

Centro de Investigaciones Biológicas «Félix Huarte»  
Universidad de Navarra  
Pamplona

## Análisis antigénico de fracciones subcelulares hepáticas \*

por

J. M. Arcos, C. Álvarez-Moreno, A. Chordi, J. J. Vázquez,  
J. M. Macarulla y E. Santiago

(Recibido para publicar el 26 de junio de 1967)

Se conoce desde hace tiempo la especificidad antigénica de las fracciones subcelulares aisladas de tejidos normales y tumorales (5, 12, 16, 28). El tejido hepático de la rata es uno de los más estudiados (3, 4, 6, 9, 15, 19, 22, 25, 26, 27, 29) y recientemente ha sido objeto de una revisión (7). Se aprecia la necesidad de un estudio simultáneo de la célula hepática y de sus fracciones, así como la búsqueda de un sistema de identificación de las proteínas antigénicas que permita su individualización.

El objeto del presente trabajo es intentar conocer el complejo patrón antigénico del hígado, las proteínas comunes con el suero humano y con otros órganos, las que componen cada fracción subcelular y, aún más, las específicas de cada una. Ha sido también objeto de nuestro interés el estudio de las posibles diferencias antigénicas entre las membranas externas e internas de las mitocondrias, previa separación de las mismas. Finalmente, intentamos elaborar un sistema que nos permitiese la identificación e indivi-

dualización del complejo conglomerado de antígenos hepáticos en relación con la movilidad electroforética, sus características en inmunoelectroforesis, su naturaleza química y su presencia en suero, riñón y fracciones subcelulares de hígado.

### Material y métodos

Se utilizaron ratas macho de la raza Wistar, de un peso aproximado de 375 g, sometidas a ayuno durante 15 horas y posteriormente decapitadas. Los hígados (peso medio, 12-15 g) fueron extraídos inmediatamente e introducidos en una solución de sacarosa 0,25 M, mantenida en baño de hielo. Luego fueron homogeneizados en 8 volúmenes de sacarosa 0,25 M con un triturador de vidrio de Elvehjem-Potter.

\* El presente trabajo ha sido parcialmente realizado gracias a una subvención de Investigación concedida por la Asociación Española contra el Cáncer, para 1967.

**AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS.** — Las mitocondrias se aislaron por el método de HOGEBOM (10) ligeramente modificado. El homogeneizado de hígado de rata se centrifugó a  $850 \times g$  durante 10 minutos a  $0^\circ C$  con el fin de eliminar núcleos y restos de tejido. El sobrenadante se centrifugó a  $8.500 \times g$  durante 10 minutos a  $0^\circ C$ . El sedimento así obtenido fue resuspendido tres veces consecutivas en sacarosa  $0,25 M$ , y centrifugado a  $8.500 \times g$  durante 10 minutos a  $0^\circ C$ . El sedimento final constituía la fracción mitocondrial.

**AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN MICROSOMAL Y FRACCIÓN CITOPLASMÁTICA SOLUBLE.** El homogeneizado de hígado de rata se centrifugó a  $15.000 \times g$  durante 10 minutos a  $0^\circ C$ , con lo que se consiguió eliminar núcleos, mitocondrias y restos de tejido. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a  $100.000 \times g$ , durante 60 minutos a  $0^\circ C$ . El sobrenadante constituía la fracción citoplasmática soluble. El sedimento se lavó con disolución amortiguadora de veronal a  $pH 8,6$  y se sometió a una centrifugación de  $100.000 \times g$ , durante 10 minutos a  $0^\circ C$ . El sedimento constituía la fracción microsomal.

**SEPARACIÓN DE MEMBRANAS EXTERNAS E INTERNAS DE MITOCONDRIAS.** — Se efectuó siguiendo el método de PARSONS y colaboradores (17), ligeramente modificado. La fracción mitocondrial se incubó durante 20 minutos a  $4^\circ C$  en una disolución de fosfato  $0,02 M$ ,  $pH 7,4$  con  $0,02 \%$  de albúmina bovina recristalizada. Después de la rotura de la membrana externa de las mitocondrias, la suspensión se sometió durante 20 minutos a  $35.000 \times g$ . El sedimento fue resuspendido en la misma disolución y centrifugado a  $1.900 \times g$  durante 15 minutos para separar las membranas internas. El sedimento así obtenido se lavó tres veces hasta dar un sedimento final constituido por las membranas internas. El sobrena-

dante resultante de la centrifugación a  $1.900 \times g$  se sometió a  $35.000 \times g$  durante 20 minutos para concentrar las membranas externas. El sedimento fue resuspendido en 4 ml de tampón fosfato  $0,02 M$ ,  $pH 7,4$ . Cada mililitro de esta suspensión fue colocado cuidadosamente en un gradiente discontinuo formado por tres capas de 3 ml cada una de sacarosa al  $51,3, 37,7$  y  $25,2 \%$ . Después de 60 minutos de centrifugación a  $115.000 \times g$  a  $0^\circ C$  se encontraron tres bandas opalescentes y un sedimento. La capa intermedia fue recogida, diluida cuatro veces y finalmente centrifugada a  $50.000 \times g$  durante 20 minutos a  $0^\circ C$ . El sedimento estaba formado por las membranas externas.

**MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.** — La fracción de mitocondrias completas fue estudiada en cortes finos y en contraste negativo. Los cortes finos fueron obtenidos de material incluido en Epon 812. El sedimento de mitocondrias se dividió en trozos de 1 mm de lado aproximadamente, los cuales fueron fijados en aldehído glutárico durante 18-20 horas a  $2^\circ C$  y tratados posteriormente en osmio, durante 1 hora. La deshidratación se hizo en acetona y la inclusión en Epon con un paso previo por óxido de propileno. Los cortes, obtenidos con un ultramicrotomo LKB, fueron contrastados con acetato de plomo y examinados con el microscopio electrónico Siemens Elmiskop IA, con un aumento que osciló entre 8.000 y 40.000 veces.

Por otra parte, las mitocondrias, así como las fracciones correspondientes de membranas externas e internas y los ribosomas, se estudiaron en contraste negativo, según la técnica de PARSONS y col. (17), ligeramente modificada. Los sedimentos de estas fracciones fueron resuspendidos en una solución  $0,25 M$  de sacarosa hasta obtener una suspensión ligeramente lechosa. A ésta se le añadió un volumen igual de tetróxido de osmio en tampón de fosfato y se mantuvo du-

rante media hora a 3° C. Las preparaciones fueron obtenidas depositando una pequeña gota de la suspensión sobre una rejilla cubierta con formvar. Con un papel de filtro se removió el exceso de líquido hasta dejar una fina película. Se añadió una gotita de ácido fosfotúngstico al 2 %, pH 7, se eliminó el exceso con papel de filtro, y se dejaron secar a temperatura ambiente, siendo luego examinados al microscopio electrónico entre 14.000 y 40.000 aumentos.

**PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS.** — Los antígenos de mitocondrias, fracción microsomal, membranas externas y membranas internas mitocondriales, se prepararon a partir de los respectivos sedimentos en tampón veronal, pH 8,6, fuerza iónica 0,017. La suspensión se sometió a la acción de un desintegrador ultrasónico MSE durante 6 minutos a 20 kilociclos/segundo. La suspensión final se ajustó a una concentración del 4 % de proteínas mediante la adición de tampón veronal pH 8,6.

**INMUNOSUEROS.** — Tres conejos machos de unos 3 kg de peso fueron inoculados con hígado normal de rata, en dos series de inoculaciones separadas por 15 días de intervalo. En cada serie se aplicaron 12 inyecciones subcutáneas en días alternos de 60 mg de peso seco de proteínas en coadyuvante incompleto de Freund. El inmunosuero de conejo antihígado normal de rata (anti-HNR) que dio el título más alto en la fase experimental se eligió para llevar a cabo el estudio intensivo. Presentó un título de anticuerpos de 1/5.000.000 por hemaglutinación pasiva de Boyden y de 1/32 por el método de Ouchterlony, según la técnica de KAGAN y NORMAN (11).

Para eliminar los anticuerpos contra las proteínas séricas, se efectuó la absorción con un volumen de suero de rata normal (SR) por cada 5 volúmenes del inmunosuero antihígado. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37° C y durante

18 horas a 4° C. Finalmente se centrifugó y el sobrenadante fue utilizado como inmunosuero antihígado absorbido con suero de rata,\* previo control de absorción por la técnica de inmunodifusión de Ouchterlony.

Los anticuerpos contra las proteínas del hígado comunes con el riñón, fueron absorbidos de forma similar con un volumen de homogeneizado de riñón normal de rata (RR) por cada 5 volúmenes de inmunosuero antihígado. El sobrenadante de la mezcla incubada se utilizó como inmunosuero antihígado absorbido con riñón de rata.\*\*

**INMUNOELECTROFORESIS.** — Fue utilizado, con algunas modificaciones, el micrométodo de inmunoelectroforesis desarrollado por SCHEIDEGGER (20). En una publicación previa (1) hemos descrito pequeños cambios en las condiciones físicas de la electroforesis que se lleva a cabo en tampón veronal pH 8,6 de fuerza iónica 0,0375 a 6 voltios/cm y 8 mA por cada porta.

La determinación del punto cero se realizó por las técnicas habituales mediante el empleo de soluciones de dextrano. Además de la tinción con rojo thiazina R para caracterización de proteínas, se emplearon rojo aceite O para lipoproteínas y reactivo de Schiff para polisacáridos de acuerdo con el método descrito por URIEL y GRABAR (23).

## Resultados

La figura 1 A es una representación esquemática de las bandas de precipitación encontradas en la inmunoelectroforesis del homogeneizado de hígado de rata frente al inmunosuero antihígado de rata. En el patrón inmunoelectroforético aparecieron 53 antígenos diferentes. En la inmunoelectroforesis del homogeneizado de hígado frente al inmunosuero

\* ANTI-HÍGADO (Abs. SR).

\*\* ANTI-HÍGADO (Abs. RR).

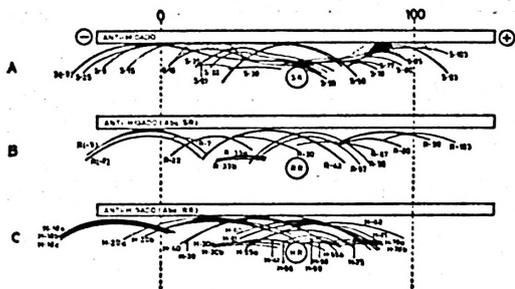


FIG. 1. Componentes antigénicos comunes con el suero (A), riñón (B) y propiamente hepáticos (C) revelados por inmunoelectroforesis. SR = suero de rata. RR = riñón de rata. HR = hígado de rata. El número de cada banda indica la movilidad electroforética relativa.

antihígado absorbido con riñón de rata (figura 1 C) se encontraron 22 bandas de precipitación correspondientes a antígenos hepáticos no comunes con el suero ni con el riñón de rata. La inmunoelectroforesis del homogeneizado de hígado frente al antihígado normal de rata absorbido con suero de rata demostró la presencia de 22 arcos de precipitación correspondientes a antígenos hepáticos y 14 comunes con el riñón (fig. 1 B). Las bandas se indican en los esquemas con una letra mayúscula, relativa a su origen (hepático, H; sérico, S; o comunes con el riñón, R), y un número que hace referencia a la movilidad electroforética relativa a la albúmina humana expresada en tanto por ciento. Distinguimos, por lo tanto, 17 antígenos comunes con el suero de la rata, 14 comunes con riñón y 22 presentes en hígado y ausentes del suero y riñón de rata normal. El análisis por inmunoelectroforesis de la fracción citoplasmática soluble se representa esquemáticamente en la figura 2. En esta fracción se encontraron 23 bandas de precipitación (fig. 2 A), de las cuales 6 eran hepáticas (fig. 2 C), 7 comunes con riñón (fig. 2 B) y 10 comunes con el suero. La fracción microsomal resultó ser muy

rica antigénicamente. Presentó un total de 27 antígenos (fig. 2 D), de los que 10 eran hepáticos, 8 comunes con riñón y 9 comunes con el suero.

La figura 3 muestra los resultados del análisis antigénico de las mitocondrias. La pureza de esta fracción se controló mediante microscopía electrónica (figura 4 A). Se encontraron 22 bandas de precipitación diferentes (fig. 3 A). De éstas, 9 eran comunes con el suero, 6 comunes con el riñón (fig. 3 B) y 7 no comunes ni con suero ni con riñón (figura 3 C).

La eficacia del método utilizado con las mitocondrias para separar las membranas externas de las internas fue pa-

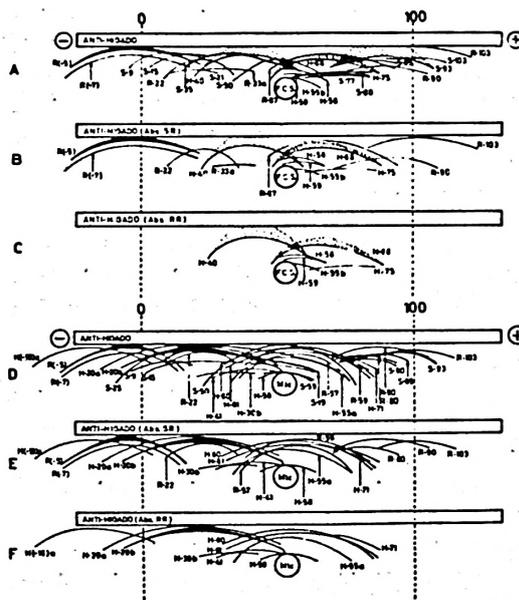


FIG. 2. Patrones inmunoelectroforéticos de la fracción citoplasmática soluble (FCS) y la fracción microsomal (Mic.) Esquemas A y D: Total de antígenos revelados por inmunosuero antihígado total. Esquemas B y E: Antígenos no séricos revelados con el inmunosuero absorbido con suero de rata. Esquemas C y F: Antígenos hepáticos no presentes en suero y riñón revelados con el inmunosuero absorbido con riñón. El número de cada banda indica la movilidad electroforética relativa.

tente. La figura 4 B es una reproducción fotográfica de la fracción de membranas internas, una de las cuales aparece en la figura 4 C. Las figuras 4 D y 4 E muestran membranas externas libres de mem-

branas internas con sus unidades fundamentales.

El análisis antigénico de las membranas reveló 15 bandas de precipitación en las internas (fig. 3 D) y 5 en las externas (fig. 3 G). Aparecen sólo 2 proteínas antigénicas comunes en ambas fracciones. Estas proteínas son también comunes con el suero y se designan en los esquemas como S-19 y S-93. Las membranas internas poseen 4 antígenos comunes con el riñón y 5 hepáticos. Ninguna de estas bandas aparece en las membranas externas, lo que se comprobó por absorciones heterólogas.

La fracción de membranas externas de mitocondrias hepáticas es antigénicamente pobre. No presenta ningún antígeno común con el riñón, sólo 3 proteínas séricas y 2 hepáticas. Estas dos últimas no se hallan en las membranas internas, ni en la fracción microsomal, ni en la fracción citoplasmática soluble.

Dada la complejidad del patrón inmunolectroforético de las fracciones subcelulares del hígado de rata, las bandas se agruparon, para su mejor identificación, según las regiones electroforéticas obtenidas en acetato de celulosa. En la figura 5 se exponen los parámetros de cada región electroforética, la disposición esquemática de las bandas de precipitación y la denominación propuesta. Con esta nomenclatura se designan simplemente como alfa, beta o gamma las bandas encontradas en estas áreas electroforéticas, tanto en el hígado como en el suero de la rata. Las designadas como alfa', beta' y gamma', hacen referencia a antígenos hepáticos no encontrados en el suero ni en el riñón de la rata; finalmente como alfa'', beta'' y gamma'' se designan los antígenos presentes tanto en el hígado como en el riñón. Los subíndices se refieren a las subzonas en que se divide cada una de las regiones alfa, beta y

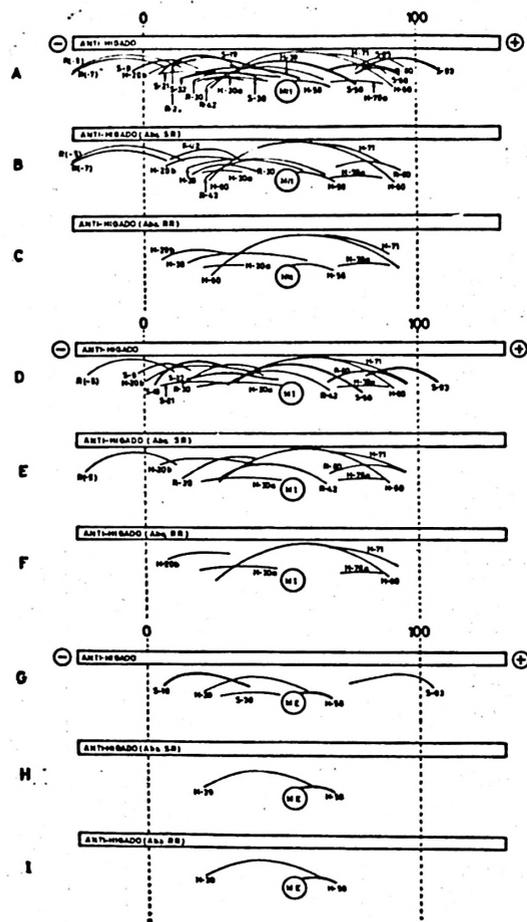


FIG. 3. Patrones inmunolectroforéticos de la fracción mitocondrial (Mit.) y de las membranas externas (ME) e internas (MI) de las mitocondrias. Esquemas A, D y G: total de antígenos revelados por inmunosuero anti-hígado total. Esquemas B, E y H: antígenos no séricos revelados con el inmunosuero absorbido con suero de rata. Esquemas C, F e I: antígenos hepáticos no presentes en suero y riñón revelados con el inmunosuero absorbido con riñón. El número de cada banda indica la movilidad electroforética relativa.

gamma, según la electroforesis del homogeneizado de hígado de rata en acetato de celulosa.

Dentro de cada subzona se da el número I a la línea de precipitación más característica y más constante.

La movilidad electroforética relativa a la albúmina humana y la localización de

cada antígeno en las fracciones subcelulares se expone en la tabla I. La albúmina sérica de la rata presenta una movilidad electroforética inferior a la de la albúmina humana. La zona electroforética alfa<sub>3</sub> no existe en la electroforesis simple del suero de rata. Está formada por 12 bandas, ninguna de las cuales es sé-

TABLA I

Localización celular y movilidad electroforética relativa a la albúmina humana de los componentes antigénicos del hígado de rata.

Denominación	Ux/Ualb. × 10 <sup>-2</sup>	Localización celular					Denominación	Ux/Ualb. × 10 <sup>-2</sup>	Localización celular				
		F.C.S.	Micro.	Mitoc.	M. Ext.	M. Int.			F.C.S.	Micro.	Mitoc.	M. Ext.	M. Int.
Prealbúmina-I	103	X					Beta <sub>1a</sub> -II	39			X	X	
Prealbúmina"-I	103	X	X				Beta <sub>1a</sub> -III glic.	41		X			
Albúmina-I	93	X	X	X	X	X	Beta <sub>1a</sub> -I	42			X		X
Albúmina"-I	90	X	X				Beta <sub>2</sub> -I	25		X			
Alfa <sub>2</sub> -I	85	X	X	X			Beta <sub>2</sub> -II	32			X		X
Alfa <sub>2</sub> -II	80	X	X	X			Beta <sub>2</sub> -III	35	X				
Alfa <sub>2</sub> -III	77	X					Beta <sub>2</sub> -IV	21	X		X		X
Alfa <sub>2</sub> -IV	78						Beta <sub>2</sub> -V	38			X	X	
Alfa <sub>2</sub> -V	59		X				Beta <sub>2</sub> -I	30			X		X
Alfa <sub>2</sub> -I	75	X					Beta <sub>2</sub> -II	30		X			
Alfa <sub>2</sub> -II	78			X		X	Beta <sub>2</sub> -I	22	X	X	X		
Alfa <sub>2</sub> -III	73						Beta <sub>2</sub> -II	30			X		X
Alfa <sub>2</sub> -I	80		X	X		X	Beta <sub>2</sub> -III	33	X				
Alfa <sub>2</sub> -I	60		X	X		X	Beta <sub>2</sub> -IV	33					
Alfa <sub>2</sub> -II	61		X				Beta <sub>2</sub> -I glic.	19		X	X	X	X
Alfa <sub>2</sub> -III	55		X				Beta <sub>2</sub> -II	15	X	X			
Alfa <sub>2</sub> -IV	55	X					Beta <sub>2</sub> -III	9	X	X	X		X
Alfa <sub>2</sub> -V	56	X					Beta <sub>2</sub> -I	20		X	X		X
Alfa <sub>2</sub> -VI	58		X	X	X		Beta <sub>2</sub> -II	20		X			
Alfa <sub>2</sub> -VII	59	X					Beta <sub>2</sub> -I	7					
Alfa <sub>2</sub> -VIII	71		X	X		X	Gamma <sub>2</sub> -I	-9					
Alfa <sub>2</sub> -IX	68	X					Gamma <sub>2</sub> -I	-5	X	X	X		X
Alfa <sub>2</sub> -I	59		X				Gamma <sub>2</sub> -II	-7	X	X	X		
Alfa <sub>2</sub> -II	57		X				Gamma <sub>2</sub> -I glic.	-18					
Alfa <sub>2</sub> -III	67	X					Gamma <sub>2</sub> -II	-18		X			
Beta <sub>1</sub> -I glic.	50	X	X	X		X	Gamma <sub>2</sub> -III	-18					
Beta <sub>1a</sub> -I	40	X											

F.C.S. : Fracción citoplasmática soluble.

Micro : Fracción microsomal.

Mitoc. : Fracción mitocondrial.

M. Ext. : Membranas externas de mitocondrias.

M. Int. : Membranas internas de mitocondrias.

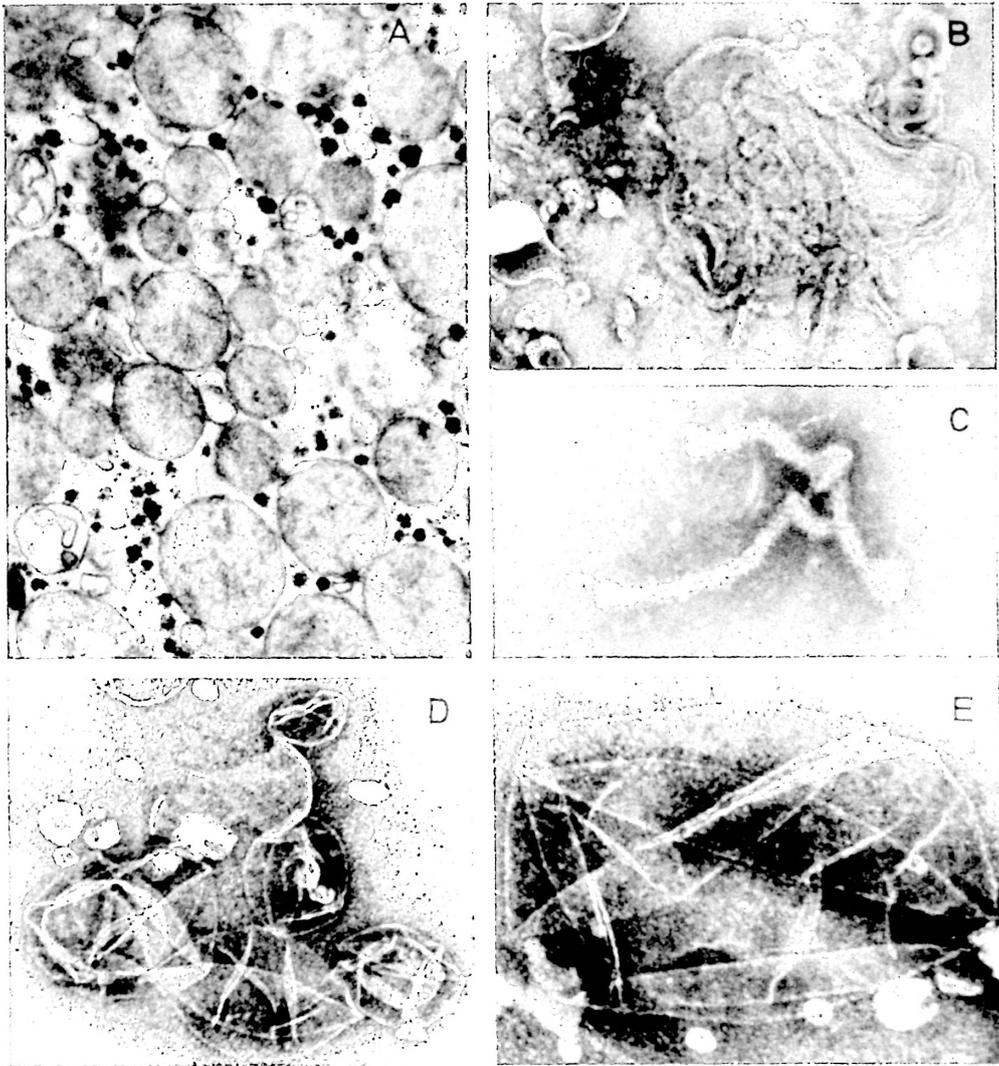


FIG. 4. A) Control de la fracción mitocondrial. Cortes ultrafinos del sedimento de mitocondrias, incluido en Epon. Junto a las mitocondrias se halla una parte muy pequeña de fracción microsomal y abundantes gránulos de glucógeno (en negro),  $\times 17.000$ . B) Fracción correspondiente a las membranas internas. Estas se encuentran en grupos, entre los que se hallan gránulos de glucógeno. Contraste negativo,  $\times 34.000$ . C) Membranas internas con sus unidades fundamentales. Contraste negativo,  $\times 73.000$ . D) fracción mitocondrial de membranas externas. Contraste negativo,  $\times 22.000$ . E) Detalle de una membrana externa,  $\times 34.000$ .

rica, 9 son hepáticas y 3 hepato-renales. La zona beta<sub>1a</sub> tampoco existe en la electroforesis simple del suero de la rata. Ninguno de los 4 antígenos que la constituyen son séricos. De los 3 antígenos propiamente hepáticos, uno es específico de la fracción citoplasmática soluble, otro de las membranas externas de las mitocondrias y otro se identifica como la glicoproteína de la fracción microsomal.

La zona electroforética beta<sub>2</sub> está compuesta por 11 antígenos, de los cuales 5 son de origen sérico.

La zona beta<sub>3</sub> contiene 2 glicoproteínas: una de origen sérico y otra hepática. La gamma-globulina sérica no se encontró en ninguna de las 4 fracciones subcelulares.

La zona gamma<sub>3</sub> es también una región no existente en electroforesis simple de suero de rata y no contiene ninguna proteína de origen sérico por inmunoelectroforesis. Está constituida por 3 antígenos hepáticos, cuyas bandas de precipitación son de trazado casi paralelo (fig. 5). Caracterizamos uno de ellos como una glicoproteína.

Hay antígenos específicos de cada fracción subcelular que pertenecen tanto a los 22 propios de hígado como a los 14 comunes con riñón. En la tabla II se expone su localización y número.

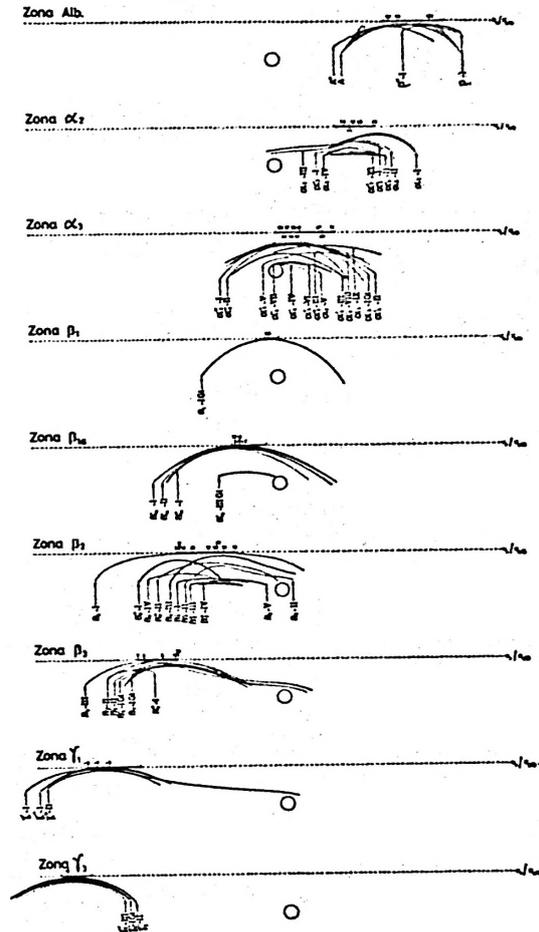


FIG. 5. Patrones inmunoelectroforéticos parciales de las regiones electroforéticas del hígado de rata.

TABLA II

Número de componentes antigénicos séricos, hepatorreales y hepáticos de cada fracción, y antígenos específicos de fracción subcelular

Fracciones subcelulares	Séricos	Hepatorreales		Hepáticos		Total
		EF (1)	IF (2)	EF (1)	IF (2)	
F. citoplasmática soluble	10	2	4	6	—	22
F. microsomal	9	5	3	6	4	27
F. mitocondrial	9	2	4	3	4	20
M. externas	3	—	—	1	1	5
M. internas	6	2	2	2	3	15
Localización celular no conocida	2		2		3	7
Hígado total de rata	17		14		22	53

(1) Específicos de fracción.  
 (2) Inespecíficos de fracción.

### Discusión

El estudio de las fracciones subcelulares hepáticas fue iniciado en 1941 por FURTH y KABAT (8) mediante la reacción de fijación del complemento y encontraron antígenos específicos de órgano en las diferentes fracciones citoplasmáticas. Desde entonces, varios autores han estudiado las fracciones subcelulares en diversos tejidos, tanto normales como tumorales (5, 12, 16, 28). Concretamente en el hígado, DUMONDE y col. (6), encontraron por inmunodifusión diferencias antigénicas entre mitocondrias, lisosomas y microsomas, con un inmunosuero obtenido por inoculación de lisosomas y mitocondrias. Desde entonces se han publicado algunos trabajos sobre el análisis antigénico de cada una de estas fracciones por separado.

En la fracción citoplasmática soluble, D'AMELIO y col. (4), encontraron 14 antígenos diferentes, de los que varios eran comunes con el suero de la rata y 5 específicos de esta fracción subcelular. HASE y MAHIN (9) utilizando el método de inmunoelectroforesis, pusieron de manifiesto la presencia de 14 bandas de precipitación, de las cuales 6 eran intensas y constantes. Estos autores, a diferencia de los hallazgos de D'AMELIO y col. (4), pudieron comprobar que ninguno de estos 14 antígenos era común con el suero de la rata. En el presente trabajo encontramos por inmunoelectroforesis en esta fracción subcelular 23 arcos de precipitación, pero sólo 13 corresponden a proteínas no séricas. Se puede apreciar una imagen electroforética similar entre nuestros hallazgos y los de dichos autores. Las 6 bandas encontradas por ellos corresponden a nuestra  $\gamma_3$ -I-glicoproteína,  $\gamma''_1$ -I,  $\beta''_2$ -III,  $\beta_2''$ -I,  $\beta'_{11}$ -I y  $\alpha'_3$ -II, que son las líneas de precipitación más fuertes, intensas y constantes, y presentan una movilidad electroforética similar en ambas experiencias.

La fracción microsomal resulta ser la más compleja antigénicamente. La inmunoelectroforesis evidencia 27 arcos de precipitación, de los cuales 18 corresponden a proteínas no séricas. D'AMELIO, MUTOLO y BARBARINO (4) encontraron 7 componentes diferentes en esta fracción subcelular hepática. No obstante, estos autores no identificaron ninguna proteína sérica, mientras que en el presente trabajo encontramos en esta fracción 9 proteínas del suero de la rata. Nosotros pensamos con DUMONDE (7) que la fracción subcelular hepática más rica en proteínas séricas debe ser la microsomal, porque en ella reside la mayor actividad sintética del hepatocito. De nuestros resultados se desprende, además, que 8 de estas proteínas de la fracción microsomal son comunes con el riñón de la rata. Ya en 1958 VOGT (24) había descrito que el inmunosuero anti-microsomas hepáticos podría convertirse en específico de hígado por absorciones con microsomas de riñón de rata. Posteriormente, este mismo autor (25, 26, 27) describe varios antígenos comunes con riñón, aparte de los específicos de tejido.

De los 8 antígenos detectados en la fracción microsomal hepática comunes con el riñón, 5 son específicos de los microsomas y no aparecen en ninguna otra fracción subcelular. De forma similar, WHITBECK y ROSENBERG (29) encontraron un antígeno de los ribosomas no específico de órgano o tejido, pero específico de fracción subcelular y común con los ribosomas de bazo y ganglios linfáticos. Estos autores creen que ésta es la proteína estructural de los ribosomas.

Las mitocondrias, aunque resultaron ser débilmente inmunogénicas, presentan 22 antígenos diferentes. D'AMELIO y colaboradores (4) describieron 8 proteínas de las mitocondrias no presentes en los microsomas. En nuestro estudio, las mitocondrias poseen, al menos, 8 antígenos no existentes en los microsomas y 7 específicos de mitocondrias.

Por otra parte, hemos comprobado que no sólo existe una composición antigénica diferente entre mitocondrias, microsomas y fracción citoplasmática soluble, sino también entre las propias membranas externas e internas de la mitocondria, puesto que encontramos un antígeno propio de la membrana externa y otros dos propios de la membrana interna, que son, al mismo tiempo, específicos de órgano. Las membranas internas de la mitocondria poseen además 3 antígenos específicos de órgano e inespecíficos de membrana interna, 2 inespecíficos de órgano, pero específicos de fracción subcelular, y 6 comunes con el suero.

Lo más llamativo de nuestros resultados son las relaciones antigénicas entre las diferentes fracciones subcelulares. Hay abundantes antígenos específicos de fracción subcelular: 8 en la fracción citoplasmática soluble, 5 en las mitocondrias, 11 en los microsomas, 1 en membranas externas de mitocondrias y 4 en membranas internas. Esto coincide con la apreciación de PERLMAN y D'AMELIO (18) sobre la marcada especificidad antigénica de cada fracción. El hecho de haber sometido nuestros antígenos a tratamiento con ultrasonidos durante 6 minutos, no produce su desnaturalización, como pudo comprobarse al encontrar las mismas proteínas en homogeneizados de hígado y subfracciones no tratadas por este procedimiento, hecho que coincide con las observaciones de SULITZANU y colaboradores (22).

HASE y MAHIN (9), no encontraron apenas proteínas séricas en el análisis de hígados perfundidos. Creemos que la perfusión, así como los lavados intensos, no sólo sirven para eliminar la sangre, sino también arrastran las proteínas que se encuentran en el interior de la célula. Se conoce la rapidez con que las proteínas séricas abandonan el hepatocito después de su síntesis (7, 9). Nosotros comprobamos que al lavar la fracción microsomal con sacarosa isotónica, se pier-

den 7 de las 9 proteínas séricas de esta fracción. No se puede pensar que estas proteínas perdidas en este lavado sean contaminación de la fracción citoplasmática soluble, ya que tres de ellas no se encuentran en esta fracción ni siquiera en el homogeneizado de hígado total, pero sí están presentes en la inmunoelectroforesis del suero de rata normal frente al inmuosuero antihígado. Esto indica que estos componentes antigénicos están en el homogeneizado de hígado en cantidad insuficiente para precipitar directamente, pero bastante para inducir producción de anticuerpos. Por el contrario, la fracción microsomal puede contenerlos en concentración suficiente para dar precipitación directa.

Entre las proteínas séricas destaca la presencia de la albúmina en todas las fracciones subcelulares, así como la ausencia de la gamma-globulina sérica de todas ellas. Es muy conocido el hecho de que la gamma-globulina sérica es de las pocas proteínas del suero que no se sintetiza en el hígado (13).

En las condiciones en que llevamos a cabo la electroforesis, existen 6 proteínas electropositivas, es decir, que emigran hacia el cátodo. Varios autores habían descrito en el hígado de rata y del caballo zonas electroforéticas más cercanas al cátodo que la gamma-globulina (2, 14, 21). HASE y MAHIN (9) también las encuentran en el hígado de la rata, tanto por electroforesis en gel de almidón como por inmunoelectroforesis. Estos autores denominan estas zonas con las letras J, K y L, y encuentran por inmunoelectroforesis dos bandas denominadas V y VI. Estas bandas corresponden a nuestras  $\gamma'_1$ -I y  $\gamma'_3$ -I.

Por otra parte, caracterizamos 22 antígenos específicos de hígado no presentes en el riñón ni en el suero de la rata, que están presentes tanto en la fracción citoplasmática soluble como en los ribosomas aislados, estructuras estas últimas que participan en la condensación de amino-

ácidos, así como en las mitocondrias y los microsomas que intervienen en el transporte de proteínas. Estos datos no coinciden con la hipótesis de DUMONDE (6) sobre la función de los antígenos específicos de hígado. Según este autor, están más asociados con el mecanismo de transporte de proteínas que con los enzimas que intervienen en la condensación de aminoácidos.

La clasificación propuesta es un intento de aunar los esfuerzos que en diferentes laboratorios se efectúan sobre el estudio de las proteínas hepáticas en relación con injertos de hígado, antígenos de los hepatomas, posibles enfermedades autoinmunes y síntesis de proteínas séricas. Se siente la necesidad de poder comparar los trabajos de los diferentes autores y poder hacer referencia a las proteínas descritas por cada uno. En esta clasificación se puede individualizar e identificar cualquier proteína por la zona electroforética a la que emigra, por su presencia en el suero y en el riñón de la rata, por su naturaleza química, por su movilidad electroforética individual y por su presencia en cada una de las subfracciones celulares. De esta forma, se abre camino para poder comparar los resultados obtenidos por los diferentes autores. Trabajos en marcha en nuestro laboratorio intentan identificar cada uno de estos antígenos con los enzimas hepáticos y proteínas estructurales, así como profundizar en su composición química.

\* \* \*

Deseamos expresar nuestra gratitud a las señoritas Carmen Garayoa, Mercedes Preciados, María Angeles Sara y María Antonia Eleta por su imprescindible y valiosa colaboración.

### Resumen

Las fracciones subcelulares y el hígado total de rata fueron estudiados por inmunoelectroforesis. Se encontraron 23 antígenos en la fracción citoplasmática soluble, 27 en la fracción

microsomal y 20 en la fracción mitocondrial. Se describe la comunidad antigénica de estos antígenos con el suero y riñón de rata. El hígado total presentó 46 antígenos existentes en las fracciones subcelulares y 7 de localización celular desconocida.

También fueron analizadas por separado las membranas internas y externas de mitocondrias hepáticas. Se hallaron 15 antígenos en las membranas internas y 5 en las externas.

Las fracciones subcelulares presentaron una composición antigénica diferente. Todas ellas poseían antígenos específicos y antígenos comunes con otras fracciones. También todas las fracciones presentaron antígenos específicos de tejido hepático y antígenos comunes con el riñón y suero de rata.

De cada antígeno se describe su movilidad electroforética, su presencia en las fracciones subcelulares, las características de la banda de precipitación y la comunidad antigénica con el suero y el riñón.

Finalmente, para la individualización de cada antígeno se propone un sistema de nomenclatura basado en las regiones electroforéticas.

### Summary

#### Antigen analysis of rat liver subcellular fractions

Homogenates of rat liver were studied by immunoelectrophoretic methods. The total liver homogenate was injected in rabbits until obtaining a high level of antibodies. By means of immunoelectrophoresis the presence of 53 different antigens was demonstrated; their respective mobilities are given as percentages referred to human albumin mobility.

It was found by direct immunoelectrophoresis and by absorption that 17 antigens were common to the rat blood serum. In the same way 14 antigens were found to be common to both liver and kidney. Finally, another 22 antigens were observed to be absent from serum and kidney.

Furthermore the different subcellular hepatic fractions were analyzed; they were obtained by differential ultracentrifugation and their purity was checked by electron microscopy. The soluble cy-

toplasmic fraction gave 23 different antigens of which 10 were also found in serum and 7 in kidney. The microsomal fraction gave a total of 27 different antigens of which 9 were common to those of serum and 8 to those of kidney.

The internal and external mitochondrial membranes were analyzed separately. Antigenic analysis of the internal membranes showed the presence of 15 immunoelectrophoretic bands of precipitation of which 6 were in serum and 4 in kidney. The external membrane subfraction gave 4 different antigens, 2 of which are also present in rat serum.

Internal and external mitochondrial membrane subfractions have only 2 common antigens; these two are also present in serum.

A nomenclature system is proposed to distinguish and recognize each of the 53 different antigens according to the regions of the electrophoretogram of the whole rat liver on cellulose acetate.

The antigens, whether belonging to serum only, either common or not with those of kidney are named according to the electrophoretic region in which they are found. The presence or absence of each antigen in the analyzed fractions is given along with some of its chemical properties. Only 7 total liver antigens of the rat have not been found in any of the subcellular fractions, 2 in common and 3 not in common with those of kidney.

The specific and nonspecific antigens of each subcellular fraction are given also.

### Bibliografía

1. CHORDI, A., WALLS, K. W., y KAGAN, I. G. : *J. Immunology*, **98**, 1034, 1964.
2. CLERICI, E., y SCALFFA, P. : *Sperimentale*, **8**, 115, 1961.
3. D'AMELIO, V., y PERLMAN, P. : *Exptl. Cell Research*, **19**, 383, 1960.
4. D'AMELIO, V., MUTOLO, V., y BARBARINO, A. : *Exptl. Cell Research*, **29**, 1, 1963.
5. DULANEY, A. D., GOLDSMITH, Y., ARNESEN, K., y BUXTON, A. L. : *Cancer Research*, **9**, 217, 1949.
6. DUMONDE, D. C., ROODYN, D. B., y PROSE, P. : *Immunology*, **9**, 177, 1965.
7. DUMONDE, D. C. : *Advances in Immunology*, **5**, 245, 1966.
8. FURTH, J., y KABAT, E. A. : *J. Exptl. Med.*, **74**, 247, 1941.
9. HASE, T., y MAHIN, T. H. : *J. Immunology*, **94**, 191, 1965.
10. HOGEBROOM, G. H. : *Methods in Enzymology*, **1**, 16, 1955. Acad. Press.
11. KAGAN, I. G., y NORMAN, L. : *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **10**, 727, 1961.
12. MALGREN, R. A., BENNISON, B. E., ANDERSON, B. F., y RISLEY, C. C. : *J. Nat. Cancer Inst.*, **11**, 1277, 1951.
13. MILLER, L. L., y BALE, W. F. : *J. Exptl. Med.*, **99**, 125, 1954.
14. MULLER, J. : *Hope-Seyler's Physiol. Chem.*, **326**, 34, 1961.
15. MUTOLO, V., y D'AMELIO, V. : *Experientia*, **18**, 556, 1962.
16. NUNGESTER, W. J., y FISHER, H. : *Cancer Research*, **14**, 248, 1954.
17. PARSONS, D. F., WILLIAMS, G. R., y CHANCE, B. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **137**, 643, 1966.
18. PERLMAN, P., y D'AMELIO, V. : *Nature*, **181**, 491, 1958.
19. PERLMAN, P., HULTIN, T., D'AMELIO, V., y MORGAN, W. S. : *Exptl. Cell Res.*, *Suppl.* **7**, 279, 1959.
20. SCHEIDEGGER, J. J. : *Intern. Arch. Allergy*, **7**, 103, 1956.
21. SOROF, S., y COHEN, P. P. : *J. Biol. Chem.*, **190**, 311, 1951.
22. SULITZEANU, D., BERNECKY, J., YAGI, Y., y PRESSMAN, D. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **114**, 468, 1963.
23. URIEL, J., y GRABAR, P. : *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, **90**, 427, 1956.
24. VOGT, P. K. : *Nature*, **182**, 807, 1958.
25. VOGT, P. K. : *Z. Naturforsch.*, **15b**, 213, 1960.
26. VOGT, P. K. : *Z. Naturforsch.*, **15b**, 221, 1960.
27. VOGT, P. K. : *Z. Naturforsch.*, **15b**, 225, 1960.
28. WEILER, E. : *Z. Naturforsch.*, **7b**, 324, 1952.
29. WHITBECK, E. G., y ROSENBERG, L. T. : *Immunology*, **7**, 363, 1964.

