

Aislamiento y purificación de membranas plasmáticas de hígado de ratón C3HA. Comparación entre distintos métodos

J. W. DÍAZ, A. LAGE Y M. RAMOS

*Lab. de Bioquímica, Inst. de Oncología y Radiobiología, MINSAP,
Ciudad de la Habana, Cuba*

Recibido: 14 de noviembre de 1978

ABSTRACT. Experiments dealing with the isolation and purification of plasma membranes from C3HA mouse liver are reported. These were performed using analytical (in the density range of 1,14-1,20 g/cm³) or preparative sucrose gradients, employing different techniques for their development. The results are discussed in comparison with the data from other authors, analysing the effects produced by the homogenization and gradients techniques employed.

RESUMEN. Se presentan los resultados obtenidos en experimentos de aislamiento y purificación de membranas plasmáticas de hígado de ratón C3HA utilizando gradientes de sacarosa, analíticos en el rango de densidad 1,14-1,20 g/cm³ o preparativos empleando diferentes técnicas de preparación. Se discuten los resultados en comparación con los datos aparecidos en otros trabajos y se analizan los efectos producidos por las técnicas de homogeneización y gradientes empleadas.

INTRODUCCION

La membrana que rodea las células vivientes es un organelo de primerísima importancia en cuanto a las interacciones de la célula y su ambiente externo.

Algunas de esas alteraciones mantienen el medio intracelular en condiciones fisiológicas permitiendo la entrada de las sustancias necesarias y dejando salir los productos de desecho.

Las membranas se caracterizan por su enorme heterogeneidad no tan solo entre los diversos tipos celulares sino aun dentro de un mismo tipo celular y en una misma célula, dependiendo de su estado fisiológico y aún de su estadio dentro del ciclo celular (*Shoham y Sachs, 1974*).

Como parte de los trabajos de nuestro laboratorio en el aislamiento, purificación y estudio comparativo de las membranas plasmáticas proce-

dentos de tejidos normales y tumorales, analizamos el comportamiento de las membranas plasmáticas de hígado de ratón C3HA, animal portador del tumor trasplantable Hepatoma 22.

MATERIALES Y METODOS

Animales. Se emplearon ratones de la cepa C3HA mantenidos en condiciones de vivario, dichos ratones eran portadores de tumor subcutáneo sólido. El hígado normal de los animales tumorados fue utilizado como material de partida para el aislamiento y purificación de membranas plasmáticas. Este hígado puede ser considerado "normal" de acuerdo con algunos parámetros bioquímicos y biológicos de la evolución tumoral en estos animales (Quintero y Rengifo, 1975; Rodríguez y cols., 1973; Castillo y Beausoleil, 1976; Lage y cols., 1977b).

Los animales eran sacrificados entre los 8 y 12 días después del trasplante tumoral. El trasplante se realizaba en animales con un peso promedio de 20 g.

Preparación del material. Homogeneización. El tejido hepático era dividido en fragmentos pequeños con tijeras finas y sometido a homogeneización siguiendo la metodología descrita en publicaciones anteriores (Lage y cols., 1977a; Díaz y cols., 1979).

Todas las soluciones de homogeneización eran mantenidas a temperaturas entre 4 y 10°C durante el proceso y la homogeneización se realizaba en baño de hielo.

Soluciones de homogeneización. Se utilizaron como soluciones de homogeneización las descritas en un trabajo precedente (Díaz y cols., 1979) tanto para la realización de los gradientes continuos de sacarosa, como para los gradientes realizados según el método de Touster y cols., (1970), y el de Price y Baldwin, (1974).

Preparación del material de partida. Fracción subcelular nuclear. La fracción subcelular nuclear (N) fue preparada tal como ha sido descrito (Lage y cols., 1977a, b).

Gradientes de sacarosa. Para la preparación y análisis de las membranas procedentes del hígado de ratón C3HA se utilizaron gradientes analíticos continuos de sacarosa, gradientes discontinuos (preparativos) según el método de Touster y cols., (1970) y gradientes discontinuos

según el método de Price y Baldwin, (1974). En la preparación y composición de estos gradientes, las centrifugaciones en gradiente de densidad, extracción de las fracciones y mediciones bioquímicas se utilizaron los métodos y condiciones que han sido descritas con anterioridad (Díaz y cols., 1979).

Análisis de los datos. Los datos de los resultados obtenidos fueron analizados siguiendo la metodología descrita (Lage y cols., 1978) para la centrifugación en gradiente de densidad.

Todos los cálculos fueron realizados mediante la utilización de un programa de computadora en idioma Leal-F en la máquina CID-201B (Díaz y Lage, 1976). Esos cálculos eran la base para la realización de los histogramas utilizados en el análisis de los resultados.

RESULTADOS

La Fig. 1 muestra la distribución de densidad de la 5'Nucleotidasa, NADPH Citocromo C reductasa, DNA y proteínas totales en un experimento de gradiente continuo analítico. El 60% de la actividad de 5'Nucleotidasa y el 71% de la de NADPH Citocromo C reductasa no entraron en el gradiente. Las fracciones de ambas enzimas que entran en el gradiente muestran distribuciones de densidad claramente diferentes.

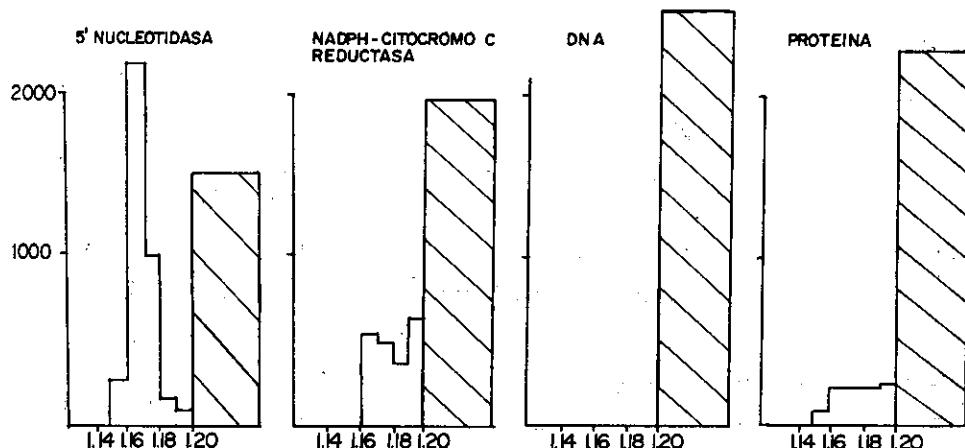


Fig. 1. Gradiente Continuo de flotación en hígado de ratón C3HA.

La 5'Nucleotidasa se concentra en la fracción normal (estándar) 1,16-1,17 g/cm³ purificada 10,2 veces con relación a la fracción nuclear de partida. En el experimento que se muestra la fracción resultó contaminada con un 5,6% de la actividad de NADPH Citocromo C reductasa.

La Fig. 2 muestra otro experimento similar en el que la cantidad de 5'Nucleotidasa que no entró en el gradiente se limita al 40%. En este experimento aunque se trataba de un gradiente continuo de sacarosa siguiendo la metodología referida, se ensayó una variante y se incluyeron en las soluciones de sacarosa con las que se hace el gradiente y en el medio de homogeneización las concentraciones salinas del método de Price y Baldwin (1974), es decir, NaCO₃H 1 mM, CaCl₂ 2 mM y MgCl₂ 2 mM. El pico de purificación se obtiene de nuevo en la fracción normal correspondiente al intervalo 1,16-1,17 g/cm³.

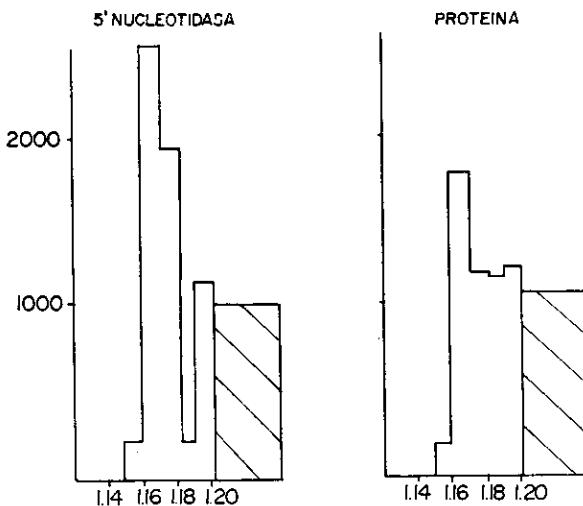


Fig. 2. Gradiente Continuo de flotación en hígado de ratón C3HA.

La Fig. 3 muestra comparativamente los experimentos en que se ensayaron los métodos preparativos de gradiente discontinuo según las metodologías utilizadas. En ambos se obtiene un pico similar de purificación de 5'Nucleotidasa en la densidad de 1,16 g/cm³. Sin embargo, la recuperación total es mucho mejor siguiendo el método de Price y

Baldwin (1974). Aunque ambos experimentos no fueron realizados en forma simultánea, dado que los parámetros de centrifugación en gradiente fueron similares, los datos comparativos de los mismos se han recogido en la Tabla I.

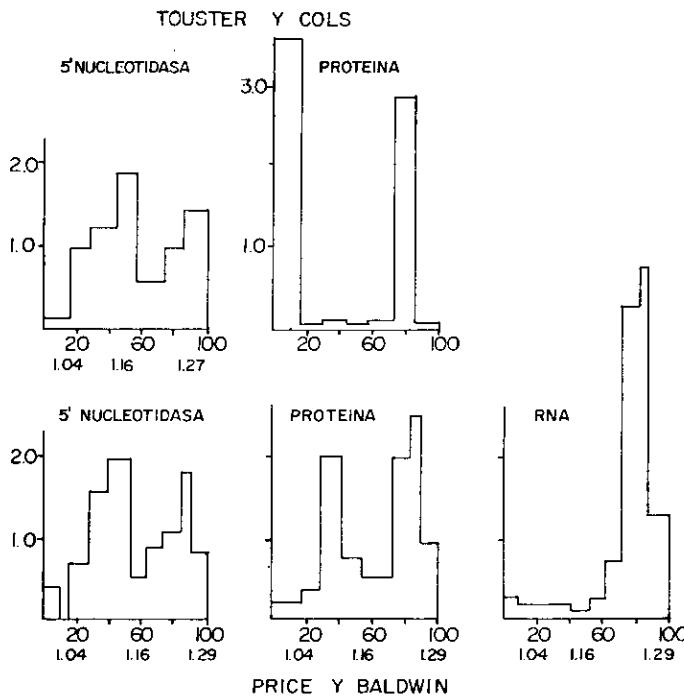


Fig. 3. Gradiente Discontinuo en hígado de ratón C3HA. (Comparación de Métodos).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La extrapolación de un procedimiento diseñado para un sistema biológico a otro sistema no siempre es válida y el procedimiento debe ser reevaluado completamente. Este principio es especialmente valedero en lo referente a los métodos de purificación de membranas plasmáticas, la mayoría de los cuales han sido elaborados para membranas de hígado

de rata e inclusive más específicamente para la cara biliar de la membrana plasmática del hepatocito (Neville, 1960).

Los diferentes tipos de células tienen en general composiciones y propiedades diferentes de sus membranas y una polaridad celular distinta. No obstante, en este caso, tratándose de igual tejido y en especies relacionadas intentamos la extrapolación de los métodos utilizados en otros trabajos (Díaz y cols., 1979) para la purificación de las membranas plasmáticas del hígado de ratón C3HA.

TABLA I

Comparación de métodos en hígado de ratón C3HA

Dato	Touster y Cols.	Price y Baldwin
Posición del Pico de actividad de 5'Nucleotidasa.	1,16 g/cm ³	1,16 g/cm ³
Purificación.		
% Enzima/ % Proteína.	27,60	2,60
AER de la fracción pico con respecto a la muestra inicial.	0,69	2,57
% de la actividad recuperada que se obtiene en la fracción pico.	24,30	23,70
% de la actividad de la muestra inicial que se obtiene en la fracción pico.	< 2,00	23,70
Recuperación total.		
% de 5'Nucleotidasa.	<10,00	103,90
Recuperación total.		
% de DNA.	<5,00	90,90
Recuperación total.		
% de RNA.	<10,00	120,70
Recuperación total.		
% de Proteína.	78,20	103,20

AER, Actividad Específica Relativa (ver texto). Todos los datos en que no se hace otra especificación están referidos a la distribución de la actividad de 5'Nucleotidasa.

Esta extrapolación cobra más validez al establecerse que la actividad de 5'Nucleotidasa en este tejido se asocia a los fragmentos de membrana que se distribuyen en los experimentos de fraccionamiento celular de manera similar a como lo hacen los fragmentos de membranas de hígado de rata (*Díaz y cols., 1977*).

Los resultados de los experimentos de centrifugación de equilibrio isópicnico en gradiente analítico continuo de sacarosa como el que se muestra en la Fig. 1, indican que el comportamiento de los fragmentos de membrana plasmática en hígado de ratón C3HA es similar al obtenido en hígado de rata. La actividad de 5'Nucleotidasa muestra un pico de purificación en la densidad 1,16-1,17 g/cm³ lo que coincide con los valores previamente reportados para otras cepas de ratón por otros laboratorios (*Emmelot y Benedetti, 1967*).

En esta fracción la actividad de 5'Nucleotidasa se concentró diez veces con relación a la fracción nuclear inicial y presentó muy poca contaminación de NADPH Citocromo C reductasa y ninguna de DNA.

Sin embargo, también la cantidad de 5'Nucleotidasa que entra en el gradiente es poca y el 60% de la actividad recuperada permanece en las capas densas del fondo del gradiente, fenómeno que ha sido anteriormente interpretado como artefacto de agregación al material nuclear (*Díaz y cols., 1979*).

En el experimento presentado en la Fig. 2 se procedió en forma similar al anterior, con la única diferencia de que se introdujeron en las soluciones de sacarosa con las que se hace el gradiente y en el medio de homogeneización, las concentraciones salinas propuestas por Price y Baldwin (1974) tal como se describió en el trabajo precedente citado y ajustando el pH a 7,6 en lugar de 7,4.

Nótese que la fracción de la actividad de 5'Nucleotidasa que permanece en el fondo del gradiente disminuye a un 40% en tanto que el pico de purificación no modifica su posición.

En la Fig. 3 y la Tabla I se presentaron los resultados del ensayo comparativo de los dos métodos preparativos sometidos a evaluación. En estos experimentos la recuperación total (actividad de la suma de las fracciones entre actividad de la muestra inicial) es deficiente en el método de Touster y cols., (1970) por lo que el valor 27,6 de purificación

no debe tomarse como un índice absoluto de la pureza de la preparación.

Si se calcula la Actividad Específica Relativa (AER) de esa fracción, definida como el cociente entre la actividad específica en la fracción y la actividad específica en la muestra inicial, el resultado es 0,69 lo cual indica que no se obtuvo una concentración de la actividad enzimática en esa fracción.

Por el contrario aplicando este análisis al gradiente realizado según el método de Price y Baldwin (1974) se obtiene un pico de purificación con una AER de 2,6 y una recuperación total de 103,9%; la fracción de membranas contiene el 24% de la actividad total de 5'Nucleotidasa de la muestra y la contaminación con RNA es prácticamente nula.

Estas diferencias como han sido anteriormente discutidas (*Díaz y cols., 1979*) pueden ser atribuidas a la presencia de iones divalentes en la técnica de gradiente según Price y Baldwin (1974). Los resultados diferentes obtenidos utilizando la misma metodología de gradientes continuos de sacarosa, por el simple hecho de variar el contenido iónico de las soluciones de sacarosa utilizadas en el gradiente y las homogeneizaciones, refuerza según nuestro modo de ver aún más este criterio.

En general el comportamiento de los fragmentos de membrana plasmática de hígado de ratón C3HA es bastante similar al de hígado de rata, como era de esperar tomando en cuenta los resultados previos obtenidos en los experimentos de fraccionamiento celular (*Díaz y cols., 1977*).

En una primera aproximación parece posible intentar la extrapolación de los resultados obtenidos con hígado de rata a los hígados normales de ratones, pero siempre estableciendo las comparaciones correspondientes según los datos obtenidos en los resultados para verificar la validez de esta extrapolación.

REFERENCIAS

- CASTILLO R. Y BEAUSOLEIL I. Algunas características evolutivas del hepatoma 22 sólido y ascítico. Informe Secretaría Científica IOR, 1976.
- DÍAZ J. W. Y LAGE A. Programa de cálculo para experimentos de centrifugación en gradientes de densidad. I Congreso Nacional de Administración de Salud. MINSAP. La Habana. Octubre 1976.

- DÍAZ J. W., LAGE A. Y RAMOS M. Estructuras subcelulares del hepatoma 22, II Distribución intracelular de la glucosa 6 fosfatasa la NADH Citocromo C reductasa, la 5'Nucleotidasa y el colesterol. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 8, 35, 1977a.
- DÍAZ J. W., LAGE A. Y RAMOS M. Aislamiento y purificación de membranas plasmáticas de hígado de rata. Comparación entre distintos métodos. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 10, 1979.
- EMMELOT P. Y BENEDETTI E. L. On the possible involvement of the plasma membrane in the carcinogenic process. *Carcinogenesis: A Broad Critique*. 471-533. Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1967.
- LAGE A., DÍAZ J. W. Y RAMOS M. Estructuras subcelulares del hepatoma 22. I. Distribución intracelular de la Citocromo C oxidasa, la Succinato deshidrogenasa, la catalasa, proteínas y ácidos nucleicos. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 8, 23, 1977a.
- LAGE A., DÍAZ J. W. Y RAMOS M. Estructuras subcelulares del hepatoma 22. III Distribución intracelular de la fosfatasa ácida y la catepsina D. Discusión general del esquema de fraccionamiento. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas* 8, 297, 1977b.
- LAGE A., DÍAZ J. W. Y RAMOS M. Estructuras subcelulares del hepatoma 22. IV. Estudio de la fracción mitocondrial por centrifugación de equilibrio isópícnico en gradiente de densidad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 9, 1978.
- NEVILLE N. D. The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 413, 1960.
- PRICE M. R. AND BALDWIN R. W. Preparation of aminoazo-dye-induced rat hepatoma membrane fractions retaining tumor-specific antigen. *Br. J. Cancer* 30, 382, 1974.
- QUINTERO S. Y RENGIFO E. Estudio enzimo-histoquímico de algunas deshidrogenasas y NADH-diaforasa en el hepatoma 22 de ratón C3HA. Informe Secretaría Científica IOR 1975.
- RODRÍGUEZ I., PLATÓNNOVA G., GARCÍA J., RUISÁNCHEZ N., RAMOS S. Y ABASCAL M. E. Características citogenéticas de algunas cepas de tumores trasplantables de ratones y ratas. Resúmenes IV Seminario Científico CENIC. 290. La Habana. Diciembre 1973.
- SHOHAM J. AND SACHS L. Different cyclic changes in the surface membranes of normal and malignant transformed cells. *Exptl. Cell Res.* 85, 8, 1974.

no debe tomarse como un índice absoluto de la pureza de la preparación.

Si se calcula la Actividad Específica Relativa (AER) de esa fracción, definida como el cociente entre la actividad específica en la fracción y la actividad específica en la muestra inicial, el resultado es 0,69 lo cual indica que no se obtuvo una concentración de la actividad enzimática en esa fracción.

Por el contrario aplicando este análisis al gradiente realizado según el método de Price y Baldwin (1974) se obtiene un pico de purificación con una AER de 2,6 y una recuperación total de 103,9%; la fracción de membranas contiene el 24% de la actividad total de 5'Nucleotidasa de la muestra y la contaminación con RNA es prácticamente nula.

Estas diferencias como han sido anteriormente discutidas (*Díaz y cols., 1979*) pueden ser atribuidas a la presencia de iones divalentes en la técnica de gradiente según Price y Baldwin (1974). Los resultados diferentes obtenidos utilizando la misma metodología de gradientes continuos de sacarosa, por el simple hecho de variar el contenido iónico de las soluciones de sacarosa utilizadas en el gradiente y las homogeneizaciones, refuerza según nuestro modo de ver aún más este criterio.

En general el comportamiento de los fragmentos de membrana plasmática de hígado de ratón C3HA es bastante similar al de hígado de rata, como era de esperar tomando en cuenta los resultados previos obtenidos en los experimentos de fraccionamiento celular (*Díaz y cols., 1977*).

En una primera aproximación parece posible intentar la extrapolación de los resultados obtenidos con hígado de rata a los hígados normales de ratones, pero siempre estableciendo las comparaciones correspondientes según los datos obtenidos en los resultados para verificar la validez de esta extrapolación.

REFERENCIAS

- CASTILLO R. Y BEAUSOLEIL I. Algunas características evolutivas del hepatoma 22 sólido y ascítico. Informe Secretaría Científica IOR, 1976.
- DÍAZ J. W. Y LAGE A. Programa de cálculo para experimentos de centrifugación en gradientes de densidad. I Congreso Nacional de Administración de Salud. MINSAP. La Habana. Octubre 1976.

- DÍAZ J. W., LAGE A. Y RAMOS M. Estructuras subcelulares del hepatoma 22, II Distribución intracelular de la glucosa 6 fosfatasa la NADH Citocromo C reductasa, la 5'Nucleotidasa y el colesterol. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 8, 35, 1977a.
- DÍAZ J. W., LAGE A. Y RAMOS M. Aislamiento y purificación de membranas plasmáticas de hígado de rata. Comparación entre distintos métodos. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 10, 1979.
- EMMELOT P. Y BENEDETTI E. L. On the possible involvement of the plasma membrane in the carcinogenic process. *Carcinogenesis: A Broad Critique*. 471-533. Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1967.
- LAGE A., DÍAZ J. W. Y RAMOS M. Estructuras subcelulares del hepatoma 22. I. Distribución intracelular de la Citocromo C oxidasa, la Succinato deshidrogenasa, la catalasa, proteínas y ácidos nucleicos. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 8, 23, 1977a.
- LAGE A., DÍAZ J. W. Y RAMOS M. Estructuras subcelulares del hepatoma 22. III Distribución intracelular de la fosfatasa ácida y la catepsina D. Discusión general del esquema de fraccionamiento. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas* 8, 297, 1977b.
- LAGE A., DÍAZ J. W. Y RAMOS M. Estructuras subcelulares del hepatoma 22. IV. Estudio de la fracción mitocondrial por centrifugación de equilibrio isópícnico en gradiente de densidad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 9, 1978.
- NEVILLE N. D. The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 413, 1960.
- PRICE M. R. AND BALDWIN R. W. Preparation of aminoazo-dye-induced rat hepatoma membrane fractions retaining tumor-specific antigen. *Br. J. Cancer* 30, 382, 1974.
- QUINTERO S. Y RENGIFO E. Estudio enzimo-histoquímico de algunas deshidrogenasas y NADH-diaforasa en el hepatoma 22 de ratón C3HA. Informe Secretaría Científica IOR 1975.
- RODRÍGUEZ I., PLATÓNNOVA G., GARCÍA J., RUISÁNCHEZ N., RAMOS S. Y ABASCAL M. E. Características citogenéticas de algunas cepas de tumores trasplantables de ratones y ratas. Resúmenes IV Seminario Científico CENIC. 290. La Habana. Diciembre 1973.
- SHOHAM J. AND SACHS L. Different cyclic changes in the surface membranes of normal and malignant transformed cells. *Exptl. Cell Res.* 85, 8, 1974.

TOUSTER O., ARONSON JR. N. N., DULANEY J. T. AND HENDRICKSON H. Isolation of rat liver plasma membranes. Use of nucleotide pyrophosphatase and phosphodiesterase I as marker enzymes. *J. Cell Biol.* 47, 604, 1970.