

Estructuras subcelulares del hepatoma 22. III. Distribución intracelular de la fosfatasa ácida y la catepsina D. Discusión general del esquema de fraccionamiento

A. LAGE, J. W. DÍAZ Y M. RAMOS

*Lab. Bioquímica, Instituto Nacional de Oncología
y Radiobiología, MINSAP, La Habana, Cuba*

Recibido: 16 de junio de 1976

ABSTRACT. The distributions of the acid hydrolases Cathepsin D and Acid phosphatase in tissue fractionation experiments, carried out by differential centrifugation simultaneously in Hepatoma 22 and in the non-neoplastic liver of host mice, are presented. Both enzymes show a similar distribution with a peak of purification in the L fraction, in both tissues the relative amount of Acid phosphatase in the microsomal fraction is greater than that of Cathepsin D in the same fraction. An increase in the relative amount of non-sedimentable Cathepsin D in the tumor is also observed. The results shown the presence of lysosomes in these tissues. A general discussion about the value of the fractionation scheme used, is presented.

RESUMEN. Se describen las distribuciones de las hidrolasas ácidas, Catepsina D y Fosfatasa ácida en experimentos de fraccionamiento celular por centrifugación diferencial realizados simultáneamente en Hepatoma 22 y en el hígado no-tumoral del ratón portador. Ambas enzimas muestran una distribución similar con un pico de purificación en la fracción L, en ambos tejidos la Fosfatasa ácida muestra un % de su actividad total en la fracción microsomal mayor al correspondiente para la Catepsina D. Se aprecia además un aumento en la proporción de Catepsina D no sedimentable. Los resultados muestran la presencia de lisosomas en estos tejidos. Se presenta una discusión general sobre el valor del esquema de fraccionamiento empleado.

INTRODUCCION

El hepatoma 22 es un tumor trasplantable originalmente quimioinducido por ortoaminoazotoluol y mantenido posteriormente por trasplante subcutáneo en la cepa de ratones isogénicos C3HA. Este tumor se emplea

frecuentemente como modelo para la investigación terapéutica en Oncología y sin embargo no ha sido objeto de un extenso estudio bioquímico, como lo han sido por ejemplo los hepatomas Morris de la rata (*Morris, 1965; Hruban y cols., 1972*). El presente trabajo forma parte de un estudio de las estructuras subcelulares de este tejido, en comparación con el hígado del ratón portador, mediante la técnica de fraccionamiento celular por centrifugación diferencial efectuada simultáneamente en ambos tejidos. Presentamos en este trabajo la distribución intracelular de dos hidrolasas ácidas y una discusión de conjunto sobre el valor del esquema de fraccionamiento empleado.

MATERIALES Y METODOS

La obtención del tejido, homogeneización, centrifugación y procesamiento de los datos se efectuó como ha sido previamente descrito (*Lage y cols., 1975 y 1976*). La actividad de Fosfatasa ácida se estimó a través de la liberación de fosfato del B-glicerofosfato a pH 5.0 en presencia del Tritón X-100, siguiendo esencialmente la técnica descrita por Bowers y cols., (1967). La actividad de Catepsina D se estimó a través de la liberación de péptidos solubles en TCA al 5% a partir de hemoglobina bovina, como sustrato, desnaturalizada a pH 3.6 y en presencia de Tritón X-100, siguiendo fundamentalmente el método descrito por Gianetto y De Duve, (1955). Ambas técnicas fueron objeto de un estudio cinético previo para verificar su linealidad. La proteína se cuantificó por el método de Lowry y cols., (1951). Para la Fosfatasa ácida se hicieron mediciones de actividad libre, ésta consiste en un test al cual se añade sacarosa suficiente para una concentración final de 0.25 M en la mezcla de incubación y una reducción del tiempo de incubación a 10 minutos. Este tipo de test en ausencia de detergente mide la actividad manteniendo la integridad de las estructuras subcelulares.

El experimento de latencia que se describe en la Fig. 2, consistió en mediciones de actividad de Fosfatasa ácida con incubación corta (10 minutos) y medio isotónico (sacarosa 0.25 M) en presencia de diferentes concentraciones de Tritón X-100.

Las distribuciones porcentuales se compararon con un test de diferencia de medias para pequeño muestreo (*t* de Student) considerando significativa toda diferencia con una probabilidad inferior al 5% en hipótesis nula.

RESULTADOS

La Tabla I muestra los valores de actividad total para ambas enzimas, tomando como tal la suma del contenido en las fracciones N y E (nuclear y sobrenadante postnuclear, respectivamente), expresados en unidades por gramos de tejidos.

TABLA I
Distribución de las hidrolasas ácidas

Enzima	Tejido	(n)	Contenido total	% en N	% en M	% en L	% en P	% en S
Fosfatasa ácida	H	3	1.46(0.4) ^b	5.7(1.1) ^d	44.0(10.0)	17.0(10.0)	14.1(7.2)	18.5(15.3)
(3.1.3.2)	T	4	0.55(0.1)	20.7(9.4)	27.9(13.9)	16.0(8.3)	15.2(8.9)	20.1(3.4)
Catepsina D	H	5	4.77(3.9) ^d	4.9(3.2) ^d	45.7(10.6)	23.5(15.6)	4.5(3.7)	21.4(18.0)
(3.4.4.23)	T	4	1.29(0.9)	11.0(3.5)	31.5(14.9)	13.2(4.5)	3.6(3.6)	40.9(12.1)

Tabla I. La Tabla muestra una comparación del contenido total de ambas hidrolasas ácidas y su distribución entre las 5 fracciones obtenidas en hígado y tumor. El dato de contenido total se da en unidades por gramo de tejido. Los datos de distribución están expresados en % tomando la suma de las fracciones como 100%. Entre paréntesis se da la desviación standard. n es el número de fraccionamientos. Las abreviaturas de las fracciones significan respectivamente: (N) fracción nuclear, (M) fracción mitocondrial, (L) fracción mitocondrial ligera, (P) fracción microsomal y (S) fracción soluble. Las letras b y d indican los pares de valores en los que la comparación hígado-tumor es estadísticamente significativa con valores de significación de 1% (b) y de 5% (d).

La Tabla da además la distribución porcentual de ambas enzimas entre las 5 fracciones. La Fig. 1 muestra los histogramas de distribución correspondientes. Ambas enzimas distribuyen sus actividades tanto en el hígado como en el tumor principalmente entre las fracciones mitocondriales M y L, presentando un pico de actividad específica relativa (AER), en la fracción mitocondrial ligera (L). En las condiciones de homogeneización empleadas la actividad de Fosfatasa ácida es sedimentable en un 80%

en ambos tejidos, la Catepsina D es sedimentable en un 80% en hígado y en un 60% en el Hepatoma 22.

La Fig. 2 muestra el efecto del detergente no-iónico Tritón X-100 sobre la actividad libre de Fosfatasa ácida, mostrando el carácter latente de esta enzima.

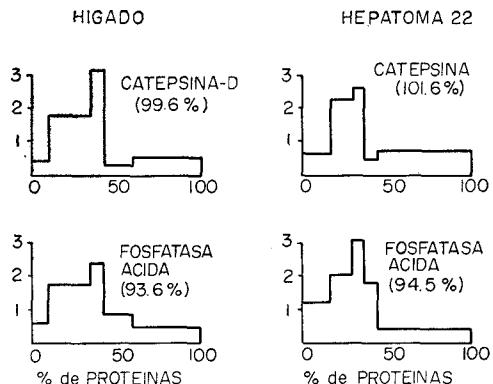


Fig. 1

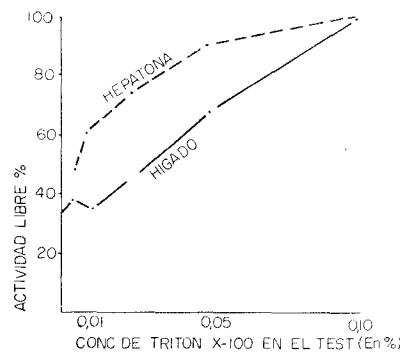


Fig. 2

Fig. 1. Histogramas de distribución de hidrolasas ácidas. Cada barra en un histograma representa una fracción, ordenadas de izquierda a derecha (N, M, L, P y S). La altura es la actividad Específica Relativa de la enzima en esa fracción, definida como el cociente entre el % de actividad enzimática en esa fracción y el % de proteínas en la fracción. La anchura de la barra corresponde al % de proteínas en la fracción. Cada histograma fue elaborado con los valores promedio de n fraccionamientos que se corresponde con los valores dados en la Tabla I. El número entre paréntesis es la recuperación promedio. La recuperación es el cociente entre la suma de la actividad en todas las fracciones y la suma de las fracciones N y E (sobrenadante postnuclear), que se toma como equivalente al homogenado inicial.

Fig. 2. Efecto del Tritón X-100 sobre la actividad de Fosfatasa ácida. La gráfica muestra el resultado de mediciones de la actividad de Fosfatasa ácida en homogenados totales de hígado y tumor con diferentes concentraciones del detergente no-iónico Tritón X-100 en el medio de incubación. La medición de actividad enzimática se efectúa con incubación de 10 minutos y en presencia de sacarosa 0.25 M, condiciones que garantizan la integridad lisosomal en ausencia del detergente.

El tejido tumoral muestra un contenido total de hidrolasas ácidas menor que el hígado y un % mayor en la fracción nuclear.

Las distribuciones de ambas hidrolasas en hígado se sobreponen en un 90% y una parte importante del 10% restante corresponde a una diferencia en la proporción de actividad hidrolásica en la fracción P, que es mayor para la Fosfatasa ácida que para la Catepsina D, estando tal diferencia en el límite de significación estadística.

Tal diferencia se distribuye entre las demás fracciones, en los histogramas (Fig. 1) puede notarse como la distribución de Fosfatasa ácida muestra un hombro en la fracción P (microsomal), tanto en hígado como en tumor, que no está presente en las distribuciones de Catepsina D.

Llama la atención que en el tejido tumoral las distribuciones de ambas hidrolasas ácidas se sobreponen sólo en un 76%. Además de la mencionada diferencia en la fracción P, que se repite en el Hepatoma 22, se observa un aumento en el % de Catepsina D en la fracción S del tejido tumoral (40.9% en S) que sí difiere significativamente del % de Fosfatasa ácida en esa misma fracción (21.4%).

DISCUSION

Lisosomas.

El criterio bioquímico de la existencia de lisosomas en un tejido, es decir, la presencia de varias hidrolasas ácidas de especificidad diferente, latentes, sedimentables con distribuciones similares y cuya latencia resulta liberada por procedimientos que desorganizan las membranas biológicas (detergentes, homogeneización amplia, etc.), se cubre completamente en hígado de ratón C3HA y en el Hepatoma 22. La distribución de estas hidrolasas en los fraccionamientos distingue experimentalmente las estructuras subcelulares a que se asocian, de las estructuras portadoras de Citocromo C oxidasa y Succinato deshidrogenasa que se concentran en la fracción M (*Lage y cols., 1976*) y de las estructuras portadoras de NADH-Citocromo C reductasa que se concentran en la fracción P (*Díaz y cols., 1976*). La presencia de un mayor % de ambas hidrolasas ácidas en la fracción N del tumor se interpreta como un artefacto por homogeneización incompleta. Las condiciones ideales de homogeneización, es decir, un 100% de células rotas con daño mínimo a las estructuras subcelulares

son en general imposibles de obtener con el homogeneizador de Potter-Elvehjem empleado, por lo que se acepta una solución de compromiso dada por más de un 70% de células rotas y menos de un 25% de Fosfatasa ácida libre.

En el tejido tumoral tales condiciones son aun más difíciles de lograr y en los fraccionamientos aparecen cantidades no despreciables de constituyentes lisosomales y microsómicos en la fracción nuclear, lo que se interpreta como indicador de la presencia de células enteras. En tales condiciones, el hacer una homogeneización más drástica redujo estos valores pero causó un considerable aumento del % de hidrolasas ácidas en la fracción S, indicador de daño lisosomal.

Distribución de la Fosfatasa ácida.

La diferencia entre el % de Fosfatasa ácida en la fracción microsomal (P) y el % de Catepsina D en la misma fracción no debe pasar inadvertida. Una posible explicación de este hecho sería considerar que parte de la actividad de Fosfatasa ácida estuviese en realidad asociada a las estructuras que se concentran en la fracción microsomal.

La Fosfatasa ácida es considerada un constituyente tipicamente lisosomal en varios tejidos normales (*de Duve y cols., 1955; Bowers y de Duve, 1967*) tumorales (*Wattiaux y Wattiaux-De Coninck, 1968*) y en células tumorales en cultivo (*López Saura, 1973*), no obstante, recientemente se ha sugerido una doble localización intracelular para la Fosfatasa ácida en células FL (*Rubio, 1975*) mitocondrial y microsomal, a partir de resultados similares a los nuestros. Esta posibilidad debe ser cuidadosamente evaluada por experimentos de latencia, ya que los resultados de nuestros fraccionamientos no bastan por sí solos para establecer una doble localización subcelular.

Hidrolasas ácidas no sedimentables. Merece especial atención el aumento del % de Catepsina D en la fracción S del tejido tumoral, que no se acompaña de un aumento similar de Fosfatasa ácida, resultados similares han sido reportados por Poole, (1973).

Si atribuimos como es usual, la actividad no sedimentable de hidrolasas ácidas a lisosomas rotos durante la homogeneización, el % en S debía ser similar para ambas enzimas. Resulta difícil atribuir esta diferencia a enzimas no lisosomales, dadas las condiciones en que se realiza la dosi-

ficación. Se ha reportado por otra parte que en hígado de rata los lisosomas constituyen una población de partículas más heterogéneas desde el punto de vista de sedimentación y densidad que las demás estructuras que separa el esquema de fraccionamiento (*Beaufay y cols., 1964*).

Tal heterogeneidad puede contribuir a esta diferencia de distribuciones, pero debe tenerse también en cuenta la posibilidad de que tal diferencia se deba a la presencia de actividad de Catepsina D en el espacio intercelular. Experimentos actualmente en curso en nuestro laboratorio indican la presencia de Catepsina D en el líquido intercelular de tumores ascíticos y en el medio de cultivo de siembras primarias de Hepatoma 22, que no se acompañan en una proporción equivalente, de actividad de Fosfatasa ácida. La discusión de esos resultados en función de la posibilidad de exocitosis en las células tumorales depende del resultado de nuevos experimentos actualmente en ejecución en nuestro laboratorio.

Evaluación del esquema de fraccionamiento.

Las Figs. 3 y 4 dan una visión de conjunto de las distribuciones obtenidas para los constituyentes químicos y enzimáticos estudiados en este trabajo y en los precedentes (*Lage y cols., 1976; Díaz y cols., 1976*).

En el hígado de ratón C3HA se aprecian claramente 5 tipos de distribuciones representadas por:

El DNA, de distribución nuclear (N).

Las oxidoreductasas mitocondriales, Citocromo C oxidasa y Succinato deshidrogenasa, que se concentran en la fracción mitocondrial pesada (M).

Las hidrolasas ácidas, Fosfatasa ácida y Catepsina D, que se concentran en la fracción mitocondrial ligera (L).

Los marcadores de retículo endoplásmico, Glucosa 6 fosfatasa y NADH-Citocromo C reductasa, de distribución microsomal (P).

La 5' Nucleotidasa y el Colesterol que muestran una distribución bimodal (N y P).

Grupos similares de asociación se obtienen en el tejido tumoral con las diferencias que han sido previamente discutidas. Tales distribuciones se han obtenido con el esquema de fraccionamiento diseñado por de Duve y cols., (1955), para hígado de rata. La técnica de fraccionamiento

celular es esencialmente un método analítico y como tal no tiene que plantearse obtener grandes purificaciones sino solamente ser suficiente para definir diferencias en las distribuciones que permitan identificar distintos grupos de asociación de enzimas, constituyentes químicos o funciones cualesquiera.

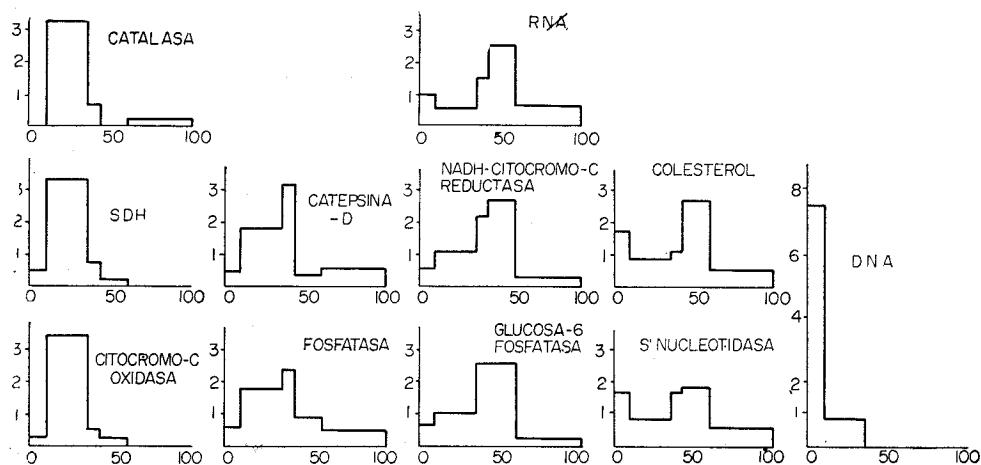


Fig. 3. Histogramas de distribución en hígado. Cuadro General. La figura da una visión global del comportamiento de 11 constituyentes químicos y enzimáticos en el experimento de fraccionamiento. Las distribuciones no discutidas en el texto han sido tomadas de los trabajos precedentes (Lage y cols., 1976; Díaz y cols., 1976).

La interpretación de cada histograma es la misma descrita en la Fig. 1.

En principio, los coeficientes de sedimentación mínimos (Smin) para cada fracción pueden ser completamente arbitrario y no tener ninguna equivalencia con las estructuras subcelulares de la célula intacta. En este sentido la extrapolación hecha del esquema de hígado de rata al ratón C3HA y al Hepatoma 22 es completamente válida y como se aprecia en las Figs. 3 y 4 es posible distinguir grupos de asociación y el experimento brinda una información similar a la que puede ofrecer en el tejido para el que fue diseñado. Sin embargo, el esquema de 5 fracciones aplicado además de su valor analítico tiene cierto valor preparativo y se emplea con frecuencia como paso inicial en la purificación de organelos.

La técnica ha sido definida por su autor como analítica-seudopreparativa (*de Duve, 1965*).

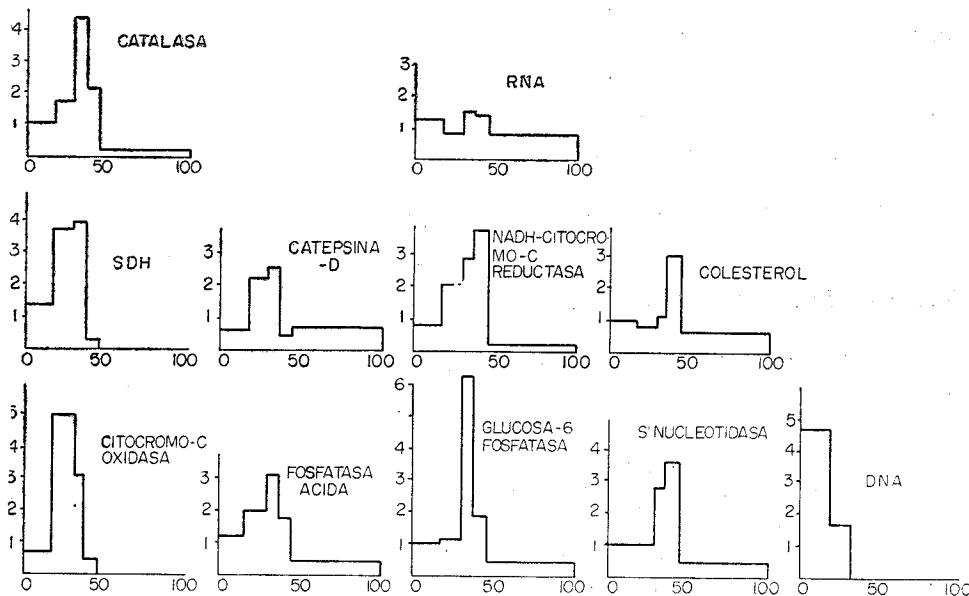


Fig. 4. Histogramas de distribución en hepatoma 22. Cuadro General. La figura da una visión global del comportamiento de 11 constituyentes químicos y enzimáticos en el experimento de fraccionamiento. Las distribuciones no discutidas en el texto han sido tomadas de los trabajos precedentes (Lage y cols., 1976; Díaz y cols., 1976).

La interpretación de cada histograma es la misma descrita en la Fig. 1.

Si analizamos nuestras distribuciones en función de este segundo propósito observamos los mismos picos de purificación característicos, lo que permite aceptar el esquema como una primera aproximación. No obstante, con un propósito preparativo las separaciones logradas no son buenas y la adecuación del esquema para hígado de ratón C3HA requeriría:

Disminuir el Smin de la fracción nuclear, para reducir el % de DNA en la fracción M. Esto permitiría además aumentar la actividad específica

relativa de las enzimas mitocondriales en M al disminuir la cantidad de proteína en esa fracción.

Aumentar el S_{min} de la fracción M para disminuir el % de hidrolasas ácidas lisosomales en M y aumentar la actividad específica relativa que se obtiene en la fracción L.

Probablemente otras modificaciones más serían necesarias, todo lo cual exige la determinación previa de los coeficientes de sedimentación de las estructuras subcelulares de este tejido, cosa esta que escapa del propósito de este trabajo. El esquema aplicado es útil para una comparación inicial entre hígado y tumor y fue con ese fin que se empleó.

Valor de la comparación hígado-tumor.

El hígado del animal portador de un tumor trasplantado en el tejido subcutáneo dorsal no es propiamente un hígado "normal" y pudiera ponerse en duda su valor como control bioquímico del tejido tumoral. Sin embargo, el Hepatoma 22 es un tumor de baja frecuencia de metástasis (28%) y la metástasis hepática es particularmente rara, en nuestro medio el % de metástasis en hígado es cero y las metástasis en cualquier otro órgano antes de los 12 días del trasplante son también nulas (*Castillo y Beausoleil, 1976*). El hígado empleado no es, por tanto, foco de enfermedad neoplásica y sus cambios con relación al hígado normal pueden derivar de alteraciones en los mecanismos homeostáticos sistémicos del animal.

Tales cambios afectan también al propio tejido tumoral y desde este punto de vista el hígado del animal portador sería un mejor control para estudios bioquímicos que el hígado del animal completamente sano.

Sin embargo, también es cierto que la respuesta del tejido hepático en las enfermedades depauperizantes como las neoplasias malignas presenta rasgos particulares derivados del papel central de este órgano en el metabolismo. En humanos se han reportado alteraciones de la función hepática en tumores extrahepáticos no metastásicos (*Basu y cols., 1974*), aunque este aspecto de las enfermedades neoplásicas requiere un estudio más detallado.

Los resultados presentados están obviamente sujetos a cualquier reserva que derive de este tipo de razonamiento. No obstante, estudios previos

con hepatomas Morris (*Cornbleet y cols.*, 1974) han establecido que el hígado del animal portador no difiere del normal, al menos en lo referente a las propiedades y funciones que se exploran actualmente con las técnicas de fraccionamiento celular.

RECONOCIMIENTOS

La realización de este trabajo y los anteriores publicados de la misma serie contó con la valiosa cooperación del Servicio de Tumores Trasplantables del INOR, dirigido por el Lic. Raúl Castillo. El Cro. Gilberto Yanez, dibujante del INOR, tuvo a su cargo la copia de los gráficos que acompañan todos los trabajos. Las facilidades brindadas por el Centro de Cálculo del CENIC para la puesta a punto del programa de cálculo y el procesamiento de los datos fueron igualmente valiosos para la realización de estos trabajos. La asistencia técnica brindada por la Cra. Mercedes Base en la realización de parte de estos trabajos es igualmente reconocida.

REFERENCIAS

- BASU T. K., RAVEN R. W. AND WILLIAMS D. C. Some metabolic functions of liver in patients with advanced non-hepatic cancer. *Oncology* 29, 417, 1974.
- BEAUFAY H., JACQUES P., BAUDHUIN P., SELLINGER O. Z., BERTHER J. AND DE DUVE C. Tissue fractionation studies 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *Biochem. J.* 92, 184, 1964.
- BOWER W. E. AND DE DUVE C. Lysosomes in lymphoid tissues II. Intracellular distribution of acid hydrolases. *J. Cell. Biol.* 32, 339, 1967.
- BOWER W. E., FINKENSTAEDT J. T. AND DE DUVE C. Lysosomes in lymphoid tissue I. The measurement of hydrolytic activities in whole homogenates. *J. Cell. Biol.* 32, 325, 1967.
- CASTILLO R. Y BEAUSOLEIL I. Algunas características evolutivas del hepatoma 22 sólido y ascítico. En preparación para publicación, 1976.
- CORNBLEET P. J., VORBECK M. L., LUCAS F. V., ESTERLY J. A., MORRIS H. P. AND MARTÍN A. P. Differences in distribution pattern of marker enzymes among subcellular fractions from Morris hepatoma 16. *Cancer Res.* 34, 439, 1974.
- DE DUVE C. The separation and characterization of subcellular particles. *The Harvey Lectures Series* 59, 49, 1965.

- DE DUVE C., PRESSMAN B. C., GIANETTO R., WATTIAUX R. AND APPELMANS F. Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604, 1955.
- 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* (en publicación).
- GIANETTO R. AND DE DUVE C. Tissue fractionation studies 4. Comparative study of the binding of acid phosphatase, glucuronidase and cathepsin by rat liver particles. *Biochem. J.* 59, 433, 1955.
- HRUBAN Z., MOCHIZUKI Y., SLESERS A. AND MORRIS H. P. A comparative study of cellular organelles of Morris hepatomas. *Cancer Res.* 32, 853, 1972.
- LAGE A., DÍAZ J. W., PÉREZ A. J. Y RAMOS M. Enzimas marcadoras en el hepatoma 22. Archivos Cubanos de Oncología y Radiobiología, 2, 142, 1975.
- 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*.
- LÓPEZ SAURA P. Estudio bioquímico de los organelos subcelulares de hepatoma de rata en cultivo de tejido. Tesis de Maestría, CENIC, La Habana, 1973.
- LOWRY D. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
- MORRIS H. P. Studies on the development, biochemistry and biology of experimental hepatomas. *Advan. Cancer Res.* 9, 227, 1965.
- POOLE A. R. Tumour lysosomal enzymes and invasive growth. En: Dingle J. T. (Ed.) *Lysosomes in Biology and Pathology*, No. 3, 303-337, North-Holland Publishing Co., Amsterdam-London, 1973.
- RUBIO BERNAL E. Fraccionamiento celular de la línea FL. Tesis de Especialidad, CENIC, La Habana, 1975.
- WATTIAUX R. AND WATTIAUX-DE CONICK S. Particules subcellulaires dans les tumeurs I. Distribution intracellulaire de la cytochrome oxidase, la glucose-6-phosphatase, la catalase, et plusieurs hydrolases acides dans un hépatome chimique transplantable (HW). *Europ. J. Cancer* 4, 193, 1968.