

## Variaciones de las proteínas de membrana de eritrocito en pacientes con cirrosis

M. T. Méndez-Marco\*, C. Arce de Obieta y E. Palacios-Alaiz.

Instituto de Bioquímica  
Centro Mixto (C.S.I.C.-U.C.M.)  
Facultad de Farmacia  
Ciudad Universitaria  
28040-Madrid.

(Recibido el 27 de julio de 1990)

M. T. MÉNDEZ-MARCO, C. ARCE DE OBIETA and E. PALACIOS-ALAIZ.  
*Variations of Erythrocyte Membrane Proteins in Cirrhotic Patients.* Rev. esp. Fisiol.,  
47 (3), 115-120, 1991.

The serum and erythrocyte membrane proteins of patients with cirrhosis were studied. Recent work on abnormalities of the erythrocyte membrane resulted in the identification of several types of membrane skeleton lesions. The different techniques for separation of membrane proteins have been revised and compared. These were studied on slabs using the SDS-polyacrilamide gel and discontinuous buffer system with a linear concentration gradient of 5-15 % (w/v). Serum proteins were separated by using continuous buffer system with a linear concentration gradient of 4-30 %. A decreased in serum and red cell membrane proteins in those patients, were observed.

Key words: Erythrocyte membrane proteins, Cirrhotic patients

El conocimiento de la estructura y función de sistemas de biomembranas ha suscitado un enorme y creciente interés en orden a permitir el estudio de sus componentes y por extensión, las alteraciones que sufren en distintos estados patológicos.

La anemia que se observa en la mayoría de las cirrosis hepáticas (20), se ha relacionado frecuentemente con alteraciones a nivel de la composición lipídica de la

membrana (6, 7). En este sentido, resulta conveniente recordar que el estudio de dichas proteínas en determinadas alteraciones o discrasias sanguíneas, ha permitido comprobar la existencia de modificaciones respecto a su contenido normal en el hematíe (3, 21, 24).

Para realizar el estudio de proteínas de membrana del eritrocito, es necesario disponer de una metodología adecuada que permita la preparación de dichas membranas y la solubilización de sus componentes de forma sencilla y eficaz. Por tanto, dis-

\* A quien debe dirigirse la correspondencia.

poner de una técnica adecuada supone poder resolver sin dificultad, su separación de los lípidos, evitar la agregación que se produce espontáneamente en presencia de iones calcio y magnesio, eliminación de hemoglobina en la preparación de los estromas y finalmente su solubilización y separación. En este trabajo, hemos puesto a punto una técnica que resuelve estas dificultades y que permite obtener resultados sobre las variaciones de la composición proteica de membrana en estos enfermos en relación a individuos normales.

### Material y Métodos

*Selección de los pacientes.* — Se ha estudiado un grupo de 25 pacientes con cirrosis seleccionados por la clínica y analítica previa. En todos ellos, se determinó albúmina, bilirrubina y tiempo de protrombina en suero, seleccionando aquellos pacientes que presentaron unos valores de albúmina inferiores en un 30 % al control, una bilirrubina superior a 2,5 mg/dl y un índice de protrombina del 60 %. La determinación de los parámetros hematológicos básicos se realizó en un contador Coulter S, modelo Sr. Los parámetros bioquímicos generales se determinaron en un autoanalizador Technicon, mod. RA-500 y el tiempo de protrombina con un coagulómetro, modelo RAL-CLOT-1 DAIKEN.

*Preparación de los estromas eritrocitarios.* — La obtención de estromas eritrocitarios libres de hemoglobina se realizó mediante la técnica modificada de DODGE *et al.* (8) y que fundamentalmente consiste en una lisis hipotónica de sangre fresca heparinizada mediante un tampón fosfato sódico 20 mOs ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$  0,15 M;  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  0,10 M) a pH 7,4. Los eritrocitos fueron obtenidos por centrifugación de 4 ml de sangre heparinizada, lavados tres veces con 20 ml del tampón y centrifugados a 30.000 x g, durante 40 minutos a 4 °C.

La eliminación de lípidos del material insoluble obtenido de esta manera, se realizó por tratamiento con metanol en un homogenizador, potter Elvehjem, con pistilo de vidrio, durante 5 minutos, seguido por un tratamiento idéntico con cloroformo, evitando de esta manera el empaquetamiento del material. Sucesivos lavados con una mezcla de cloroformo: metanol (2:1) (v/v), aseguraron la completa eliminación de lípidos de este material.

La solubilización de estas proteínas eritrocitarias se llevó a cabo mediante diferentes técnicas (2, 12, 19, 23), obteniéndose los mejores resultados al disolver el material libre de lípidos en una solución solvente, compuesta por lauril sulfato sódico (SDS) al 20 % y  $\beta$ -mercaptoetanol al 5 % en una proporción (1:1) (p/v). Finalmente, se calentaron a ebullición durante 3-5 minutos, para favorecer la solubilización de las proteínas y romper los puentes disulfuro (1). El material se dializó durante 12 horas con un tampón Tris 0,25 M, glicina 1,9 M y SDS al 1 % a pH 8,3, con el fin de eliminar las sales y residuos de disolventes orgánicos que pudieran contaminar el material.

*Separación de las proteínas de membrana de eritrocito.* — Una vez obtenidas las proteínas de membrana se procedió a su separación mediante electroforesis en placa, en gel de poliacrilamida, estableciendo un gradiente de concentración lineal comprendido entre el 5 y el 15 %, con SDS y un sistema de tampón discontinuo (14).

Las muestras se prepararon para la electroforesis adicionándoles 0,5  $\mu$ l de azul de bromofenol al 1 % como marcador y 50  $\mu$ l de glicerol, para aumentar su densidad.

La electroforesis se mantuvo a 60 voltios hasta que las muestras alcanzaron el gel donde se había establecido el gradiente. A partir de ese momento, la separación de las proteínas se realizó a 120 voltios.

Los geles se fijaron con una mezcla de isopropanol al 35 % y ácido acético al 10 %, durante 2 horas. A continuación, se

tiñeron con Azul Comassie R-250 disuelto al 0,26 % (p/v), en metanol al 50 % y ácido acético al 10 %, durante 1 hora. La decoloración de los geles se llevó a cabo por sucesivos lavados con una mezcla (v/v) de ácido acético y metanol, ambos al 10 %.

*Separación de proteínas de suero.* — El análisis electroforético del suero se realizó en gel de poliacrilamida, en gradiente de concentración lineal 4-30 %, mediante un sistema de tampón continuo (Tris-ClH 0,08 M, ácido bórico 0,08 M y EDTA 3 mM, a pH 8,3). La cantidad de suero aplicado fue de 3-5 µl. Antes de realizar la aplicación, los geles se mantuvieron 20 minutos a 70 V. La separación se realizó durante 10 horas a 500 V. La fijación, coloración y decoloración tuvo lugar como en el caso de las proteínas de membrana de eritrocitos.

*Valoración de las bandas proteicas obtenidas.* — La lectura de las bandas proteicas separadas por electroforesis se realizó mediante un fotodensitómetro «Atom 430». La valoración de las proteínas se realizó por el método de LOWRY *et al.* (15), utilizando albúmina bovina como patrón de referencia. La determinación del

peso molecular (PM) de las proteínas de eritrocitos de enfermos cirróticos se determinó a partir de patrones de PM comprendidos entre 16.000 y 264.000 daltons calculando su movilidad relativa (28).

### Resultados

El estudio de las proteínas totales en suero correspondiente a enfermos cirróticos refleja un descenso significativo de su contenido (56 %), respecto a sueros control (tabla I). Del mismo modo, la valoración de las distintas proteínas componentes de ese suero, refleja un descenso significativo de casi todas las fracciones proteicas analizadas a excepción de  $\alpha_1$ -antitripsina e Ig M que aumentan significativamente.

La separación de proteínas de membrana de eritrocitos permitió la identificación de 6 bandas proteicas cuyo peso molecular se determinó mediante el empleo de patrones. De acuerdo a nuestros resultados, el peso molecular de dichas proteínas fue de: 43.000, 75.000, 88.000, 200.000, 220.000 y 240.000 daltons que fueron identificadas como actina (banda 5), bandas 4.1 y 4.2, componente a (banda 3), an-

Tabla I. *Determinación de proteínas totales en suero y en las fracciones separadas electroforéticamente en gel de poliacrilamina 4-30 %.*

Los resultados obtenidos son la media de 10 muestras en individuos control y de 25 en cirróticos. Cada muestra ha sido procesada por duplicado. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  N.S. = no significativo.

Proteínas	Control	Cirrótico	p <	%
Proteínas totales	7,2 ± 1,2	4,01 ± 0,97	***	56
Prealbúmina	0,24 ± 0,07	0,08 ± 0,001	*	33
$\alpha_1$ -antitripsina	0,12 ± 0,08	0,35 ± 0,025	**	292
Albúmina	3,52 ± 0,25	2,31 ± 0,18	***	66
$\beta$ -transferrina	0,27 ± 0,027	0,22 ± 0,02	N.S.	82
$\alpha_2$ -ceruloplasmina	0,06 ± 0,011	0,02 ± 0,001	***	27
Haptoglobinas	0,44 ± 0,006	0,22 ± 0,015	***	51
Ig G e Ig A	1,44 ± 0,14	1,62 ± 0,20	N.S.	112
$\alpha_2$ -macroglobulina	0,40 ± 0,030	0,51 ± 0,10	N.S.	128
$\beta$ -lipoproteína	0,66 ± 0,012	0,39 ± 0,07	***	59
Ig M	0,24 ± 0,03	0,48 ± 0,06	***	199

Tabla II. *Proteínas de membrana de hematíe separadas electroforéticamente en gel de poliacrilamida 5-15 %, con SDS.*

Los resultados son media de 10 muestras, en el caso de individuos control y de 25 en el caso de cirróticos. Cada muestra ha sido procesada por duplicado. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; N.S. = no significativo.

Identificación	Peso molecular (Daltons)	% de proteína		p <	%
		Control	Cirrótico		
Espectrina	240.000	15 ± 1,5	10 ± 1,1	***	67
(Banda 1 y 2)	220.000	14 ± 0,8	9 ± 1,0	***	64
Ankirina (Banda 2.1)	200.000	5 ± 0,6	4,7 ± 0,4	N.S.	94
Componente a (Banda 3)	88.000	26 ± 3,2	19 ± 2,9	***	74
Bandas 4.1 y 4.2	75.000	9 ± 0,2	8 ± 0,40	***	89
Actina (Banda 5)	43.000	5 ± 0,8	7 ± 2,5	N.S.	140
Proteínas totales (mg/ml):		1,47 ± 0,2	0,9 ± 0,1	***	61

kirina (banda 2.1) y espectrinas (banda 1 y 2), respectivamente. El porcentaje de estas proteínas de membrana, procedentes de individuos control y cirróticos, se recoge en la tabla II, observándose una disminución significativa de espectrinas y bandas 4.1 y 4.2, no habiendo variaciones significativas en el resto de las bandas.

La tabla III recoge los valores medios y la significación estadística de las relaciones establecidas entre espectrina y bandas 4, con la proteína de membrana mayoritaria, componente a, observándose un descenso significativo de las mismas. Las relaciones del resto de las bandas proteicas separadas respecto al componente a, no presentaron

significación estadística. La relación espectrina 1/espectrina 2, aumenta significativamente.

### Discusión

El proteinograma sérico constituye uno de los datos más interesantes de la bioquímica hepática presentando, en fases avanzadas de la enfermedad, hipoalbuminemia (descenso inferior a 3 g/dl), utilizándose este dato como criterio para su diagnóstico. Los proteinogramas de los sueros de los pacientes analizados presentan una disminución del contenido proteico de aproximadamente un 50 % en relación a individuos control, atribuible preferentemente a la variación de las cifras de albúmina que descienden de 3,5 g/dl a 2,3 g/dl, así como al descenso que experimentan la casi totalidad de las restantes proteínas separadas. El origen de esta hipoalbuminemia se ha atribuido a la capacidad residual disminuida de la función hepática que presentan estos pacientes.

Mientras que la mayoría de las fracciones proteicas están disminuidas, en el caso de los enfermos cirróticos investigados, las inmunoglobulinas, especialmente las IgM, duplican prácticamente el valor control (199 %). Es frecuente observar cómo esta

Tabla III. *Valores medios y significación estadística de los cocientes espectrinas y bandas 4/componente a.*

Los resultados obtenidos proceden de los valores recogidos en la tabla II y proceden de 10 individuos control y 25 pacientes con cirrosis.

Cociente	Control	Cirróticos	p <
Espectrina 1/ espectrina 2	1,05 ± 0,01	1,10 ± 0,02	**
Espectrinas/ componente a	1,13 ± 0,05	1,02 ± 0,04	*
Bandas 4/ componente a	0,34 ± 0,02	0,29 ± 0,01	*

fracción aparece elevada no sólo en la cirrosis hepática sino también en inflamaciones agudas (hepatitis viral) y en hepatitis crónica, atribuyéndose en el caso del hígado cirrótico a su incapacidad para captar y destruir antígenos de diversa procedencia (24). Sucesivos intentos de establecer criterios diagnósticos diferenciales por el tipo de inmunoglobulina aumentada se han desestimado ya que, independientemente de la etiología de la cirrosis, resulta necesario tener en cuenta el estado clínico del paciente, determinante de la perturbación en los mecanismos homeostáticos de la respuesta inmunológica (18).

En el grupo de pacientes estudiado, se observa además un aumento de  $\alpha_1$ -antitripsina, proteína que constituye el 90 % de la fracción  $\alpha_1$ -globulinas. La pérdida excesiva de albúmina que presenta en estos enfermos, podría ser compensada por el hígado, que sintetiza esta proteína con el fin de restablecer la presión coloidosmótica del plasma.

La fracción  $\beta$ -lipoproteica se encuentra disminuida respecto al control. En distintos tipos de cirrosis se han comprobado alteraciones de los lípidos plasmáticos que coinciden con este comportamiento (25). Resulta frecuente que, cuando existen desórdenes que afectan a la función hepatocelular y las células del parénquima están dañadas, se origine una hipolipidemia como consecuencia de un descenso de la síntesis y secreción de VLDL o de LDL, anormalmente formadas.

El estudio de proteínas de membrana de eritrocito se ha realizado con el fin de comprobar si, además de las alteraciones lipídicas que estos pacientes presentan, existen otras a nivel de los constituyentes proteicos intrínsecos y/o extrínsecos de dicha membrana. La técnica utilizada ha permitido la separación de las principales proteínas responsables, de una manera u otra, del mantenimiento de las condiciones fisiológicas de la membrana del eritrocito. Del estudio comparativo realizado en membranas de eritrocitos de individuos

normales y cirróticos, puede deducirse que existe una disminución generalizada de los principales componentes de dicha membrana. Coincidiendo con nuestros resultados, se ha observado también un descenso de espectrina en distintas enfermedades que cursan con hemólisis (16,17) y en mutantes de ratones (*Mus musculus*), que presentan severas anemias hemolíticas (10). Este descenso en espectrina suele ir acompañado de una moderada deficiencia en ankirina (22, 23), necesaria para establecer su anclaje en el interior de la membrana. Del mismo modo, en los últimos años, se han observado otros defectos que implican una alteración en la interacción entre espectrina y proteína 4.1 o un déficit en la proteína 4.2 (16).

Es también frecuente encontrar, en diversas alteraciones hepatocelulares como cirrosis establecida o alcohólica, una anemia hemolítica más o menos severa y de compleja etiología (11, 13), que se ha relacionado con anomalías de los lípidos constituyentes de eritrocitos, responsables de una mayor rigidez de la membrana por aumento de la viscosidad de la bicapa lipídica (5, 27), de un descenso de la fosforilación de espectrina (26) y de la alteración de la organización de sus proteínas, tanto integrales como periféricas (4).

Por tanto, de los resultados de este trabajo podemos concluir que el factor determinante de la anemia hemolítica, que aparece en los pacientes cirróticos estudiados, es un defecto estructural de la membrana eritrocitaria que consiste, esencialmente, en un déficit de espectrina y bandas 4.

En resumen, dada la relativa frecuencia de la cirrosis en nuestro medio y las dificultades que ofrece la realización sistemática de estudios moleculares de la membrana de eritrocito, la investigación de procedimientos que directa o indirectamente pongan de manifiesto la existencia de defectos de proteínas eritrocitarias, puede tener interés no sólo de diagnóstico sino también fisiopatológico.

### Resumen

Se estudian las posibles alteraciones en la composición proteica de la membrana de hematíes de enfermos con cirrosis así como sus proteínas séricas, con el fin de detectar posibles anomalías. Para resolver las dificultades metodológicas que este estudio plantea, se comparan distintas técnicas de electroforesis sobre gel de poliacrilamida en placa. Los mejores resultados y los más reproducibles se obtienen empleando un gradiente de concentración lineal 4-30 % y un sistema de tampón continuo, para el estudio de los sueros y un gradiente 5-15 % con SDS y tampón discontinuo, para el estudio de las proteínas de membrana. Como resultado, se observa un descenso, prácticamente generalizado, del contenido proteico del suero y de la membrana de hematíes de individuos cirróticos.

Palabras clave: Membrana de hematíes, Cirrosis hepática.

### Bibliografía

- Banga, J. P., Gratzar, W. B., Pinder, J. C., Linch, D. C. y Huehnns, E. R.: *The Lancet*, 17, 1048, 1979.
- Boivin, P. y Galand, C.: *Nouv. Rev. Franc. d'Hematol.*, 15, 589-596, 1975.
- Boivin, P.: «Anemias hemolíticas». Ponencias XXX Reun. Nal. Asoc. Esp. Hematol. Hemoter. Santiago de Compostela, 1988, 49-55.
- Borochoy, H. y Abbot, R. E.: *Biochemistry*, 18, 251, 1979.
- Cooper, R. A. y Diloy-Puray, M.: *J. Clin. Invest.*, 51, 3182, 1972.
- Cooper, R. A., Arner, E. C., Wiley, J. S. y Shattil, S. J.: *J. Clin. Invest.*, 55, 115-126, 1975.
- Cooper, R. A., Leslie, M. H., S. Fischkoff et al.: *Biochemistry*, 17, 327-331, 1978.
- Dodge, J. T., Mitchell, C. y Hanahan, D. J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 119-130, 1963.
- Greenquist, A. C., Shonet, S. B. y Bernstein, J. E.: *Blood*, 51, 1149-1155, 1978.
- Haest, C. W. M., Plaga, G., Kamp, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 509, 21-32, 1978.
- Jandl, J. H.: *J. Clin. Invest.*, 34, 390, 1978.
- Juliane, R. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, 266, 301-306, 1972.
- Kimber, C. D. y Deller, J.: *Quart. J. Med.*, 34, 33, 1965.
- Laemmly, V. K.: *Nature*, 227, 680, 1970.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
- Lux, S.: En «Hematology of infancy and childhood» (Nathan D. G. y Oski F. A., eds.) W. B. Saunders. Filadelfia, 1987, 443-544.
- Merino, A., Vives, J. L., Aguilar, J. L. Berga, L. y Pastor, C.: Ponencias XXX Reun. Nal. Asoc. Esp. Hematol. Hemoter. Santiago de Compostela, 1988, 73-81.
- Mestre-Playá, M., Aixala-Abelló, S., Barberá-Salvá, G. y Buendía-Gracia, E.: Hipergammaglobulinemias policlonales. Gammopatías policlonales.
- Miller, D. H.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 40, 716-767, 1970.
- Orrego, H., Blendis, L., Blake, J., Kapur, B. e Israel, J.: *The Lancet*, 2, 354-368, 1979.
- Palek, J. y Coetzer, T.: *Blood cells*, 13, 250-273, 1987.
- Palek, J. y Lux, S. E.: *Semin. Hematol.*, 20, 189-224, 1983.
- Philippot, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 225, 201-213, 1971.
- Schrier, S. S.: *Clin. Haematol.*, 14, 1-12, 1985.
- Schuller, A.: «Síndromes hipolipémicos. Lípidos y lipoproteínas». Editorial Científico Médica. Barcelona, 1972, p. 162.
- Semenuk, M., Vickers, J. et al.: *Clin. Res.*, 25, 695, 1977.
- Vanderkooi, J., Fischkoff, S., Chance, B. y R. A. Cooper: *Biochemistry*, 13, 1589-1598, 1974.
- Weber, K. y Osborn, M.: *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412, 1969.