

**Lisosomas  
y otras  
partículas  
afines.**

**GUILLERMO MASSIEU\***

GRAN PARTE de los esfuerzos de los estudiosos de la arquitectura bioquímica de la célula han sido polarizados hacia aquellas partículas sub-celulares que se obtienen por ultracentrifugación fraccionada siguiendo el esquema original de Claude<sup>4</sup>, con las modificaciones introducidas por Hogeboom, Schneider y Palade<sup>16</sup>. Estas técnicas permiten la separación de núcleos, mitocondrias, microsomas y un sobrenadante citoplásmico, que han sido el objeto de la atención de los que me precedieron en este Simposio. Sin embargo, aplicando nuevas técnicas de fraccionamiento sub-celular, como son la centrifugación diferencial de gradiente de densidad y la de equilibrio en gradiente de densidad (mediante el uso de agua pesada, glucógeno, etc.), algunos investigadores como de Duve y su grupo<sup>9,12</sup> han descrito más recientemente otras partículas con características morfológicas y bioquímicas diferentes de las mencionadas arriba. Entre estas nuevas partículas se considerarán solamente las más importantes, los *lisosomas* y otras que exhiben características similares desde el punto de vista morfológico y/o bioquímico.

El Profesor de Duve y sus colaboradores y otros grupos de investigadores, como el de Novikoff, han encaminado sus esfuerzos hacia la obtención de métodos que proporcionen pruebas inequívocas de la existencia de dichas partículas, como son la aplicación de la microscopía electrónica, técnicas citoquímicas y procedimientos bioquímicos. Por lo menos en el caso de los lisosomas todos los datos coinciden en que estas estructuras tienen una existencia real y funciones bioquímicas especiales dentro de la célula.

Antes de seguir adelante, creemos que es de interés enfatizar algunas

---

\* Investigador del Instituto de Biología y Profesor de la Facultad Nacional de Medicina, U. N. A. M.

de las ideas generales de de Duve acerca de la bondad de los métodos de fraccionamiento sub-celular por medio de la centrifugación. Considera este investigador<sup>9,12</sup> que las técnicas en uso en la gran mayoría de los laboratorios, derivadas fundamentalmente del procedimiento original de Hogeboom y colaboradores, no permiten la separación perfecta de las distintas entidades subcelulares y que las fracciones obtenidas están contaminadas unas con otras, además de que algunas de ellas incluyen verdaderos artefactos de laboratorio. Por ejemplo, los microsomas son partículas de naturaleza relativamente artificial, según se ha comprobado por microscopía electrónica y análisis bioquímico, pues consisten esencialmente de restos del retículo endoplásmico con sus dos constituyentes principales: membranas ergastoplásmicas y ribosomas<sup>12</sup>. Novikoff y colaboradores<sup>18</sup> ya habían comprobado que las partículas subcelulares son heterogéneas desde el punto de vista enzimático. Estos investigadores observaron que la fosfatasa ácida y la uricasa muestran un comportamiento peculiar de sedimentación, intermediario entre los de la oxidasa succínica mitocondrial y la esterasa microsomal. En el laboratorio de de Duve se realizaron observaciones similares en lo que respecta a otras enzimas. Como hipótesis de trabajo, este autor propuso que las enzimas se localizan fundamentalmente en un solo sitio o tipo de partícula de la célula (postulado de la localización única) y que las partículas individuales de un cierto grupo son homogéneas enzimáticamente (postulado de la homogeneidad). De acuerdo con estos postulados se puede asumir que solamente aquellas enzimas que sistemáticamente resisten a una variedad de procedimientos de fraccionamiento pueden agruparse realmente en un tipo único de organelo, mientras que aquellas que pueden disociarse de una a otra en proporción considerable, de acuerdo con varias condiciones de fraccionamiento, deben tomarse como pertenecientes a partículas diferentes.

Los postulados que se han mencionado, tomados como base para un enfoque analítico, los ha aplicado con éxito de Duve al caso de las enzimas localizadas en las mitocondrias y con menos exactitud al de las hidrolasas lisosomales<sup>3</sup>. Dicho investigador y sus colaboradores observaron que la distribución de la fosfatasa ácida en fracciones subcelulares de hígado cambian según fuese el método de fraccionamiento utilizado. cuando se usaban métodos basados en el procedimiento de Hogeboom y colaboradores, encontraron una gran concentración de la enzima en las mitocondrias y mucho menor en los microsomas. Cuando aplicaron sus propias técnicas, los autores lograron separar una fracción

más (empleando equilibrio de densidad en gradiente de sacarosa-agua pesada) entre mitocondrias y microsomas; la repartición de la fosfatasa ácida fue entonces diferente, ya que la mayor parte de la actividad se concentró en las llamadas mitocondrias ligeras y esta observación se repitió constantemente<sup>1,5,6</sup>. Concluyeron los autores que dicha enzima era característica de la nueva fracción en la que predominaba su actividad y en donde abundaban, como se vió más tarde, un cierto tipo especial de partículas con membrana simple y sin plegamientos interiores, a las que denominaron *lisosomas*. Cuando se aplicó el mismo criterio a otras enzimas, comprobaron que la citocromo-oxidasa es característica de las mitocondrias y que la glucosa-6-fosfatasa se localiza fundamentalmente en los microsomas<sup>15</sup>.

De Duve y su grupo comprobaron que en los lisosomas se encuentran una docena de enzimas líticas<sup>7,9,12</sup>: nucleasas (ribonucleasas y desoxirribonucleasa), fosfomonoesterasa, fosfatasa de fosfoproteínas, proteasas (catepsinas), enzimas que atacan los enlaces principales de los mucopolisacáridos (Beta -glucuronidasa, Beta -N-acetil-glucosamidasa, Beta -galactosidasa y Alfa -manosidasa) y aril-sulfatasas A y B. En la figura 1 se representa gráficamente el concepto bioquímico del lisosoma. Las enzimas se encuentran encerradas dentro de la partícula que está rodeada de una membrana de naturaleza lipoproteica que impide en forma efectiva su salida y por lo tanto la degradación de sustratos externos. No obstante díficos agentes pueden romper la membrana lisosomal y "activar" las enzimas, según la expresión de de Duve. Entre dichos agentes se consideran los siguientes:

1) Fragmentación mecánica por los homogeneizadores usuales (Turmix, Waring).

2) Ruptura osmótica, por exposición a medios hipotónicos o a soluciones isotónicas de sustancias a las cuales la membrana es permeable (glicerol, NaCl, KCl, etc).

3) Disgregación física; incluye la congelación y descongelación repetidas, la acción de agentes tensioactivos (saponinas, desoxicolato, Tritón X-100) o la de solventes de las grasas (tetracloruro de carbono).

4) Lisis térmica o autolítica (incubación a 37° y a pH 5 durante 2 o 3 horas).

5) Lisis enzimática por tratamiento con lecitinasa de *Clostridium Welchii*, pancreatina, tripsina o quimiotripsina (la lisozima y la ribonucleasa son inactivas).

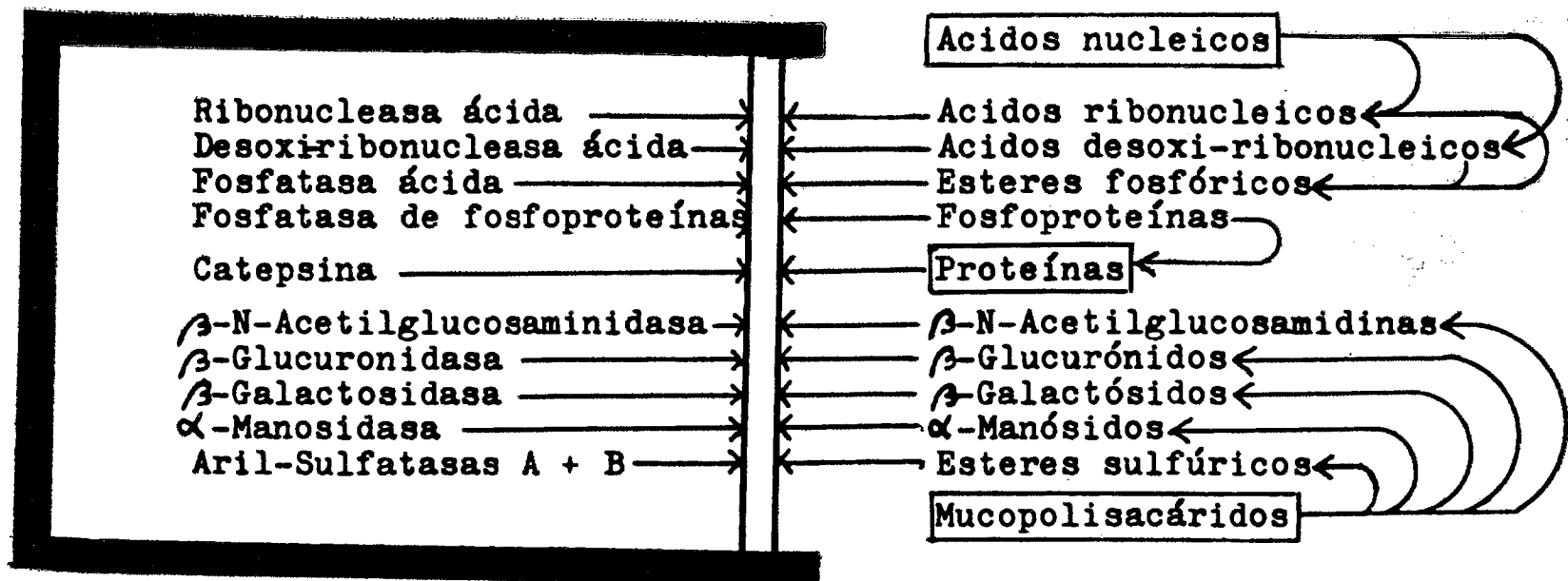
Por microscopía electrónica, combinada con técnicas histoquími-

cas<sup>19,20</sup> de la fracción correspondiente, se han podido diferenciar perfectamente los lisosomas de las mitocondrias. Como ya se mencionó antes, las primeras no tienen membrana doble ni pliegues o tabiques interiores, estructuras que son típicas de las segundas.

Se ha concluído que los llamados "cuerpos pericanaliculares" del hígado no son otra cosa que lisosomas. Existe también evidencia de la existencia de partículas con características bioquímicas de lisosomas, aunque no siempre aunadas a similitudes morfológicas, en otros órganos como riñón (véase la figura 4), bazo, cerebro, glándula mamaria, tiroides, pituitaria y páncreas<sup>12</sup>. En células de muy diversa procedencia se han descrito partículas similares a los lisosomas, como en embrión de pollo, leucocitos, amibas, etc. En células vegetales Buvat y colaboradores<sup>14</sup> ha encontrado ciertos "cuerpos densos", más pequeños que las mitocondrias, que muestran varias de las características de los lisosomas y que parecen ser diferenciaciones locales del retículo endoplásmico.

La naturaleza de tipo digestivo del equipo enzimático de los lisosomas, que les permite degradar la mayor parte de los constituyentes naturales de la célula, con excepción de lípidos, parece indicar que las funciones fisiológicas de estas partículas están estrechamente relacionadas con los procesos de ingestión celular del tipo de la fagocitosis y de la pinocitosis. Esta hipótesis está reforzada por la observación de que en células fagocíticas abundan los lisosomas y por las relaciones que parecen existir entre estas y los fagosomas. Por último, los datos histoquímicos indican que en las vacuolas digestivas existe por lo menos una de las enzimas típicas de los lisosomas, la fosfatasa ácida. Es probable que los lisosomas estén asociados con el almacenamiento de productos de desecho dentro de la célula y en este sentido pueden tener algún papel importante en procesos de envejecimiento<sup>12</sup>.

De acuerdo con de Duve<sup>9,12</sup>, los lisosomas pueden tener un papel primordial en la autólisis fisiológica. Este punto no parece haberse estudiado sistemáticamente, aunque se pueden citar los trabajos de Weber<sup>24,25</sup> sobre la intervención de la catepsina en la reabsorción de la cola de las larvas de *Xenopus*. Dicho autor comprobó que la actividad específica de la enzima disminuye durante el período de crecimiento y aumenta inmediatamente en el curso de la metamorfosis hasta llegar a más de veinte veces la actividad inicial, en sus etapas terminales. Estos hechos parecen indicar, según de Duve<sup>9</sup>, que la catepsina tiene funciones en la autólisis y no en procesos sintéticos, aunque se ignora si en estos tejidos está ligada a lisosomas. La posible intervención de los



Homogeneización (Waring)  
 Medio hipotónico  
 NaCl o KCl isotónico  
 Congelación y descongelación  
 Vibraciones ultrasónicas

**PARTICULAS INTACTAS**

Enzimas unidas e  
 inactivas

Lecitinasa  
 Proteasas  
 Incubación a pH 5, 37°  
 Detergentes  
 CCl<sub>4</sub>

**PARTICULAS DAÑADAS**

Enzimas solubilizadas  
 y activas

Figura 1. Esquema del concepto de lisosoma desde el punto de vista bioquímico.

lisosomas en fenómenos como la involución de los órganos linfoides, la del útero después del parto, las secreciones holócrinas, es un tema que merece estudiarse.

Sobre el papel de los lisosomas en los procesos de autólisis solamente se tienen datos concretos en relación a los efectos del ayuno. Beaufay<sup>9</sup> observó un aumento en la ruptura de estas partículas en el hígado en animales mantenidos en ayuno durante 4 a 6 días, al comparar con animales normales.

Es posible que los lisosomas intervengan también en procesos de necrosis. Beaufay y de Duve<sup>2</sup> estudiaron este aspecto en el caso del hígado. Los autores ligaron el íleo de un lóbulo hepático, en el cual se indujo isquemia y compararon sus actividades enzimáticas con las de la parte intacta de la glándula. Comprobaron que en el lóbulo isquémico se inició inmediatamente la ruptura de lisosomas y que esta fue completa prácticamente, a las 2 o 4 horas. El mismo grupo de de Duve ha observado que hay una ruptura de tales partículas en el hígado de animales sometidos a una dieta incompleta, que produzca necrosis hepática o cuando se intoxican con tetra-cloruro de carbono. En los animales sacrificados en el estado de coma, el hígado se redujo a menos de la mitad de su peso, la ruptura de los lisosomas fue prácticamente completa, la actividad de la citocromo-oxidasa disminuyó de 50 a 80% y la de las enzimas lisosómicas permaneció intacta (se concentró cerca de dos veces, por efecto de la reabsorción parcial de otros constituyentes). Los signos descritos parecen ser la imagen de un órgano en vías de digestión por sus propios lisosomas, activados por una desintegración previa de sus membranas. Deckers-Passau, Maisin y de Duve<sup>13</sup> y de Duve, Passau y Maisin<sup>8</sup> encontraron que el hígado de animales tratados con dimetil-aminoazobenceno mostró marcado aumento de la actividad de catepsina e incremento de la ruptura de los lisosomas. Cuando los animales se protegieron contra la acción cancerígena de este colorante mediante un régimen adecuado, no se encontraron estas manifestaciones.

Todos los hechos mencionados indican una correlación indudable entre los fenómenos de necrosis y el grado de ruptura de los lisosomas, aunque este hecho no significa que exista un efecto causal entre estas partículas y la muerte celular. Es posible que ésta ocurra cuando se llega a un estado de irreversibilidad de procesos muy lábiles, tales como la fosforilación oxidativa y que la consecuencia sea la ruptura de las partículas<sup>9</sup>.

Desde el punto de vista teleológico, la activación rápida, post-mortal, de estos gránulos, sería ventajosa para asegurar la desintegración y eliminación de las células muertas. El mecanismo que interviniese sería diferente de acuerdo con el agente causal de la necrosis, pero a cada uno de los factores que originaron la anomalía se añadiría posiblemente la anoxia (de Duve<sup>9</sup>). Se ha observado<sup>9</sup> que en cortes de hígado en anaerobiosis hay una ruptura más rápida de lisosomas que en aerobiosis. Hay que recordar que la anoxia induce, entre otros efectos, a un aumento de la glicólisis y al abatimiento del pH intracelular, lo que finalmente conduciría a la ruptura de las membranas lisosómicas por las catepsinas interiores.

#### OTRAS PARTÍCULAS RELACIONADAS CON LOS LISOSOMAS. FAGOSOMAS.

Cuando se administra intravenosamente peroxidasa de rábano (por ejemplo a ratas), esta proteína es sustraída rápidamente del torrente sanguíneo y se localiza en ciertos tejidos, especialmente en hígado y riñón (Strauss<sup>22,23</sup>, en los cuales se asocia a ciertas partículas citoplásmicas a las que se denominó "fagosomas". Los fagosomas del riñón son probablemente idénticos a las llamadas "gotillas proteicas" que varios autores describieron con anterioridad y que Strauss consideró como estrechamente relacionadas con los lisosomas, ya que sus preparaciones purificadas mostraron un alto contenido en hidrolasas<sup>21</sup>. Recientemente Jacques ha estudiado los fagosomas y observó que se comportan como lisosomas en lo que se refiere al modo como liberan sus enzimas cuando se sujetan a algunos de los tratamientos que ya se han mencionado antes<sup>17</sup>. En algunos sistemas de centrifugación exhiben propiedades similares a los lisosomas pero no en todos, por lo que se concluye que aunque ambas partículas tienen algunas características comunes, no pueden identificarse como una misma entidad. Según de Duve<sup>12</sup> estas observaciones no invalidan la posibilidad, ya sugerida y apoyada por observaciones citoquímicas, de que los lisosomas pudieran tener alguna intervención en la digestión intracelular del material capturado por los fagosomas. Aunque un mecanismo de esta naturaleza es todavía tema sujeto a especulaciones, se ha sugerido que los lisosomas se fusionan con los fagosomas para formar una vacuola digestiva. También se sabe que la formación de fagosomas no ocurre exclusivamente como consecuencia de la ingestión de proteínas extrañas sino también en presencia de varios materiales circulantes normales.

## PARTÍCULAS DE URICASA

Se pensó por algún tiempo que estas partículas estaban vinculadas con los lisosomas, en el hígado de la rata, pero recientemente se ha demostrado<sup>10</sup> que la uricasa se asocia a un grupo diferente de partículas. Los lisosomas y las partículas de uricasa se comportan igual en las técnicas de centrifugación cuando se utiliza sacarosa 0.25 M, pero en gradiente de sacarosa-D<sub>2</sub>O las segundas muestran mayor equilibrio de densidad y mucho menor en gradiente de glucógeno-sacarosa 0.5 M. La catalasa y la D-amino-ácido oxidasa se comportan cualitativamente igual que la uricasa en estos sistemas, pero esta similitud dista mucho de ser perfecta sobre bases cuantitativas. Estas tres enzimas, o bien están asociadas en un solo tipo de partícula o pertenecen a estructuras diferentes con propiedades muy similares. No se conoce con certidumbre la naturaleza morfológica de estas partículas, ya que las preparaciones más puras que se han examinado hasta el momento están contaminadas con lisosomas, "cuerpos densos pericanaliculares" y "microcuerpos"<sup>11</sup> No se conoce prácticamente nada respecto a las funciones de las estructuras asociadas con la uricasa, la catalasa y la D-aminoácido oxidasa. Se sabe únicamente que el peróxido de hidrógeno que producen la primera y tercera de las enzimas es destruido por la catalasa.

## PARTÍCULAS DE MONOAMINO-OXIDASA.

La monoamino-oxidasa del hígado de la rata se asocia principalmente con las mitocondrias y parcialmente con los microsomas. A diferencia de la mayor parte de las proteínas microsomales y fosfolípidos, la enzima se equilibra a menor densidad, en contraste también con otras enzimas que acompañan a los microsomas<sup>10</sup>. Esta observación sugiere que la monoamino-oxidasa microsomal del hígado de la rata podría pertenecer a un grupo especial de partículas, pero se requiere mayor aporte de datos para aceptar o desechar esta hipótesis.

## RESUMEN

Por las investigaciones realizadas principalmente por el grupo del Profesor de Duve empleando técnicas especiales de centrifugación, se sabe que además de las partículas más estudiadas hasta el momento, como son las mitocondrias y los microsomas, existen en pequeñas canti-

dades otras nuevas partículas que tienen un equipo enzimático altamente especializado y que seguramente desempeñan funciones determinantes dentro de la célula. Entre las estructuras más importantes se han descrito brevemente lisosomas, fagosomas, "partículas de uricasa y manoaminoxidasa, etc.

El descubrimiento de nuevas partículas sub-celulares del tipo de las aquí comentadas abre un campo muy amplio, ya que es posible que existan otras no descritas hasta el momento, que puedan separarse por medio de esquemas de fraccionamientos de centrifugación más elaborados, como los que aplicaron de Duve y sus colaboradores y que les permitieron reconocer a los lisosomas y otras partículas relacionadas. En este tipo de trabajo han mostrado ser auxiliares muy valiosos los estudios paralelos de morfología en las fracciones aisladas, principalmente la microscopía electrónica y la aplicación de métodos citoquímicos. Los esquemas convencionales de fraccionamiento, basados en el esquema original de Claude y de Hogeboom, Schneider y Palade, no permiten en general, el reconocimiento de las nuevas partículas que se han descrito.

#### REFERENCIAS

1. Appelmans, F., R. Wattiaux y C. de Duve.: *Biochem. J.*, 59, 438 (1955).
2. Beaufay, H. y C. de Duve: *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, 65, 156 (1957).
3. Beaufay, H., D. S. Bendall, P. Baudhuin, R. Wattiaux y C. de Duve: *Biochem. J.*, 73, 628 (1959).
4. Claude, A.: *J. Exp. Med.*, 84, 61 (1946); *Ibid.*, p. 61.
5. De Duve, C., F. A. Appelmans y R. Wattiaux, IIe Congr. Intern. Biochim., Paris (1952), Rés. des Comm. 278.
6. De Duve, C., R. Gianetto, F. Appelmans y R. Wattiaux, *Nature*, 172, 1143 (1953).
7. De Duve, C., B. C. Presman, R. Gianetto, R. Wattiaux y F. Appelman, *Biochem. J.*, 60, 604 (1955).
8. De Duve, C., L. Passau y J. Maisin: *Acta Un. Int. c. Cancr.*, 11, 6388 (1955).
9. De Duve, C., Les Lysosomes; en: *Exposés Annuels de Biochimie Médicale*, v. 20, p. 197, Masson et Cie Editeurs, Paris, 1958.
10. De Duve, C., H. Beaufay, P. Jacques, Y. Rahman-Li, O. S. Sellinger, R. Wattiaux y S. de Cominck: *Biochim et Biophys Acta*, 40, 186 (1960).
11. De Duve, C. *Nature*, 187, 836 (1960).

12. De Duve, C., Identification and Characterization of Special Cytoplasmic Particles in Rat Liver. Vth. International Congress of Biochemistry, Moscow, August, 1961, Symposium N<sup>o</sup> II, Reprint N<sup>o</sup> 45.
13. Deckers-Passau, L., J. Maisin y C. de Duve. *Acta Un. Int. c. Cancr.* 13 822, (1957).
14. Geneves, L., A. Lance y R. Buvat, *C. R. Acad. Sci.*, 247, 2028 (1958).
15. Hers, H. G., J. Berthet, L. Berthet y C. de Duve, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33, 21 (1951).
16. Hogeboom, G. H., W. C. Schneider y G. E. Palade, *J. Biol. Chem.*, 172, 619 (1948).
17. Jacques, P., *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, 68, 683 (1960).
18. Novikoff, A., E. Podber, J. Ryan y E. Noe, *J. Histochem. Cytochem.*, 1, 27 (1953).
19. Novikoff, A., H. Reaufay y C. de Duve, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, Suppl. 179 (1956).
20. Novikoff, A. B., En: *The Cell* (Editado por J. Brachet y A. E. Mirsky), Academic Press, Nueva York, v. 2, p. 423 (1961).
21. Straus, W., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 513 (1956).
22. Straus, W., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 541 (1958).
23. Straus, W., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5, 199 (1959).
24. Weber, R., *Experientia*, 13, 153 (1957).
25. Weber, R., *Rev. Suis. Zool.*, 64, 326 (1957).