos de una dieta con 0,5% de colesterol

Dias	mU/10 ⁹ eritrocito			
	0	15	30	
Piruvato quinasa	Experimental	65 ± 16* (6)	82 ± 30 (4)	103 ± 24** (6)
	Control	69 ± 25 (5)	74 ± 8,9 (5)	72 ± 13 (4)
G-6-PDH	Experimental	156 ± 22 (6)	85 ± 32 (4)	126 ± 44 (6)
	Control	156 ± 10 (5)	132 ± 29 (3)	121 ± 34 (4)

* Media ± DS. () Numero de animales. ** p < 0,05 en comparacion con dia 0 (prueba de la t para dates apareados).

Abreviaturas: G-6-PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Tabla 4
Valores hematoldgicos en diferentes periodos de una dieta con 0,5% de colesterol

Dias				
	0	15	30	
Hematocrito (%)	Experimental	40 ± 1,9 (6)	37 ± 6,5 (4)	31 ± 3,5 (6)
	Control	40 ± 1,9 (6)	39 ± 0,8 (4)	39 ± 1,3 (4)
Volumen corpuscular (mm ³)	Experimental	67 ± 5,3 (6)	73 ± 7,5 (4)	69 ± 7,1 (6)
	Control	67 ± 3,2 (6)	66 ± 3,0 (4)	66 ± 5,0 (4)
Hemoglobina (g/L)	Experimental	12,8 ± 0,8 (6)	12 ± 1,5 (4)	10,2 ± 1,1 (6)
	Control	12,1 ± 0,4 (6)	12,4 ± 0,3 (4)	12,6 ± 0,3 (4)

de colesterol, el promedio del hematocrito llevo a bajar a 26 ± 2,9 % a los 40 dias de instituida.

DISCUSION

Nuestro modelo experimental documento la relacion inversa significativa del colesterol plasmatico y el contenido de ATP del eritrocito y corrobora la generacion de anemia hemolitica. Anteriormente, otros estudios de aterosclerosis experimental mediante el suplemento de colesterol en la dieta alimenticia de diversos animales (1-3) demostraron paralelamente lesiones aterosclerosas y enriquecimiento en colesterol de la membrana de los hematies y la aparicion de anemias hemoliticas. Tambien en seres hu-

manos se han descrito patologias similares en la enfermedad hepatica alcoholica, (13, 14) en personas expuestas cronicamente a fluoruros (15) y en colestasis intrahepatica progresiva. (16)

Es conocido el hecho de que tanto el ATP como la composicion y la organizacion de la bicapa lipidica de la membrana eritrocitaria estan implicados en la estructura y funcion normales del eritrocito. El primero mantiene la forma de disco biconcavo del eritrocito y su deplecion causa un aumento de la viscosidad sanguinea como consecuencia de un aumento de rigidez de la membrana que lo lleva a la perdida de la deformabilidad, (17) funcion esencial para su pasaje a traves de capilares de un diametro menor al

propio. Con estos procesos estan relacionadas reacciones dependientes del ATP, como la fosforilacion de la espectrina, la fosforilacion de los lipidos de membrana y el funcionamiento normal de las bombas de Na-K y de Ca. (18) En lo que hace a la composicion lipidica de la membrana, diversos estudios demostraron como sustancias anfipaticas intercaladas en un lado de la bicapa lipidica expandian su radio en relacion con el otro e inducian a evaginaciones o invaginaciones de ella. Relacionado con este fenomeno, Lange y colaboradores (6) encontraron que tanto la lisolecitina como el colesterol, dos anfipaticos naturales de los lipidos de membrana, modulaban la forma del eritrocito de una manera independiente. El enriquecimiento en colesterol afecta especialmente la fluidez de la membrana externa del eritrocito. (19) Estudios mas recientes encuentran que la sobrecarga de colesterol en la membrana inhibe la lisofosfatidilcolina aciltransferasa y por lo tanto la reparacion de los fosfolipidos oxidados de la membrana. (20)

Deplecion de ATP

En nuestro estudio, el contenido de ATP de los globulos rojos evidencio una reduccion significativa a medida que aumentaban los niveles del colesterol plasmatico. Este hecho podria deberse a dos causas: inhibicion de sintesis o aumento de consumo de ATP. Lo primero no concuerda con los datos encontrados, especialmente por el aumento significativo de la actividad de la PK en el transcurso del experimento. Dicha enzima es clave en el catabolismo de la glucosa, proceso generador de la produccion de ATP en una celula carente de mitocondrias como es el hematie y su aumento se deberia a un mecanismo compensatorio a su consumo. Mas aun, la activacion de la PK, unida a la tendencia a la disminucion de la actividad de la G-6-PDH encontrada, sugiere una activacion del camino metabólico de Embden Mejeroff a expensas del *shunt* de la hexosa monofosfato. Ademas, los niveles de ADP no variaron y los de AMP se incrementaron. Lo segundo, es decir, la deplecion del ATP, concuerda con nuestros resultados y otras experiencias halladas en la literatura.

Probables causas de la deplecion del ATP

Numerosos experimentos demostraron que en animales sometidos a dietas ricas en colesterol aumentaba la relacion colesterol/fosfolipidos de la membrana del eritrocito y se registraron cocientes que variaban de 1,21 a 1,40 en conejos controles y alimentados con una dieta de 0,2% de colesterol, respectivamente. (21) En estas condiciones se alteran funciones fundamentales de la membrana que dis-

minuyen su fluidez, como ya se ha mencionado, y que justifican la deplecion del ATP.

La actividad aumentada de la ATPasa seria una de las causas principales de la deplecion de ATP que se encuentra en estos experimentos, la cual no alcanza a ser contrarrestada por el incremento de la PK que se ha detectado. Asi, Farfas y colaboradores (22, 23) sugirieron que el colesterol modula la cooperatividad de la Na⁺, K⁺ - ATPasa en eritrocitos de rata y Alivisatos y colaboradores (24) encontraron que la actividad especifica de esta enzima aumentaba en la membrana plasmatica de celulas sinaptosomales de diversas especies y de seres humanos preincubadas durante 3 horas con colesterol. En la membrana del hematie enriquecida en colesterol se ha comprobado que entra mas sodio que en condiciones normales, (25) asi como el dano producido por radicales libres sobre el transporte del Na⁺ y el K⁺, (26) lo cual contribuiria a una actividad mayor de la bomba del Na⁺ con el consecuente consumo de ATP.

Por otra parte, recientemente se han puesto en evidencia nuevos procesos biologicos en los que el ATP desempeña un papel fundamental, como lo seria la respuesta defensiva al estres oxidativo con el empleo de bombas de transporte del glutation desde el interior hacia el exterior de diversas celulas, incluido el hematie. (27,28) Asi, se han identificado ciertas proteinas denominadas ABC ("*ATP-binding cassette*") que, ligadas al ATP, generan un sistema de transporte a traves de la membrana. Dado que a su vez se ha encontrado un incremento de lipoperoxidacion en conejos alimentados con colesterol, especialmente en la fraccion de la (3-VLDL), (29) este hecho podria vincularse con la disminucion de ATP eritrocitario registrado en el presente experimento. Este proceso, que constituye una defensa contra el estres oxidativo, requiere la energia procedente de la degradacion del ATP provocada por la ATPasa.

A su vez, la tendencia a la disminucion de la G-6-PDH encontrada en nuestro experimento contribuiria a disminuir las defensas del hematie hacia el estres oxidativo, desde que se ha comprobado que defectos hereditarios en el *shunt* de la hexosa monofosfato provocan una reduccion en la regeneracion del glutation reducido. La disminucion de las defensas antioxidantes puede ser una causa de crisis hemoliticas agudas ante situaciones de estres oxidativo y esta patologfa se ha investigado en animales relacionandola con infecciones, parasitosis, toxinas, reacciones idiosincrasicas o cautiverio. (30)

Nuevas teorfas acerca de la importancia del eritrocito como regulador del tono vascular en la microcirculacion le asignan a este, ademas de ser el mayor transportador de O₂, el papel de sensor de la

provision del O₂ hacia los tejidos, a través de la secreción de ATP, el cual a su vez se liga a receptores específicos e induce la expresión de óxido nítrico (NO) y por lo tanto provoca vasodilatación. (31) Sprague y colaboradores (32) encontraron que, en respuesta a una deformación mecánica, los eritrocitos humanos y de conejo liberaban ATP y determinaron experimentalmente la contribución de este ATP a la síntesis de NO y regulación de la resistencia vascular pulmonar. La membrana del hematocito enriquecida en colesterol en nuestro experimento aumenta su rigidez y, por lo tanto, pierde su capacidad de deformabilidad al pasar por capilares de diámetro menor al propio, con lo cual se generan anemia hemolítica y depleción de ATP, que a su vez podrían provocar disfunción endotelial.

CONCLUSIONES

En el presente experimento con conejos alimentados con una dieta aterogénica se encontró una correlación inversa muy significativa entre el aumento del colesterol plasmático y el contenido de ATP del hematocito. Desde que no se registró inhibición de la síntesis del ATP eritrocitario, evidenciado por un aumento significativo de la PK y una tendencia a la disminución de la G-6-PDH como proceso compensatorio, se sugiere que la hipercolesterolemia puede ser causante de la depleción del ATP y, por lo tanto, de la anemia hemolítica registrada. Estos resultados experimentales involucran al exceso de colesterol plasmático con alteraciones de funciones fundamentales del hematocito respecto del endotelio vascular, además de su reconocido papel en la génesis de la placa ateromatosa en la pared arterial.

SUMMARY

ATP DEPLETION IN RED BLOOD CELLS OF RABBITS FED WITH AN ATHEROGENIC DIET

In an experimental study with rabbits fed with an atherogenic diet, the relation between hypercholesterolemia and the generation of a hemolytic anemia has been investigated. Although this process has been described in different species its etiology is not completely understood. Two groups of rabbits (A y B) were fed with a diet supplemented with 1.0 and 0.5% of cholesterol, respectively. After 40 days of cholesterol feeding the group A showed a significant decrease ($p < 0.001$) of the membrane erythrocyte adenosinetri-phosphate (eATP) compared with the control group: 0.16 ± 0.13 vs 1.09 ± 0.32 **mmol/L (mean \pm SD)**. During periodic evaluations in the group B, eATP decrease was de-

tected at day 15, being significant at day 30 ($p < 0.05$). Erythrocyte adenosine monophosphate tended to increase at day 30 and plasma inorganic phosphorus did not show variations. Plotting eATP against plasma cholesterol levels, a significant inverse correlation was found ($r = -0.6$, $p = 0.001$). Enzymatic studies showed that erythrocyte pyruvate kinase increased significantly at day 30 ($p < 0.05$) and glucose-6-phosphate dehydrogenase decreased without statistical significance at day 15. The lowest hematocrit and hemoglobin values were found at the highest cholesterol levels. The corpuscular volume increased, reaching a peak at day 15. It is suggested that hypercholesterolemia could be involved in erythrocyte dysfunctions that would generate eATP depletion and a hemolytic anemia, in addition to its well known role in atherogenesis.

Key words Adenosine triphosphate - Erythrocyte - Atherogenic diet - Hypercholesterolemia - Pyruvate kinase - Hemolytic anemia - Atherogenesis

BIBLIOGRAFIA

1. Cooper RA, Leslie MH, Knight D y col. Red cell cholesterol enrichment and spur cell anemia in dogs fed a cholesterol-enriched atherogenic diet. *J Lipid Res* 1980; 21: 1082-1089.
2. Westerman MP, Wiggans G 3^o, Mao R. Anemia and hypercholesterolemia in cholesterol-fed rabbits. *J Lab Clin Med* 1970; 75: 893-902.
3. Akahane K, Furuhashi K, Onodera T. Simultaneous occurrence of hypercholesterolemia and hemolytic anemia in rats fed cholesterol diet. *Life Sci* 1986; 39: 499-505.
4. Weed RI, LaCelle PL, Merrill EW y col. Metabolic dependence of red cell deformability. *J Clin Invest* 1969; 48: 795-809.
5. Cooper RA, Arner EC, Wiley JS y col. Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. *J Clin Invest* 1975; 55: 115-126.
6. Lange Y, Slayton JM. Interaction of cholesterol and lysophosphatidylcholine in determining red cell shape. *J Lipid Res* 1982; 23: 1121-1127.
7. Nakao M, Nakao T, Yamazoe S. Adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cells. *Nature* 1960; 187: 945-946.
8. Clark MR, Mohandas N, Feo C y col. Separate mechanisms of deformability loss in ATP-depleted and Ca-loaded erythrocytes. *J Clin Invest* 1981; 67: 531-539.
9. Chiu D, Kuypers F, Lubin B. Lipid peroxidation in human red cells. *Semin Hematol* 1989; 26: 257-276.
10. Kucuk C, Lis LJ, Dey T y col. The effects of cholesterol oxidation products in sickle and normal red blood cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1103: 296-302.
11. Heinle H, Liebich H. The influence of diet-induced hypercholesterolemia on the degree of oxidation of glutathione in rabbit aorta. *Atherosclerosis* 1980; 37: 637-640.
12. Neuman MP, Neuman J, Mosso HE y col. Evaluation of the high density lipoprotein cholesterol protective effect against atherogenesis in rabbits fed cholesterol supplemented diets. *Medicina (Buenos Aires)* 1990; 50: 343-350.
13. Wolf PL, Koett J. Hemolytic anemia in hepatic disease with decreased erythrocyte adenosine triphosphate. *Am J Clin*

- Pathol 1980; 73: 785-788.
14. Fossaluzza V, Rossi P. Flunarizine treatment for spur cell anemia. *Br J Haematol* 1983; 55: 715-717.
 15. Guminska M, Sterkowicz J. Biochemical changes in the blood of humans chronically exposed to fluorides. *Acta Med Pol* 1975; 16: 215-224.
 16. Balistreri WF, Leslie MH, Cooper RA. Increased cholesterol and decreased fluidity of red cell membranes (spur cell anemia) in progressive intrahepatic cholestasis. *Pediatrics* 1981; 67: 461-466.
 17. Shiga T, Maeda N, Suda T y col. Rheological and kinetic dysfunctions of the cholesterol-loaded, human erythrocytes. *Biorheology* 1979; 16: 363-369.
 18. Fairbanks G, Patel VP, Dino JE. Biochemistry of ATP-dependent red cell membrane shape change. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1981; 156: 139-144.
 19. Flamm M, Schachter D. Acanthocytosis and cholesterol enrichment decrease lipid fluidity of only the outer human erythrocyte membrane leaflet. *Nature* 1982; 298: 290-292.
 20. Allen DW, Manning N. Cholesterol-loading of membranes of normal erythrocytes inhibits phospholipid repair and arachidonoyl-CoA:l-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine acyl transferase. A model of spur cell anemia. *Blood* 1996; 87: 3489-3493.
 21. Beynen AC, Schouten JA, Popp-Snijders C. Compensatory changes in the lipid composition of the erythrocyte membrane. *Trends Biochem Sci* 1984; 9: 474.
 22. Farias RN, Bloj B, Morero RD y col. Regulation of allosteric membrane-bound enzymes through changes in membrane lipid composition. *Biochim Biophys Acta* 1975; 415:231-251.
 23. Farias RN. Membrane cooperative enzymes as a tool for the investigation of membrane structure and related phenomena. *Adv in Lipid Res* 1980; 17: 251-282.
 24. Alivisatos SG, Deliconstantinos G, Theodosiadis GP. Specificity of binding of cholesterol, steroid hormones and other compounds in synaptosomal plasma membranes, and their effect on ouabain-sensitive ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1981; 643: 650-658.
 25. Wells WW, Tsubone T. Enhanced Na-K-ATPase activity in erythrocyte ghosts from rabbits fed cholesterol. *Fed Proc* 1969; 28: 908 (abstract).
 26. Maridonneau I, Braquet P, Garay RP Na⁺ and K⁺ transport damage induced by oxygen free radicals in human red cell membranes. *J Biol Chem* 1983; 258: 3107-3113.
 27. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:951-965.
 28. Keppler D. Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic Biol & Med* 1999; 27: 985-991.
 29. Holvoet P, Collen D. Beta-VLDL hypercholesterolemia relative to LDL hypercholesterolemia is associated with higher levels of oxidized lipoproteins and a more rapid progression of coronary atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2376-2382.
 30. Paglia EP Acute episode hemolysis in the african black rhinoceros as an analogue of human glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Am J Hematol* 1993; 42: 36-45.
 31. Ellsworth ML, Forrester T, Ellis CG y col. The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am J Physiol* 1995;269 (Heart Circ Physiol 38): H2155-2161.
 32. Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Lonigro AJ. ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. *Am J Physiol* 1996; 271: H2717-H2722.