

ORIGINALES

Aislamiento y caracterización de componentes plasmáticos de bajo peso molecular en hemodiálisis.

J. A. de la Rosa Sanz y M. C. Martín Mateo

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología de la Facultad de Ciencias de Valladolid.

RESUMEN

Tras la utilización prolongada de la hemodiálisis han ido apareciendo una serie de disturbios metabólicos por acúmulo de toxinas urémicas, encontrándose dentro de ellos las denominadas medianas moléculas.

Distintos trabajos indican la naturaleza peptídica de estas medianas moléculas, mientras que otros trabajos no las asocian a derivados proteicos. Así pues, el presente trabajo está dirigido a ver la depuración que hace la hemodiálisis sobre las medianas moléculas y su aislamiento y posterior caracterización de las mismas, a fin de arrojar luz sobre su diálisis y naturaleza.

Por ello estudiamos 10 pacientes en hemodiálisis a los que se realizaron antes y después de la hemodiálisis los métodos de aislamiento con cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-15. Los distintos picos de elución obtenidos fueron unidos y concentrados por liofilización. De ellos, los que presentaron mayor concentración fueron analizados por espectroscopia de masas y por cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephadex A-25. Las fracciones eluidas por dicha cromatografía se sometieron a análisis de espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear. Se comprueba la presencia de medianas moléculas en hemodiálisis, que descienden con la misma con dos picos bien determinados mediante espectroscopia de masas de 220 y 222 daltons. Los resultados obtenidos del espectro de infrarrojo indican que no son de naturaleza peptídica, debido a la existencia de vibraciones correspondientes a grupos carboxílicos y amínicos terminales.

Palabras clave: **Hemodiálisis. Medianas moléculas. Espectro de infrarrojo. Cromatografía de intercambio iónico. Resonancia magnética nuclear.**

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MIDDLE MOLECULES IN PLASMA OF UREMIC PATIENTS

SUMMARY

One of the many manifestations of chronic renal failure (CRF) is the accumulation in the plasma of substances such as urea, polyamines, guanidines, parathyroid hormone, alu-

Correspondencia: Dra. M. C. Martín Mateo.
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología.
Facultad de Ciencias de Valladolid.
Paseo del Prado de la Magdalena, s/n.
47005 Valladolid

Recibido: 19-XII-1991.
En versión definitiva: 1-IV-1992.
Aceptado: 2-IV-1992.

minium and the so-called middle molecules. Middle molecules are considered toxic because they are present at lower concentration in patients treated by peritoneal dialysis who have a lower incidence of peripheral neuropathy than those receiving hemodialysis.

Some authors have identified these molecules as peptides while other studies do not suggest that they are protein derivatives. The present report describes the isolation and characterization of middle molecules in the plasma of uremic patients and the urine of healthy individuals, in an attempt to throw greater light on their chemical composition. The most appropriate methods have been employed including exclusion chromatography with Sephadex G-15 which provides a suitable pore size for the separation of substances in this molecular weight range. The elution peaks were lyophilised and dialyzed. The substances in highest concentration were analyzed by mass spectroscopy and ion exchange chromatography in DEAE Sephadex A-25. The fractions eluted from the chromatography columns were submitted to electrophoresis in dissociative conditions, to infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy. These procedures yielded information on the possible structure and nature of middle molecules.

Key words: Chromatography. Electrophoresis. Spectroscopy. Plasma components.

Introducción

Las técnicas de depuración extrarrenal han supuesto una mayor supervivencia de los pacientes urémicos; sin embargo, tras su utilización prolongada se ha evidenciado un creciente número de efectos secundarios indeseables, destacando, entre otros, los disturbios metabólicos por acúmulo de toxinas urémicas.

Dentro de este grupo de sustancias se encuentran las denominadas medianas moléculas, cuyo peso molecular se establece entre 2.000 y 3.000 daltons¹, aunque hay autores que alcanzan en su definición hasta los 5.000 y 6.000 daltons². A ellos se ha atribuido la capacidad de producir efectos tóxicos en la uremia^{3,4}.

La mayoría de los trabajos realizados sobre estos compuestos plasmáticos han tenido por objeto la evaluación de sus efectos tóxicos, mientras que son escasos los estudios sobre su naturaleza química, por lo que su estructura y composición son prácticamente desconocidos, defendiendo algunos autores su naturaleza peptídica^{5,6}, su naturaleza no peptídica^{7,8} y otros su unión con elementos traza⁹. Por ello, el objetivo del trabajo ha sido aislar e intentar dilucidar la estructura química de estas medianas moléculas.

Material y métodos

Se han estudiado 10 pacientes en hemodiálisis (siete hombres y tres mujeres) con edades medias de 43 ± 12 años. Su tiempo en programa oscila entre los diez y veintisiete meses. Se dializaban con membranas de poliacrilonitrilo (PAN) cuatro horas diarias, tres veces por semanas, con una superficie de membrana de 1 mm². El grupo era homogéneo en cuanto peso, toma de medicación y Ktv, con diuresis residual nula. Todos ellos llevaban

más de seis meses con la membrana de PAN. La dieta era libre en cuanto al consumo de proteínas y restringida para el sodio y potasio. El agua de los baños de diálisis provenía de un sistema de ósmosis inversa. El flujo de diálisis fue de 300 ml/m. La toma de sangre se realizó inmediatamente antes y después de la hemodiálisis en el sistema venoso.

Métodos

Para el fraccionamiento por exclusión molecular y posterior intercambio iónico se usó una columna cromatográfica de Pharmacia Phine Chemicals de 96 cm de alto y 1,5 cm de diámetro.

a) *Fraccionamiento sérico por cromatografía de exclusión molecular.* Se ha realizado con gel Sephadex G-15, tratado previamente con BH₄Na a 80 °C. Este gel presenta un tamaño de poro idóneo para separar las moléculas que queremos caracterizar. Fraccionamos los dos polos séricos, usando como eluyente buffer de trietilamina 0,025 M, pH 8, y obtenemos los cromatogramas antes y después de la hemodiálisis, leyendo las absorbencias de las fracciones recogidas a 254 nm en un espectrofotómetro de UV-Visible.

b) *Fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico.* Las fracciones correspondientes a los picos de la cromatografía de exclusión molecular fueron liofilizadas y posteriormente dializadas para eliminar el buffer de trietilamina. De todos los picos, elegimos los que presentan mayor concentración para someterles al intercambio iónico en gel DEAE Sephadex A-25. Estos picos son los denominados 1A (pico 1 antes de diálisis, fracciones 16, 17, 18, 19, 20 y 21), 2D (pico 2 después de diálisis, fracciones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26) y 4D (pico 4 después de diálisis, fracciones 33, 34, 35, 36, 37, 38 y 39).

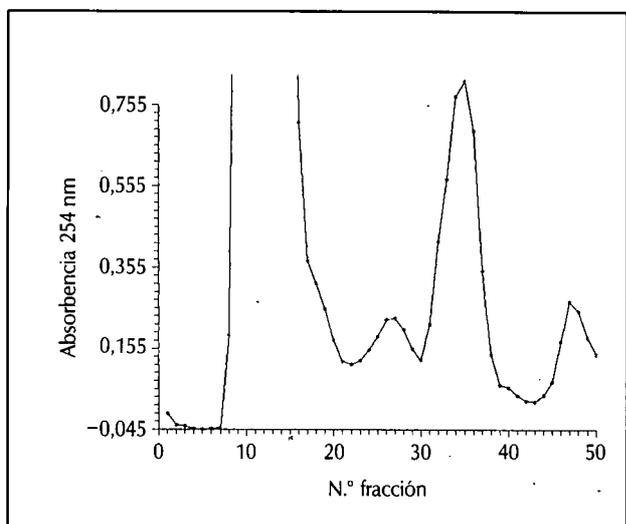


Fig. 1.—Fraccionamiento del pool sérico de pacientes antes de diálisis en gel Sephadex G-15.

Equilibramos el gel con buffer fosfato 0,05 M, pH 7,4, y usamos como eluyente un gradiente lineal de NaCl desde 0,2 M hasta 1 M, a pH 7,4.

c) *Espectroscopias.* Se obtuvieron los espectros de masas en acetona e infrarrojo de los picos 2D y 4D. También se realizó el análisis espectroscópico de H-RMN en cloroformo deuterado del pico 2D.

Los aparatos utilizados en el análisis de las muestras fueron:

- Espectro de masas Hewlett-Packard Gc/MS, 59884.
- Resonancia magnética nuclear de H¹ y C¹³.
- Espectrofotómetro Brucker AC80.

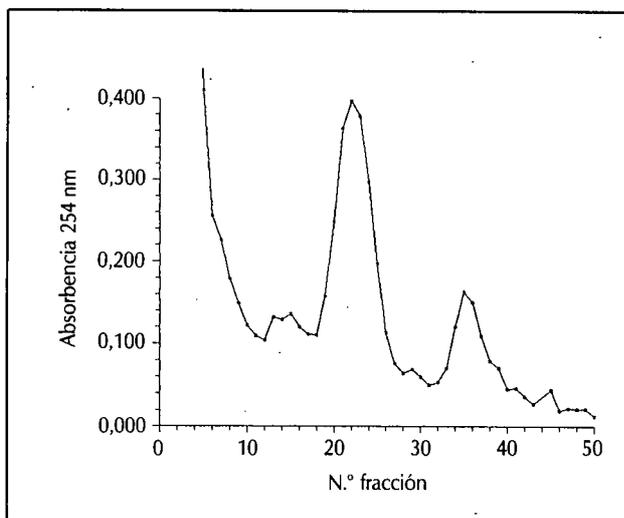


Fig. 2.—Fraccionamiento del pool sérico de pacientes después de diálisis en gel Sephadex G-15.

— Espectrofotómetro Cignns 100 (Mattson) y Pu 9706 Philips en pastilla de BrK.

Resultados

El fraccionamiento sérico por cromatografía de exclusión molecular en gel Sephadex G-15 antes de la hemodiálisis (fig. 1) denota la existencia de tres picos que corresponden sus máximos a los volúmenes de elución 25, 35 y 47; después de la hemodiálisis (fig. 2) aparecen cinco picos en los volúmenes de elución 11, 12, 21, 35 y 45.

Mediante el fraccionamiento sérico por cromatografía de intercambio iónico en gel DEAE Sephadex A-25 se cromatografiaron los picos de elución de la cromatografía de exclusión molecular que presentaban mayor concentración. Estos picos fueron el 1A, 2D y 4D.

El pico 1A (fig. 3) presenta a su vez una serie de picos, encontrando dos más internos en los volúmenes de elución 32 y 52, respectivamente.

El pico 2D (fig. 4) presenta una gran elevación en el volumen de elución 50.

El pico 4D (fig. 5) tiene múltiples picos, siendo el más característico el que aparece en los volúmenes de elución de 70.

El pico 2D fue sometido a resonancia magnética nuclear en cloroformo deuterado (fig. 6), viendo que no es completamente soluble, apareciendo una banda de un grupo metílico y la otra pertenece al disolvente. Se obtuvieron los espectros de masas del pico 2D, dando un peso molecular de 220 daltons (fig. 7); para el pico 4D, el peso molecular fue de 222 daltons (fig. 8).

En el espectro de infrarrojo del pico 2D (fig. 9) aparecen una serie de bandas que corresponden a: 3.435 nm. Banda muy pronunciada correspondiente a un alcohol. Es

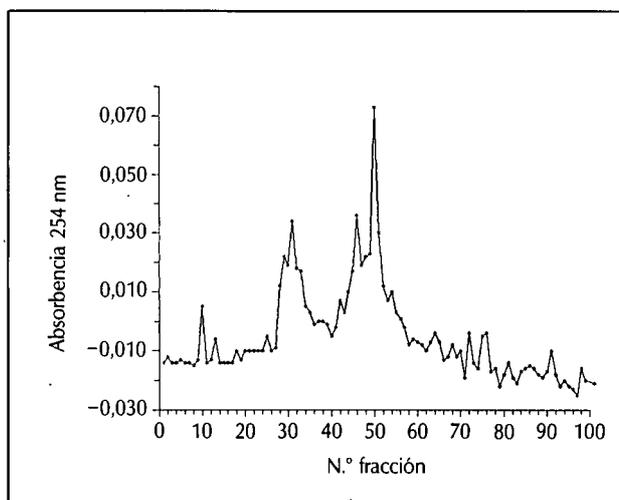


Fig. 3.—Cromatograma de intercambio iónico (gel DEAE Sephadex A-25) del pico 1A.

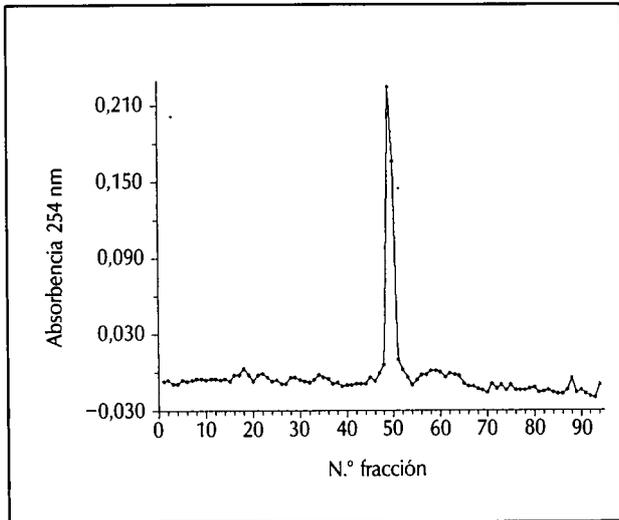


Fig. 4.—Cromatograma de intercambio iónico (gel DEAE Sephadex A-25) del pico 2D.

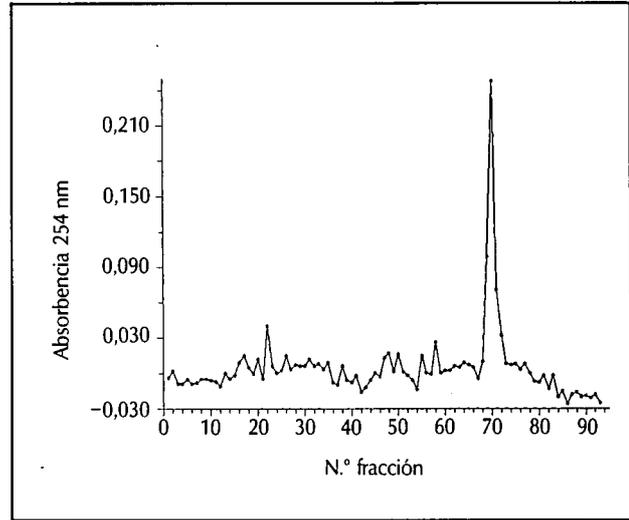


Fig. 5.—Cromatograma de intercambio iónico (gel DEAE Sephadex A-25) del pico 4D.

demasiado estrecha para corresponder a un ácido; no apareciendo además la banda de vibración del doble enlace C=O.

2.920-2.850 nm: Banda correspondiente a la vibración de los protones en grupos metilos terminales.

1.650 nm: Corresponde a un doble enlace C=C, posiblemente cis-sustituido. También puede corresponder a una banda de amida I(-NCO-) libre o asociada.

Para el pico 4D (fig. 10), el espectro de infrarrojo demuestra la existencia de las siguientes bandas:

1.160 nm: Puede deberse a la presencia de una función alcohólica.

3.400 nm: Denota claramente la existencia de una función carboxílica.

Las asignaciones de las bandas que aparecen en ambos espectros del pico 2D y 4D (figs. 9 y 10), a 2.340-2.365 nm muy peculiares, podrían corresponder a algo de fosfato que está presente en la muestra, concretamente la vibración del enlace p-H.

Discusión

Los estudios realizados para la identificación bioquímica de ciertas toxinas urémicas han dado resultados poco satisfactorios. Ello debido a la combinación de numerosos factores: complejidad de los fluidos biológicos, poca o nula información en la naturaleza bioquímica de las sus-

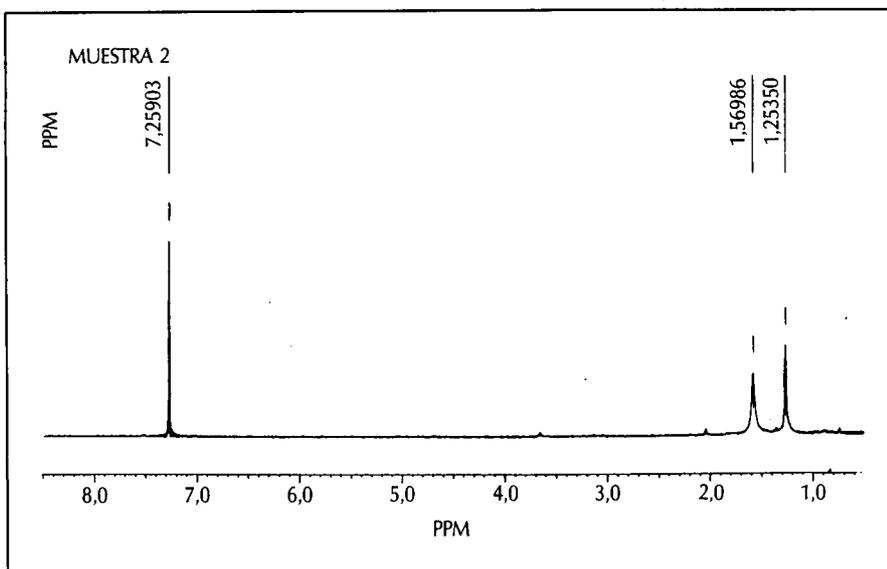


Fig. 6.—Espectro de resonancia magnética nuclear del pico 2D en cloroforno deuterado.

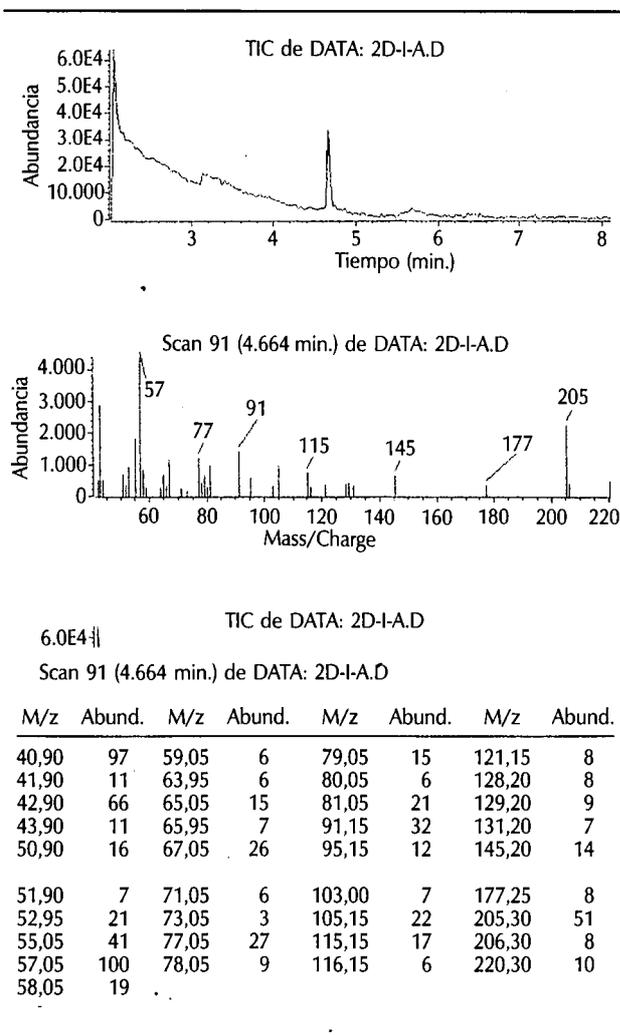


Fig. 7.—Espectro de masas en acetona del pico 2D.

tancias a estudiar y deficiencia en los métodos de purificación y clarificación.

Por otra parte, dada la extrema diversificación de las técnicas utilizadas, es absolutamente imposible coordinar los resultados obtenidos por diferentes autores.

Diferentes trabajos¹⁰⁻¹² han comprobado la presencia clara de cinco picos de elución bien diferenciados tanto antes como después de la hemodiálisis.

Los obtenidos por nosotros aparecen algo difusos, quizá porque su peso molecular no llega a los 300 daltons, estando por debajo del rango de las medianas moléculas, aunque la definición de Schoots¹ al respecto es lo suficientemente ambigua como para poder incluir nuestros compuestos en este campo molecular.

El término general de moléculas medias puede crear confusión generalmente si admite que el peso medio de estas moléculas medias está entre 500-5.000 daltons sin

embargo, todos los compuestos aislados tienen un peso medio alrededor de 500 daltons o menos^{5,7}, hecho que concuerda con los datos que hemos obtenido.

Encontramos una disminución en la absorbencia de las medianas moléculas del pico 2 antes y después de la hemodiálisis, pasando de 0,805 a 400, respectivamente (figs. 1 y 2).

Esta disminución no es encontrada por otros autores debido quizás a que el tamaño de las medianas moléculas tradicionalmente aceptado es lo suficientemente grande para que su paso a través de la membrana de diálisis

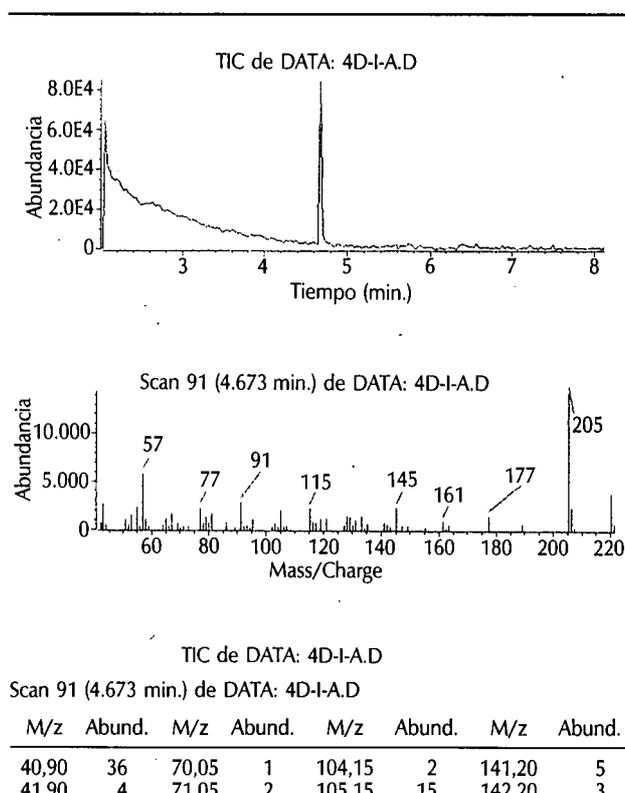


Fig. 8.—Espectro de masas en acetona del pico 4D.

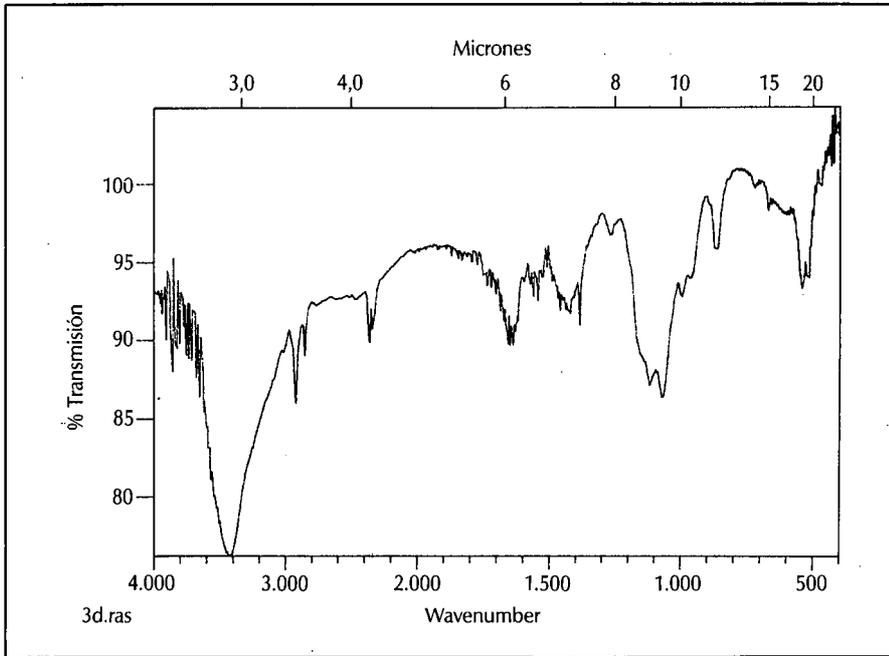


Fig. 9.—Espectro de infrarrojos de pico 2D.

sea mínima. Los compuestos que hemos aislado presentan un tamaño adecuado para poder atravesar en mayor medida una membrana que por sus características, como es el poliacrilonitrilo, es más permeable que las de cuprofan, aunque como vemos, no pueden ser eliminados en su totalidad.

El determinar previamente el peso medio de los componentes plasmáticos es primordial para poder valorar su

descenso durante la hemodiálisis; por ello otros autores^{13,14} describen una reducción de la concentración de las medianas moléculas durante la hemodiálisis y su recuperación a través del fluido de diálisis.

Tal como demuestran los cromatogramas de los picos 2D y 4D por intercambio iónico en gel DEAE Sephadex A-25 (figs. 4 y 5), ambos picos están compuestos por un solo componente, pero de distinta naturaleza al pre-

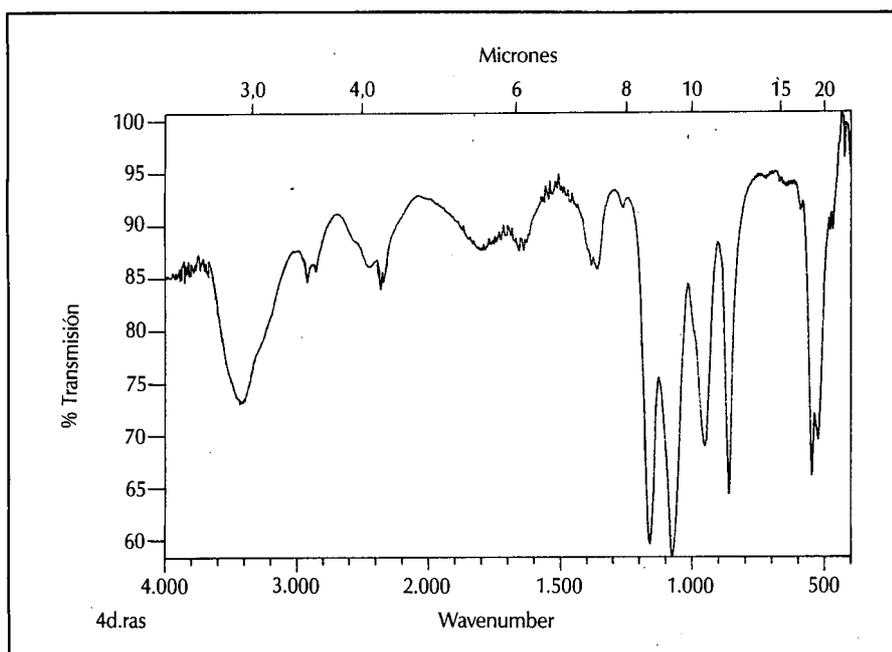


Fig. 10.—Espectro de infrarrojo del pico 4D.

sentar el mismo pH distintos grupos ionizables; sin embargo, el pico 1A (fig. 3) está compuesto por varios componentes al desdoblarse en varios picos; hasta cinco componentes distintos.

Los pesos moleculares de los picos 2D y 4D obtenidos por espectroscopia de masas son de 220 y 222 daltons, respectivamente (figs. 7 y 8), saliéndose del rango tradicional de las medianas moléculas.

Los resultados obtenidos en el espectro de infrarrojo para ambos picos 2D y 4D (figs. 9 y 10) nos indican que la naturaleza de los compuestos de bajo peso molecular no son compuestos de naturaleza peptídica como se indica en otros trabajos^{5,6}, debido a la aparición en el infrarrojo de vibraciones correspondientes a grupos carboxílicos y amínicos terminales. Los resultados obtenidos en el espectro de infrarrojo no los hemos podido comparar con otros resultados del mismo tipo realizados por otros autores, ya que no hemos encontrado bibliografía al respecto. No podemos correlacionar los resultados obtenidos en el espectro de masas con los del infrarrojo. Para poder dilucidar con mayor precisión la estructura de estos componentes habría que disponer de los espectros completos de resonancia magnética del protón y del carbono 13 con el de UV para ratificar la existencia de determinados cromóforos en los nuestros.

Siendo un campo de investigación el de las medianas moléculas tan amplio y tan estudiado hace una década, seguimos sin conocer la naturaleza química de las medianas moléculas en su gran mayoría, por lo que sería deseable que cada laboratorio al realizar sus propios protocolos específicos de purificación adaptara un sistema de referencia cromatográfica, el cual debe tener la técnica de Fürst (159 o algunas de las modificaciones propuestas por Cueille¹⁶ o Chapman¹⁷).

Bibliografía

1. Schoots A, Mikkers F, Cramers C, De Smet R y Ringoir S: Uremic toxins and the elusive middle molecules: *Nephron*, 38:1-8, 1984.
2. Mabuchi H y Nakahashi H: Medium-sized peptides in the blood of patients with uremia. *Nephron*, 33:232-237, 1983.
3. Delaporte G, Gros F y Anagnostopoulos T: Inhibitory effects of plasma dialyate on protein synthesis in vitro: influence of dialysis and transplantation. *Am J Clin Nutr*, 33:1407-1412, 1980.
4. Kuriyama M, Mizuma A, Jokomine R e Igata A: Eritrocytetransketilase activity in uremia. *Clin Chim Acta*, 108:169-176, 1980.
5. Abiko T, Onodera I y Sekino H: Isolation, structure and biological activity of the Trp-containing pentapeptide from uremic fluid. *Biochem Biophys Res Commun*, 89:813-821, 1979.
6. Migone L, Dall'Aglio P y Buzio C: Middle molecules in uremic serum, urine and dialysis fluid. *Clin Nephrol*, 3:82-93, 1975.
7. Cueille G, Man NK, Sausse A, Farges JP y Frankbrentano JL: Further characterization of a neurotoxic uremic molecule. *Proc 8th Int Congr Nephrol*, pp. 606-617, Athens, 1981.
8. Zimmerman L, Bergström K y Jornvall H: A method for separation of middle molecules by high performance liquid chromatography: application in studies of glucuronyl-o-hydroxyhippurate in normal and uremic subjects. *Clinical Nephrology*, 25:94-100, 1986.
9. Bustamante J, Martín MC, Rocher A y Palencia A: Distribución plasmática de ciertos elementos traza y medianas moléculas en hemodiálisis. *Nefrología*, vol. II, 2:143-148, 1987.
10. Schoots A, Mikkers F, Claessee H, De Smet R, Laudschoot N y Ringoir S: Characterization of uremic «middle molecular» fractions by gas chromatography, mass spectrometry, isotachopheresis and liquid chromatography. *Clin Chem*, 28:45-49, 1982.
11. Schoots A, Mikkers F, Cramers C y Ringoir S: Profiling on uremic serum by high-resolution gas chromatography-electronimpact chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr*, 164:1-8, 1979.
12. Zimmerman L, Baldesten A, Bergström J y Fürst P: Isotachopheretic separation of middle molecule peptides in uremic body fluids. *Clin Nephrol*, 13:183-188, 1980.
13. Winchester J, Apiliga M y Kennedy A: Short-term evaluation of charcoal hemoperfusion combined with dialysis in uremic patients. *Kidney Int*, 10:315-320, 1976.
14. Bergström J, Asaba H, Fürst A, Oules R, Zimmerman L y Ward M: Dialysis and middle molecules (Abstract). *9th Congr Eur Dial Transpl Assoc*, p. 267, 1976.
15. Fürst P, Zimmerman L y Bergström J: Determination of endogenous middle molecules in normal and uremic body fluids. *Clin Nephrol*, 5:178-188, 1976.
16. Cueille G: Mise en évidence et évaluation des «moyennes molécules» de la taille de la vitamine B₁₂ présents dans les liquides biologiques de sujets normaux et de patients urémiques. *J Chromatogr*, 146:55-65, 1978.
17. Chapman C, Ward R y Farrell P: Separation and quantification of the «middle molecules» in uremia. *Kidney Int*, 17:82-88, 1980.