

Anomalías en la composición proteica de la membrana eritrocitaria de pacientes portadores de un injerto renal

J. DIEZ *, B. ARRIZABALAGA ** (1), J. FERNANDEZ **, E. ROCHA ** y A. PURROY *.

* Servicio de Nefrología.

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

RESUMEN

Se estudia electroforéticamente la composición proteica de la membrana eritrocitaria de 10 pacientes portadores de un injerto renal normofuncionante comparándola con la de 20 individuos control. Dos tipos de alteraciones se objetivan en el grupo de trasplantados:

1. Un incremento significativo de la cuantía de una proteína fundamentalmente implicada en el transporte iónico transmembranario.
2. Una disminución significativa de la cuantía de una proteína cuya función no está bien tipificada.

Palabras clave: Proteínas membrana eritrocitaria. Electroforesis. Trasplante renal.

ALTERATIONS IN THE PROTEIN COMPOSITION OF THE ERITHROCYTE MEMBRANE IN TRANSPLANTED PATIENTS

SUMMARY

The protein composition of the erythrocyte membrane was studied in ten successful transplanted patients (mean haemoglobin > 11.8 mmol/l., mean creatinin < 123.76 μ mol/l.) and in twenty normal subjects.

The erythrocyte membrane proteins were solubilized with sodium dodecyl sulfate (SDS) and separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The gels were stained with Coomassie blue for proteins and Schiff reagent for glycoproteins. The electrophoretic bands were evaluated by densitometry.

The statistical analysis of the fractions showed:

1. A significant increase ($p < 0.001$) of a protein involved in ion transport.
2. A significant decrease ($p < 0.005$) of a protein whose function is unknown.
3. There were no differences between the glycoproteins of the patients and the normal controls.

Key words: Erythrocyte protein membrane. Electrophoresis. Renal transplantation.

(1) Dirección actual: Servicio de Hematología. Ciudad Sanitaria Enrique Sotomayor. Bilbao.

Recibido: 11 de mayo de 1983.

En forma definitiva: 20 de diciembre de 1983.

Aceptado: 21 de diciembre de 1983.

Correspondencia: Dr. A. Purroy.
Servicio de Nefrología.
Clínica Universitaria.
Avda. Pío XII, s/n. Pamplona.

INTRODUCCION

Una de las causas principales de la anemia de la insuficiencia renal crónica (IRC) la constituye la hemólisis secundaria al efecto tóxico de la uremia sobre la membrana eritrocitaria¹. Concretamente se han descrito diversos tipos de alteraciones en la membrana de los hematíes de sujetos urémicos: cambios en la distribución de los lípidos de la membrana^{2,3}, trastornos del funcionamiento de la bomba de sodio⁴⁻⁶ y modificaciones electroforéticas de las proteínas membranas⁷.

En los pacientes portadores de un injerto renal normofuncionante los valores del hematocrito y de la hemoglobina suelen ser normales⁸, habiéndose descrito incluso casos de eritrocitosis, muchas veces en asociación con rechazo⁹.

El objetivo del presente trabajo es investigar la composición proteica de la membrana del hematíe de trasplantados renales mediante la comparación de los patrones electroforéticos de las proteínas de la membrana eritrocitaria de un grupo de pacientes portadores de un injerto renal normofuncionante con los patrones de un grupo de individuos control.

MATERIAL Y METODOS

Individuos

El estudio se ha realizado en un grupo de controles normales ($n = 20$) y en un grupo de pacientes portadores de un injerto renal normofuncionante ($n = 10$), siendo ambos grupos homogéneos en cuanto a la edad y el sexo.

En el momento del estudio el tiempo promedio de postrasplante del grupo de pacientes era de $27,7 \pm 23$ meses, siendo la hemoglobina media superior a $11,18$ mmol/l. y a la creatinemia media inferior a $123,76$ μ mol/l. Todos los pacientes recibían tratamiento a base de prednisona ($0,20$ mg/kg/día) y azatioprina ($1,5-2$ mg/kg/día).

Métodos

La recogida de muestras se ha realizado mediante punción venosa a primera hora de la mañana.

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 su procesamiento (tiempo nunca superior a las tres horas).

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

Para el estudio electroforético de las proteínas de la membrana eritrocitaria se ha utilizado una técnica ya descrita⁷ y esquemáticamente consistente en:

— Centrifugación de las muestras con ulterior liberación del botón de hematíes.

— Lavado de los hematíes en tampón fosfato (5 mM, pH $7,4$, $\text{ClNa } 0,15$ M).

— Lisis completa de los hematíes por agitación durante 60 minutos a 4°C , en tampón fosfato (5 mM, pH $7,4$).

— Centrifugación de los hematíes lisados con obtención de un «paquete» de sombras eritrocitarias (membranas).

— Lavado y centrifugación de las sombras hemáticas en tampón fosfato (5 mM, pH $7,4$).

— Electroforesis sobre gel de poliacrilamida en sodio duodecil sulfato (SDS-PAGE).

— Extracción de los geles de la electroforesis.

— Tinción de los geles con azul de Coomassie para las proteínas y con ácido periódico de Schiff para las glicoproteínas.

— Los geles teñidos se someten a densitometría.

— Los densitogramas con las curvas correspondientes a las distintas bandas proteicas electroforéticas son sometidos a valoración cualitativa (morfología de las curvas) y cuantitativa (superficie de las curvas).

Cálculos estadísticos

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

RESULTADOS

La tabla I muestra los resultados obtenidos al estudiar los densitogramas correspondientes a la tinción para proteínas. No se aprecian cambios cualitativos, pero se objetivan dos modificaciones cuantitativas: un incremento significativo ($p < 0,001$) de la banda 3 y una disminución significativa ($p < 0,005$) de la banda 8.

La tabla II muestra los resultados obtenidos en los densitogramas correspondientes a la tinción para glicoproteínas. No se objetivan cambios cualitativos ni cuantitativos con significación estadística.

En las figuras 1 y 2 se representan gráficamente los histogramas de las diversas tinciones para los dos grupos estudiados.

DISCUSION

Se han descrito cambios en la distribución electroforética de las proteínas de la membrana eritrocitaria de pacientes en hemodiálisis crónica⁷. En este trabajo se describe la distribución proteica de la membrana eritrocitaria de pacientes con un trasplante renal con buena función.

La alteración más significativa se objetiva en la banda 3. Siendo, sin embargo, imposible delimitar el origen del incremento observado en la cuantía de esta proteína en los trasplantados renales. Esta banda corresponde a una de las proteínas intrínsecas mayores de la membrana eritrocitaria humana¹⁰. Se trata de una proteína transmembranaria¹¹ que atraviesa dos veces la membrana¹². Se piensa que se une a otros componentes de la misma, por lo que se le atribuye un papel en propiedades relacionadas con la morfología, elasticidad y topología de la membrana¹³. Se ha demostrado que interviene de manera importante en el transporte transmembranario de agua y cationes^{14,16}, también se ha descrito que la proteína de la banda 3 contiene un intermediario fosforilado necesario para el funcionamiento de la Na^+ , K^+ , ATPasa^{17,18}. Asimismo, se le ha atribuido a esta proteína actividad colinesterasa¹⁹. Tal diversidad de funciones

COMPOSICION PROTEICA DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA

TABLA I

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

Bandas	Controles X % ± S		Pacientes Y % ± S		T	P	Valoración cuantitativa
1 + 2	40,81	5,24	38,78	5	0,89	> 0,05	N
3	21,32	1,18	25,35	1,83	6,01	< 0,001	↑
4	7,48	1,73	8,85	1,61	1,81	> 0,05	↑
4 - 1	8,51	2,01	6,72	1,96	2,03	> 0,05	N
4 - 2	5,07	1,20	4,72	1,71	0,54	> 0,05	N
5	5,52	1,04	5,96	1,70	1,27	> 0,05	N
6	3,18	0,67	3,96	1,31	1,8	> 0,05	N
7	4,53	1,66	3,99	1,91	0,68	> 0,05	N
8	2,91	1,21	1,60	0,86	3,65	< 0,005	↓

X %, Y % = Porcentaje del área total. S = Desviación estándar. T = T de Student. P = Probabilidad estadística. N = Sin cambio estadísticamente significativo. ↑ = Aumento estadísticamente significativo. ↓ = Disminución estadísticamente significativa.

TABLA II

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

Bandas	Controles X % ± S		Pacientes Y % ± S		T	P	Valoración cuantitativa
1	5,2	1,35	6,12	1,50	1,48	> 0,05	N
2	45,48	2,30	46	2,10	0,53	> 0,05	N
3	49,40	1,84	47,88	1,95	1,83	> 0,05	N

X %, Y % = Porcentaje del área total. S = Desviación estándar. T = T de Student. P = Probabilidad estadística. N = Sin cambio estadísticamente significativo.

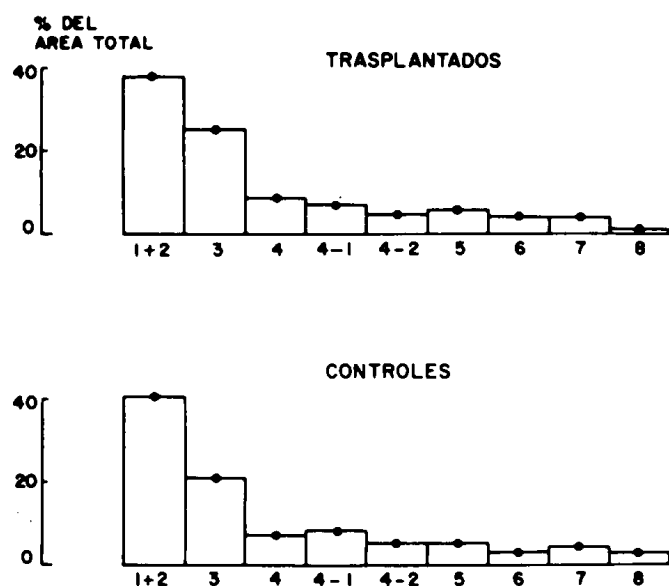


Fig. 1.—Tinción de proteínas. Histogramas correspondientes a las bandas de los dos grupos de individuos estudiados.

se ha explicado sobre la base de que en realidad la banda 3 representaría a un complejo de proteínas diferentes, como se demuestra mediante estudios de inmunoelectroforesis cruzada y de inmunoafinoelectroforesis cruzada¹³.

COLE y MALETZ²⁰ han hallado un incremento en la actividad de la Na⁺, K⁺, ATPasa de hematíes de pacientes con un trasplante renal con respecto a sujetos normales. Por otra parte es sabido que el aumento de la actividad transportadora iónica de la Na⁺, K⁺, ATPasa es

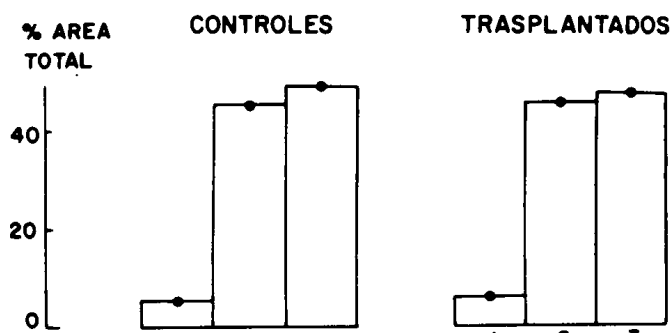


Fig. 2.—Tinción de glicoproteínas. Histogramas correspondientes a las bandas de los dos grupos de individuos estudiados.

función de la cantidad de unidades transportadoras²¹. El incremento observado en la cuantía de la banda 3 podría asociarse a cambios en la actividad de dicha enzima.

El estudio electroforético de las proteínas de la membrana eritrocitaria distingue con la tinción de azul de Coomassie 8 bandas¹⁰. La banda 8 no se ha tipificado desde el punto de vista funcional, se piensa que su peso molecular estaría próximo a los 30.000-35.000 daltons y que se emplazaría en la superficie citoplasmática de la membrana²⁵. En los pacientes trasplantados se aprecia una disminución significativa de la cuantía de esta banda, sin que sea posible valorar el origen y significación de tal hallazgo.

Finalmente, cabe reseñar que al evaluar comparativamente los patrones electroforéticos de las proteínas de la membrana eritrocitaria de pacientes en hemodiálisis crónica con los patrones de trasplantados renales con bue-

na función renal se aprecia en este último grupo la ausencia de las anomalías descritas en los pacientes en hemodiálisis⁷. Este hecho podría reforzar la hipótesis de que la uremia ejercería un efecto tóxico sobre la membrana eritrocitaria^{1,22}. Ello sin excluir la posible influencia sobre el sistema hematopoyético de los niveles normales de eritropoyetina que generalmente se dan con un injerto renal normofuncionante²³.

En conclusión, se describen los cambios hallados en la distribución de las proteínas de la membrana eritrocitaria de pacientes portadores de un injerto renal normofuncionante. Se plantea la posible interrelación entre el incremento cuantitativo de la proteína de la banda 3 y el incremento ya descrito de la actividad de la Na⁺, K⁺, ATPasa eritrocitaria de pacientes con un trasplante renal. Se sugiere finalmente que la influencia del plasma urémico en las anomalías electroforéticas de la membrana eritrocitaria descritas en pacientes en hemodiálisis y que no se objetivan en los pacientes trasplantados y sin uremia.

BIBLIOGRAFIA

1. ANAGNOSTOU, A.; FRIED, W., y KURTZMAN, N. A.: «Hematological consequences of renal failure». En *The Kidney*. Ed. por B. M. Brenner y F. C. Rector. W. B. Saunders. Philadelphia, pp. 2184-2212, 1981.
2. 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: 32-40, 1975.
3. BROWNLEE, N. R.; HUNTTNER, J. M.; PANGANAMALA, R. V., y CONWELL, D. G.: «Role of vitamin E in glutathione-induced oxidant stress: methemoglobin, lipid peroxidation and hemolysis». *J. Lipid. Res.*, 18: 635-644, 1977.
4. WELT, L. G.; SACHS, J. R., y McMANUS, T. J.: «An ion transport defect in erythrocytes from uremic patients». *Trans. Assoc. Am. Phys.*, 77: 169-173, 1964.
5. 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: 298-302, 1972.
6. COLE, C. H.: «Decrease ouabaine-sensitive adenosine triphosphatase activity in the erythrocyte membrane of patients with chronic renal disease». *Clin. Sci.*, 45: 775-777, 1973.
7. DIEZ, J.; ARRIZABALAGA, B.; FERNANDEZ, J.; SANCHEZ IBARROLA, A.; ROCHA, E., y PURROY, A.: «Estudio electroforético de las proteínas de la membrana eritrocitaria de pacientes en hemodiálisis crónica». *Nefrología*, 2: 7-11, 1982.
8. HOFFMAN, G. C.: «Human erythropoiesis following kidney transplantation». *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 149: 504-508, 1968.
9. KUN-YU, W. U.; GIBSON, T.; FREEMAN, R.; BONNEY, W.; FRIED, W., y DE GOWIN, R.: «Erythrocytosis after renal transplantation». *Arch. Intern. Med.*, 132: 898-902, 1973.
10. FAIRBANKS, G.; STECK, T. L., y WALLACH, D. F. H.: «Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane». *Biochemistry*, 10: 2606-2617, 1971.
11. FINDCAY, J. B. C.: «The receptor proteins for concanavalin A and lens culinaris Phytohemagglutinin in the membrane of the human erythrocyte». *J. Biol. Chem.*, 249: 4398-4403, 1974.
12. JENKINS, R. E., y TANNER, H. J. A.: «Ionic-strength-dependent changes in the structure of the major protein of the human erythrocyte membrane». *Biochem. J.*, 161(1): 131-138, 1977.
13. GOLOUTCHENKO-MATSUMOTO, A., y OSAWA, T.: «Heterogeneity of band 3, the major intrinsic protein of human erythrocyte membranes». *J. Biochem.*, 87: 847-854, 1980.
14. HO, M. K., y GUIDOTTI, G.: «A membrane protein from human erythrocytes involved in anion exchange». *J. Biol. Chem.*, 250: 675-683, 1975.
15. RUBIN, C. S., y ROSEN, O. H.: «Protein phosphorylation». *Ann. Rev. Biochem.*, 44: 831-887, 1975.
16. BROWN, P. A.; FEINSTEIN, M. B., y SHAAFI, R. I.: «Membrane proteins related to water transport in human erythrocytes». *Nature*, 254: 523-525, 1975.
17. AVRUCH, J., y FAIRBANKS, G.: «Demonstration of a phosphopeptide intermediate in the Mg⁺⁺-dependent, Na⁺ and K⁺ stimulated adenosine triphosphatase reaction of the erythrocyte membrane». *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)*, 69: 1216-1220, 1972.
18. BJERRUM, O. J.; BHAKDI, S., y BØG-HANSEN, T. C.: «Quantitative immunoelectrophoresis of proteins in human erythrocyte membranes. Analysis of protein bands obtained by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis». *Biochim. Biophys. Acta*, 406: 489-504, 1975.
19. BELLHORN, H. B.; BLUMENFELD, O. O., y GALLOP, P. M.: «Acetylcholinesterase of the human erythrocyte membrane». *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 39: 267-273, 1970.
20. COLE, C. H., y MALETZ, R.: «Changes in erythrocyte membrane ouabain-sensitive adenosine triphosphatase after renal transplantation». *Clin. Sci. Mol. Med.*, 48: 239-242, 1975.
21. GARRAHAN, T. J., y GARAY, R. P.: «The distinction between sequential models for Na⁺, K⁺ transport». *Current Topics in Membrane and Transport*, 8: 29-97, 1976.
22. GIOVANETTI, S.; BALESTRI, P., y BARSOTTI, G.: «Methylguanidine in uraemia». *Arch. Int. Med.*, 131: 709-713, 1968.
23. HOFFMAN, G. C.: «Human erythropoiesis following kidney transplantation». *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 149: 504-508, 1968.