

ORIGINALES

Estudio electroforético de las proteínas de la membrana eritrocitaria de pacientes en hemodiálisis crónica

J. DIEZ *, B. ARRIZABALAGA **, J. FERNANDEZ **, A. SANCHEZ IBARROLA *, E. ROCHA ** y A. PURROY *.

* Servicio de Nefrología.

** Servicio de Hematología. Departamento de Medicina Interna. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona.

RESUMEN

Se estudia electroforéticamente la composición proteica de la membrana eritrocitaria de 10 pacientes en programa de hemodiálisis comparándola con la de 12 individuos control. Los resultados obtenidos muestran en el grupo de pacientes urémicos:

1. Presencia de una anomalía electroforética en una proteína de carácter estabilizante-estructural.
2. Significativos cambios cuantitativos en las proteínas con carácter enzimático-catalítico.
3. Ausencia de variaciones significativas en las proteínas con carácter receptor.

Se desconoce si estos hallazgos pudieran tener algún significado patogénico en la anemia de la insuficiencia renal crónica. Asimismo, tampoco es posible dilucidar actualmente si aquellos cambios se deben a la influencia de las toxinas urémicas sobre el hematíe o si obedecen a un problema de diseritropoyesis.

Palabras clave: Uremia. Proteínas membrana eritrocitaria. Electroforesis.

SUMMARY

Electrophoretic analysis of the erythrocyte membrane proteins was performed in twelve normals and ten patients on regular dialysis.

The main differences found were:

- 1) The presence in the uremic patients of an electrophoretic abnormality in a protein of stabilizing structural nature.
- 2) Significant quantitative changes in the proteins of enzymatic catalytic kind.
- 3) Normality of the receptor proteins.

The role of these abnormalities in the anemia of chronic renal insufficiency is not known. Whether those changes are due to the influence on the erythrocyte of some uremic toxins or caused by a disturbance of erithropoyesis is also ignored.

Key words: Uremia. Erythrocyte protein membrane. Electrophoresis.

INTRODUCCION

En pacientes con insuficiencia renal terminal la vida media eritrocitaria es un 50 % menor que en individuos sanos¹. Al parecer este aspecto hemolítico de la anemia de la uremia puede relacionarse con alteraciones en la estructura y en la función de los eritrocitos producidas por elevadas concentraciones de sustancias tóxicas existentes en el plasma²⁻⁶. Concretamente, se ha atribuido un papel hemolítico importante a los derivados guanidínicos

retenidos en el plasma de los pacientes urémicos⁷. Inclusive se ha podido investigar este efecto hemolítico del plasma urémico en experimentos con hematíes normales^{8,9}.

En el campo de la hemólisis de los pacientes urémicos es un hecho ya conocido la existencia de alteraciones de la membrana eritrocitaria¹⁰. Concretamente, se han descrito trastornos en la distribución de los lípidos membranaarios que se han relacionado con hemólisis ulterior^{11,12}. En lo que concierne a las proteínas de la membrana exis-

ten estudios sobre la ATP-asa que muestran su anómalo funcionamiento en los hematíes de los pacientes urémicos^{13,14}. Sin embargo, no existen aún datos en la literatura concernientes a la distribución proteica de las proteínas de la membrana eritrocitaria de pacientes con insuficiencia renal.

El objetivo del presente trabajo es aportar alguna información al respecto mediante la comparación de los patrones electroforéticos de las proteínas de la membrana eritrocitaria de un grupo de pacientes en hemodiálisis crónica con los patrones de un grupo de individuos control.

MATERIAL Y METODOS

Individuos

El estudio se ha realizado en un trupo de controles normales (n = 12) y en un grupo de pacientes en hemodiálisis periódica con anemia (n = 10), siendo ambos grupos homogéneos en cuanto a la edad y el sexo.

En el grupo de pacientes no se ha incluido ninguno cuya insuficiencia renal fuese el resultado de una enfermedad vasculomicroangiopática. Del mismo modo, ninguno había sido transfundido en los cuatro meses previos.

En el momento del estudio el tiempo promedio de permanencia en programa de hemodiálisis del grupo de pacientes era de $33,81 \pm 20,01$ meses, siendo su hemoglobina de 7,12 g/dl. (6,13 mmol/l.) y su creatininemia prediálisis de 12,8 mg/dl. (1.131,5 mmol/l.) como valores medios.

Método

La recogida de muestras se han realizado mediante punción venosa (que en el grupo de pacientes se ha efectuado previamente al inicio de la sesión de hemodiálisis).

Las muestras de sangre han sido recogidas en tubos siliconados sobre citrato sódico 3,8 g/dl. en la proporción 9:1, conservándose en nevera hasta el momento de realizar el estudio (tiempo nunca superior a las 3 horas).

La hemoglobina se ha determinado por espectrofotometría (Coulter-Counter) y la creatininemia mediante la reacción de Jaffé.

Para el estudio electroforético de las proteínas de la membrana eritrocitaria se ha utilizado la técnica de FAIRBANKS y COLS.¹⁵, modificada por nuestro laboratorio y básicamente consistente en:

— Centrifugación de las muestras (20 c.c. sangre venosa) a 1.500 revoluciones por minuto durante 5 minutos, liberándose ulteriormente el botón de hematíes de la capa superficial de leucocitos y plaquetas.

— Lavado por tres veces de los hematíes en tampón fosfato (buffer fosfato 5 mM, pH 8, 150 mM ClNa).

— Los hematíes así obtenidos se resuspenden en 100 c.c. de tampón fosfato (5 mM, pH 8), siendo agitados durante 60 minutos a 4° C hasta conseguir su lisis completa (sombras eritrocitarias).

— Los hematíes lisados se centrifugan a $25.000 \times g$. durante 20 minutos a 0-4° C. Esta operación, rechazando el sobrenadante, se realiza dos veces. Finalizándose con una última centrifugación a $50.000 \times g$. durante 30 minutos. De esta forma se obtiene un «paquete» de sombras eritrocitarias cuya concentración proteica es de 3-4 mg/c.c.

— A continuación se procede a la electroforesis sobre gel de poliacrilamida en sodio-duodecil sulfato (SDS-PAGE) a una concentración de 7,5 g/dl.

— Una vez realizada la electroforesis y previa extracción de los geles se procede a su tinción. Para el estudio de proteínas se emplea la tinción de azul de Coomassie R-60 al 0,025 %. Para el estudio de glicoproteínas la tinción empleada ha sido el ácido periódico de Schiff (Figs. 1 y 2).

— Tras la tinción, los geles se someten a densitometría para la evaluación de las bandas proteicas y a una longitud de onda de 560 nm. El densitómetro utilizado fue un modelo Beckman R.112. De esta forma se obtienen unos densitogramas en los que se distinguen las diferentes curvas correspondientes a las distintas bandas proteicas electroforéticas (Figs. 1 y 2). Sobre dichas curvas se efectuarán los estudios cualitativos (morfología de las curvas correspondientes a las distintas bandas) y cuantitativos (valoración del área correspondiente a cada curva).

Cálculos estadísticos

Para el análisis cuantitativo se han usado como referencia los resultados del grupo de controles, empleándose para la valoración estadística el test de Student.

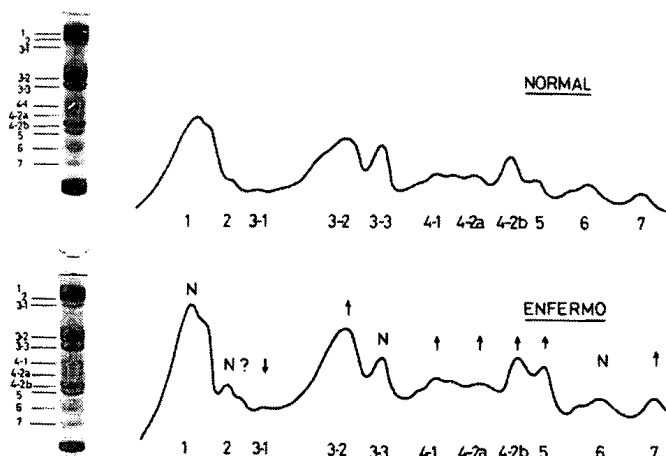


Fig. 1.—Tinción de proteínas. A la izquierda, los geles tras la electroforesis. A la derecha, los densitogramas correspondientes.

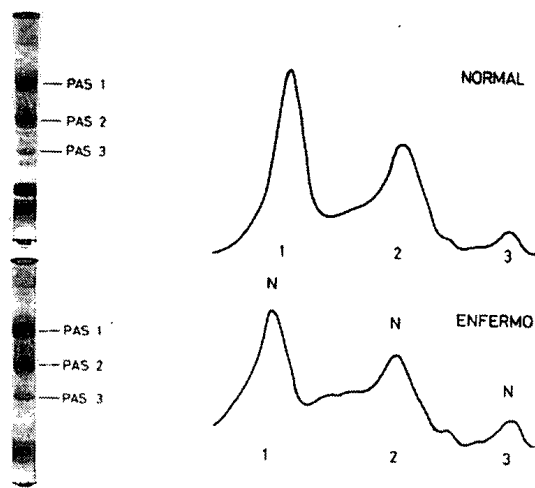


Fig. 2.—Tinción de glicoproteínas. A la izquierda, los geles tras la electroforesis. A la derecha, los densitogramas correspondientes.

TABLA I

RESULTADOS OBTENIDOS TRAS EL ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS DENSITOGRAMAS CORRESPONDIENTES A LA TINCION PARA PROTEINAS

Bandas	Controles		Pacientes		t	p	Valoración cuantitativa
	x %	± s	y %	± s			
1	23,38	3,47	20,77	3,84	1,67	> 0,05	N
Banda anómala	—	—	2,50	0,44	—	—	—
2	3,86	0,59	4,26	0,76	0,79	> 0,05	N
3-1	3,88	1	2,84	0,77	2,70	< 0,02	↓
3-2	19,02	1,52	23,07	6,07	2,15	< 0,05	↑
3-3	6,67	0,62	6,68	0,66	0,05	> 0,05	N
4-1	7,83	1,38	10,26	1,97	3,39	< 0,005	↑
4-2a	4,33	0,65	5,49	0,51	5	< 0,001	↑
4-2b	4,88	0,67	6,15	1,12	3,29	< 0,005	↑
5	2,78	0,46	4,07	0,79	4,76	< 0,001	↑
6	3,99	1,29	4,90	1,77	1,39	> 0,05	N
7	2,60	0,69	3,81	1,41	2,63	< 0,02	↑

x %, y % 004 Porcentaje del área total. s = Desviación estándar. t = t de Student. P = Probabilidad estadística. N = Sin cambio estadísticamente significativos. ↑ = Aumento estadísticamente significativo. ↓ = Disminución estadísticamente significativa.

TABLA II

RESULTADOS OBTENIDOS TRAS EL ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS DENSITOGRAMAS CORRESPONDIENTES A LA TINCION PARA GLICOPROTEINAS

Bandas	Controles		Pacientes		t	P	Valoración cuantitativa
	x %	± s	y %	± s			
1	5,2	1,35	7,06	1,99	1,12	> 0,05	N
2	45,48	2,30	45,49	2,70	0,002	> 0,05	N
3	49,40	1,84	47,65	3,35	0,31	> 0,05	N

x %, y % = Porcentaje del área total. s = Desviación estándar. t = t de Student. P = Probabilidad estadística. N = Sin cambios estadísticamente significativos.

RESULTADOS

DISCUSION

La tabla I muestra los resultados obtenidos al estudiar los densitogramas correspondientes a la tinción para proteínas. Se observan dos tipos de cambios:

Cualitativamente se aprecia en el grupo de pacientes la aparición de una banda anómala, de origen dudoso, no presente en los densitogramas del grupo de controles, y con un área correspondiente al $2,50 \pm 0,44$ % del área total del densitograma.

Desde el punto de vista cuantitativo se aprecia un aumento significativo ($p < 0,05$) de la cuantía de las áreas correspondientes a las bandas 3-2, 4-1 4-2a, 4-2b, 5 y 7. Por el contrario, la banda 3-1 muestra una disminución significativa ($p < 0,05$) de la cuantía de su área. Las bandas 1, 3-3 y 6 no muestran cambios significativos ($p > 0,05$).

En la tabla II se recogen los resultados obtenidos en los densitogramas correspondientes a la tinción para glicoproteínas. No se observan cambios cualitativos ni cuantitativos de interés.

Es bien sabido que la vida media eritrocitaria en los pacientes con IRC es aproximadamente el 50 % de la vida media normal¹. Se piensa que tal efecto es consecuencia de la incidencia de toxinas urémicas, no bien conocidas, sobre el hematíe¹⁶. Aún cuando se han descrito cambios en la distribución de los lípidos de la membrana que podrían explicar la hemólisis de la uremia^{11,12}, se desconoce todavía cuál es la distribución proteica de la membrana eritrocitaria de pacientes urémicos.

Con el fin de estudiar este último aspecto se analizan en este trabajo las posibles modificaciones electroforéticas que podrían producirse en la composición proteica de la membrana eritrocitaria de pacientes en hemodiálisis crónica.

Desde el punto de vista funcional, se describen tres tipos distintos de proteínas en la membrana del hematíe¹⁷:

1. Glicoproteínas con función receptora o de contacto.

2. Proteínas encargadas de dar soporte o estabilizar la estructura de la membrana.

3. Proteínas involucradas en funciones catalíticas.

La electroforesis permite diferenciar tres bandas glicoproteicas, designadas como PAS-1, 2 y 3 que corresponderían a sialoglicopéptidos distintos a los que se atribuyen unos pesos moleculares respectivos de 83.000, 45.000 y 25.000 daltons¹⁵. Los datos disponibles permiten afirmar que la configuración de las tres glicoproteínas es transmembranaria y que en conjunto no representan más del 30 % del contenido total de proteínas de la membrana eritrocitaria¹⁸. Su función sería la de actuar como moléculas de contacto, mediadoras de la interacción de la célula con su entorno¹⁷. Los datos obtenidos en este estudio no permiten apreciar cambios significativos en las bandas glicoproteicas de los hematíes de pacientes urémicos.

Actualmente se admite que al menos seis polipéptidos de la membrana eritrocitaria desempeñan algún papel confiriéndole estabilidad estructural. Se trataría de las proteínas correspondientes a las bandas electroforéticas 1, 2, 4-1, 4-2a, 4-2b y 5¹⁷.

Las bandas 1 y 2 constituyen la llamada espectrina. Se le atribuye un Pm de 250.000 daltons y supone el 20-25 % del total de proteínas de la membrana del hematíe¹⁵. Se orienta hacia la superficie citoplasmática de la membrana¹⁷.

Los hematíes de los pacientes urémicos estudiados muestran una anomalía densitométrica de la banda 2 de difícil valoración. No parece posible que se trate de una banda nueva, dado que resulta difícil admitir que la uremia pueda comportar la síntesis de una nueva proteína por los proeritroblastos. Sería factible pensar en un artefacto densitométrico, aunque su presencia constante en los 10 pacientes estudiados desaconseja esta posible explicación. Más probable, sin embargo, es que teniendo en cuenta que se reconoce actualmente que la espectrina se halla compuesta por 12-15 subfracciones proteicas distinguibles por su punto isoeléctrico¹⁹, la anomalía de la banda 2 constatada en este estudio representase una disociación de alguna de estas subfracciones que por efecto de una posible carbamilación, relacionable con toxinas urémicas (urea) adquiriese una mayor movilidad electroforética.

Las bandas 4-1, 4-2a y 4-2b corresponden a proteínas con pesos moleculares teóricos entre 50.000 y 80.000 daltons, orientadas hacia la superficie citoplasmática y con una distribución correspondiente al 10-15 % del total de las proteínas de la membrana¹⁷. Diversos estudios apoyan la idea de que la espectrina se fijaría a estas bandas que le servirían entonces a modo de soporte^{20,21}.

En el presente estudio se ha encontrado un aumento significativo del área correspondiente a las bandas 4-1, 4-2a y 4-2b. Que tal aumento pudiera comportar una anómala interrelación con la espectrina y una deficitaria fijación de ésta a la membrana eritrocitaria es algo aún

no aclarado y que podría relacionarse con una defectuosa estabilidad de la membrana.

La banda 5 corresponde a una proteína con un Pm admitido de 50.000, emplazada en la superficie citoplasmática de la membrana y que corresponde al 5 % del contenido proteico total de la misma¹⁷. Según algunos autores, podría tratarse de una proteína que participaría en la regulación de los procesos energéticos que mantienen la forma del hematíe¹⁵.

En los pacientes urémicos estudiados se ha encontrado un aumento significativo de esta banda sin que se conozca su significación.

Cinco son las bandas que electroforéticamente se corresponden con las proteínas de carácter enzimático-catalítico-transportador. Se trata de las bandas 3-1, 3-2, 3-3, 6 y 7¹⁷.

Las bandas 3-1, 3-2 y 3-3, cuyo Pm sería de 90.000 daltons aproximadamente, muestran una orientación transmembranaria y representan el 30 % de todas las proteínas de la membrana. Las evidencias disponibles favorecen la idea de que los tres polipéptidos de la banda 3 median movimientos aniónicos entre el interior y el exterior del hematíe²².

Aunque en este estudio la banda 3-1 se ha hallado disminuida, la banda 3-2 incrementada y la banda 3-3 sin cambios significativos, en conjunto los resultados obtenidos muestran un déficit significativo de este complejo enzimático en la membrana de los pacientes urémicos. Que este hecho traduzca posibles cambios en la concentración aniónica intraglobular que pudieran interferir desfavorablemente con la resistencia osmótica del hematíe y con otros procesos metabólicos intracelulares es algo por aclarar todavía.

A la banda 7 se le atribuye un Pm aproximado de 30.000, está emplazada en la superficie citoplasmática de la membrana, constituye el 5 % de las proteínas membranarias y se comporta enzimáticamente como una gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa²³.

En los pacientes estudiados se ha objetivado un incremento significativo de esta proteína. No hay datos disponibles para interpretar la significación que pudiera tener el hecho de que existan tasas elevadas de una enzima que participa en la glicólisis del eritrocito, si bien con el acortamiento de la vida media eritrocitaria observado en la uremia es posible observar el simple incremento de aquellas enzimas particularmente inestables.

La banda 6 es otra proteína que opera como una gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa. Su peso molecular aproximado parece ser de 35.000 daltons, representa el 50 % de todas las proteínas de la membrana y se halla en su vertiente citoplasmática¹³.

No se ha encontrado ningún cambio significativo de esta banda en los pacientes estudiados.

En conclusión: se describen los cambios hallados en la distribución de las proteínas de la membrana eritrocitaria de pacientes en hemodiálisis crónica. En conjunto, los datos disponibles permiten argumentar que en la membra-

na eritrocitaria de pacientes en hemodiálisis se pueden encontrar alteraciones de su distribución proteica que podrían hacer el hematíe más susceptible de sufrir hemólisis ulterior. Estudios posteriores de nuestro laboratorio con pacientes trasplantados con buena función renal y en los cuales se normalizan la casi totalidad de aquellas alteraciones permiten valorar el plasma urémico como posible origen de los cambios descritos²⁴.

BIBLIOGRAFIA

1. ESCHBACH, J. W.; FUNK, D., y ADAMSON, J.: «Erythropoiesis in patients with renal failure undergoing chronic dialysis». *New Eng. J. Med.*, 276: 653, 1967.
2. JACOB, H. S.; YAWATA, Y., y HOWE, R.: «Red cell hexosemonophosphate shunt deficiency in uremia». En: *Hemoglobin and red cell function*. Brewer Ed. Plenum Press. New York, 1977, pág. 133.
3. MITCHELL, T. R.: «Treatment of blood disorders in renal disease and renal failure». *Br. Med. J.*, 2: 174, 1977.
4. RAICH, P. C.; RODRIGUEZ, J. M.; DESAI, J. N., y SHAHIDI, N. T.: «Effect of hemodialysis on erythrocyte 2, 3-diphosphoglucerate in patients with uremia». *Am. J. Med. Sci.*, 265: 147, 1973.
5. ZUCKER, S.; LYSIK, R. M., y MOHAMMED, G.: «Erythropoiesis in chronic renal disease». *J. Lab. Clin. Med.*, 88: 528, 1976.
6. RODRIGUEZ-CORRES, J. L.; TABERNERO, J. M.; MARTIN-VASALLO, R.; CASTRO, S., y BATTANER, E.: «Metabolism of red blood cells in chronic renal failure I. Glycolytic enzyme levels». *Nephron*, 24: 21, 1979.
7. GIOVANETTI, S.; BALESTRI, P. L., y BARSOTTI, G.: «Methylguanidine in uraemia». *Arch. Int. Med.*, 131: 709, 1973.
8. ADAMSONS, J. W.; ESCHBACH, J., y FINCH, C. A.: «The kidney and erythropoiesis». *Am. J. Med.*, 44: 725, 1968.
9. DESFORGES, J. E., y DAWSON, J. D.: «The anemia of renal failure». *Ann. Intern. Med.*, 101: 326, 1958.
10. ERSLEU, A. J.: «Anemia of chronic renal failure». En: *Hematology*. Williams, Beutler y Erslev Eds. McGraw-Hill. New York, 1977, pág. 288.
11. BAKER, M. O., y BRIN, M.: «Mechanism of lipid peroxidation in erythrocytes of vitamin E-deficient rats and in phospholipid model systems». *Archs. Biochem. Biophys.*, 166: 32, 1975.
12. BROWNLEE, N. R.; HUNTTNER, J. M.; PANGANAMALA, R. U., y CONWELL, D. G.: «Role of vitamin E in glutathione-induced oxidant stress: Methemoglobin, lipid peroxidation and hemolysis». *J. Lipid. Res.*, 18: 635, 1977.
13. FRANCAVILLA, A.; ALBANO, O.; MASTRANGELO, F.; CARATELLI, P.; PALASCIANO, G., y AMERIO, A.: «Erythrocyte membrane ATP-ase in patients with acute or chronic renal disease». *Clin. Chim. Acta.*, 37: 298, 1972.
14. COLE, C. H.: «Decreased ouabaine-sensitive adenosine triphosphatase activity in the erythrocyte membrane of patients with chronic renal disease». *Clin. Sci.*, 45: 775, 1973.
15. FAIRBANKS, G.; STECK, T. L., y WALLECH, D. F. H.: «Electrophoretic analysis of the major polipeptides of the human erythrocyte membrane». *Biochemistry*, 10: 2606, 1971.
16. VIVES, J. L.: «El componente hemolítico en la anemia del paciente renal». *Sangre*, 25: 676, 1980.
17. MARCHESI, V. T.: «Functional proteins of the human red blood cell membrane». *Seminars in Hematology*, 16: 3, 1979.
18. BRETSCHER, M. S.: «Major human erythrocyte glycoprotein spans the cell membrane». *Nature*, 231: 229, 1971.
19. BOIVIN, P., y GALAND, C.: «Isoelectric focusing of spectrin components in hereditary spherocytosis». *Clin. Chim. Acta*, 71: 165, 1976.
20. LIU, S. M.; FAIRBANKS, G., y PALEK, J.: «Spontaneous reversible protein cross-linking in the human erythrocyte membrane. Temperature and pH dependence». *Biochemistry*, 16: 4066, 1977.
21. LORAND, L.; WEISSMAN, L. B., y EPEL, D. L.: «Role of the intrinsic transglutaminase in the Ca²⁺ mediated cross-linking of erythrocyte proteins». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 4479, 1976.
22. CABANTCHICK, Z. I., y ROTHSTEIN, A.: «Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells». *J. Membrane Biol.*, 15: 227, 1974.
23. STELT, T. L.: «Cross-linking the major proteins of the isolated erythrocyte membrane». *J. Mol. Biol.*, 66: 295, 1972.
24. DIEZ, J.; FERNANDEZ, J.; ARRIZABALAGA, B.; ROCHA, E., y PUJROY, A.: «Electrophoretic analysis of the proteins of the erythrocyte membrane: comparison between patients on regular dialysis and patients with functioning transplanted kidney (en prensa).