

## ALFA-FETOPROTEINA DE LIQUIDO AMNIOTICO DE CERDA

Por A. López y  
J. Burgos

### INTRODUCCION

La alfafetoproteína es una glicoproteína, presente en los animales durante el período fetal y primeros días de vida postuterina y en determinados estados tumorales (hepatomas, carcinomas), a la que se atribuyen importantes papeles antigénicos<sup>1</sup>.

La hipótesis de que la alfafetoproteína desempeña un importante papel en la diferenciación celular, durante el período fetal y desarrollos tumorales, ha constituido el punto de partida de numerosos trabajos, realizados en torno a esta proteína<sup>2, 3</sup>.

El suero sanguíneo de ratas<sup>4, 5</sup>, presenta durante el período fetal y postuterino la particular propiedad de formar «binding» de alta afinidad específicamente con la estrona y el estradiol. Recientemente se ha demostrado que la alfafetoproteína, presente en dicho suero, es la responsable del mismo<sup>6</sup>.

En el trabajo aquí descrito se estudia y compara la alfafetoproteína presente en el líquido amniótico de cerdas gestantes con la del suero sanguíneo de ratas recién nacidas y líquido amniótico-suero sanguíneo de ratones en período fetal.

### MATERIAL Y METODOS

El líquido amniótico de cerda se obtuvo de hembras Large White en período de 114-116 días de gestación.

El líquido amniótico y suero sanguíneo de fetos de ratones fue recogido conjuntamente cuando las hembras llevaban 16 días gestando.

Para la obtención del suero anti-alfafetoproteína se emplearon conejos New Zeland blancos de 2.5 Kgr de peso, para esta preparación se siguió el esquema descrito en la tabla 1.

Todos los productos químicos y soportes cromatográficos empleados fueron suministrados por BDH; el material radioactivo lo fue por Amersham, Oostradiol 17B 6-7-<sup>3</sup>H 40-60 Ci /mmol.

Los recuentos de radioactividad se efectuaron en un espectrómetro de centelleo Packard. Los geles de acrilamida se dirigieron antes del recuento con NCS (Amersham-Searle).

Para la determinación de proteínas se empleó el método de LAWRY<sup>7</sup>.

Las electroforesis en gel de poliacrilamida se efectuaron siguiendo el método de DAVIS<sup>8</sup>, con una concentración de acrilamida del 7 %.

El cálculo del peso molecular se realizó mediante electroforesis de disco en presencia de dodecilsulfato sódico siguiendo el método de WEBER y OSBORN<sup>9</sup>.

Para la inmunodifusión se emplearon geles de agarosa al 1 % siguiendo la técnica de OUCHTERLONY<sup>10</sup>.

La inmunolectroforesis se efectuó de acuerdo con SCHEIDEGGAR<sup>11</sup>.

Las cromatografías en columna de DEAE se realizaron a 2.<sup>0</sup> C, utilizando columnas 1,6 × 26 cm empleando como fase estacionaria DEAE 52.

Para las cromatografías de afinidad se empleó CNBr Sepharosa 4B activada siguiendo instrucciones de Pharmacia.

Para la cromatografía en columnas de Sephadex se emplearon columnas de 0.7 × 10 cm empaquetadas con Sephadex G-25 en tampon de fosfato sódico (pH 7.5). El desarrollo se efectuó a temperatura ambiente.

Para obtención rápida de pequeñas cantidades de alfafetoproteína se empleó el método descrito por Benassayag<sup>12</sup>.

## RESULTADOS

### I.-Comportamiento electroforético del líquido amniótico de cerda y líquido amniótico suero sanguíneo de fetos de ratones

El resultado del análisis electroforético en gel de acrilamida (véase Fig. 1) demuestra la presencia de una proteína ( $\alpha$ -FP) localizada en la región de las globulinas y próxima a la albúmina, con un  $R_{pp}$  de 0,53, similar al de la alfafetoproteína presente en el líquido amniótico del suero sanguíneo de fetos de ratones de 16 días de gestación y al del suero sanguíneo de ratas recién nacidas. En estas últimas la fracción de  $\alpha$ -FP presenta dos bandas (véase Fig. 1).

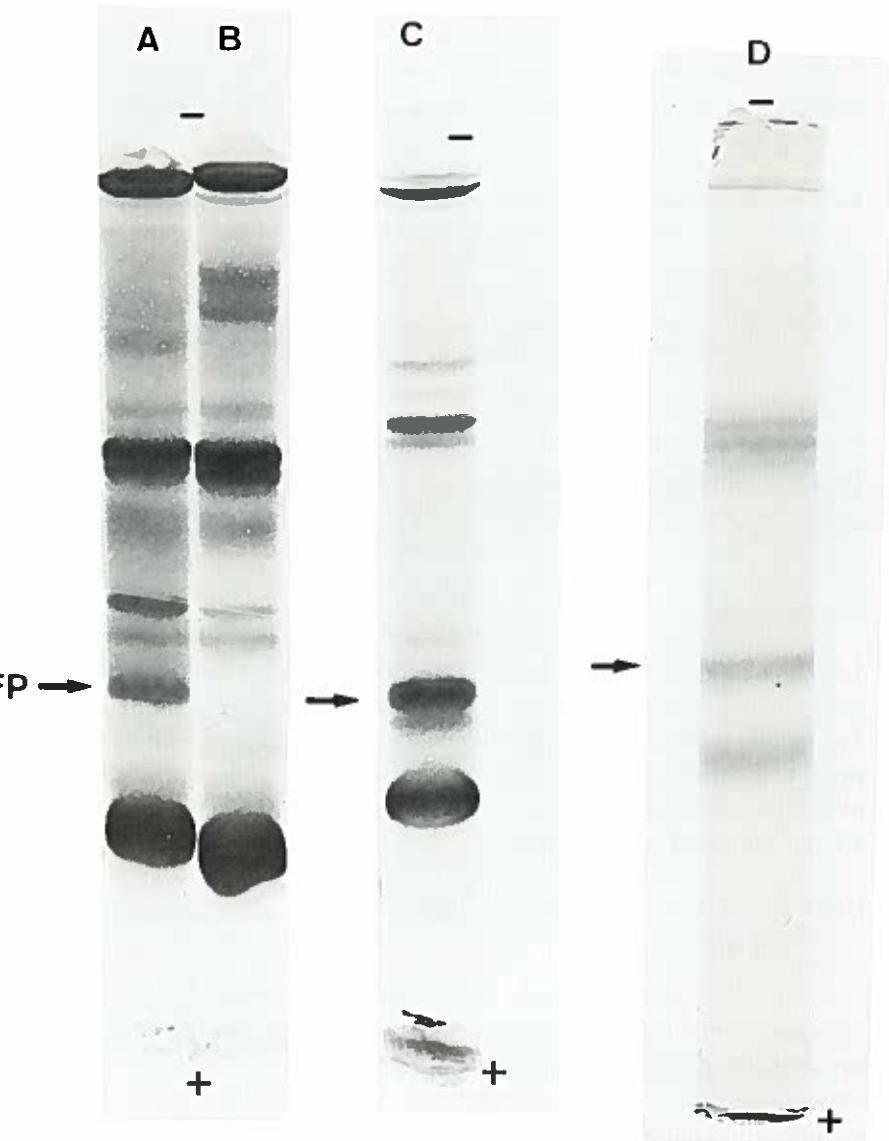


Figura 1.-Electroforesis de disco en gel de acrilamida al 7 %.  
A.-Suero sanguíneo de ratones en período fetal.  
B.-Suero sanguíneo de ratones adultos.  
C.-Suero sanguíneo de ratas en período fetal.  
D.-Líquido amniótico de cerdas.

## *II.-Preparación de antisuero para la alfafetoproteína*

El esquema de inmunización descrito en la tabla 1 muestra el proceso de preparación de antisueros específicos contra la alfafetoproteína presentes en

TABLA N.<sup>o</sup> 1

**Esquema de inmunización seguido para la obtención de antisuero (anticuerpo) contra alfa-fetoproteína de líquido amniótico de cerdas.**

Conejos New Zeland (2.5 Kgs.)

- 1.<sup>a</sup> inyección (0.5 mgrs. de alfafetoproteína disueltos en 1 ml. de PBS y homogeneizados con 0.5 mls de A. C. Freud). Múltiples inyecciones en el dorso. Subcutáneas.  
↓
- 2.<sup>a</sup> inyección (se realizó igual que la 1.<sup>a</sup> 15 días después).  
↓
- 3.<sup>a</sup> inyección (se realizó igual que la 1.<sup>a</sup> 15 días después).  
↓
- Toma de muestra (prueba de immunodifusión)  
↓
- Sangría  
↓
- Centrifugación (el sobrenadante se congela hasta su uso).

LA y LA-SS ratones, para lo cual se purificaron por el método rápido, Fig. 1A, pequeñas cantidades de  $\alpha$ -FP para el desarrollo del proceso de inmunización. Los sueros sanguíneos anti-alfafetoproteína obtenidos se contestaron mediante pruebas de immunodifusión (Fig. 2) e inmunoelectroforesis. Los anti sueros así obtenidos se emplearon posteriormente en el proceso de purificación de las alfafetoproteínas por cromatografía de afinidad.

## *III.-Purificación de la alfafetoproteína por cromatografía de afinidad sobre CNBr 4B Sepharosa.*

Antes de la purificación de las alfafetoproteínas por cromatografía de afinidad, y como paso previo para la obtención de una fracción rica en  $\alpha$ -FP, mediante la eliminación de parte de la fracción albúmina y otras proteínas séricas, los LAs se cromatógrafiaron en columna de DEAE 52. La fracción rica en alfafetoproteína se cromatógrafió en columna de Separosa CNBr 4B al que se ligó el suero anti-alfafetoproteína correspondiente.

Las fracciones absorbida y no absorbida de la columna se sometieron a análisis electroforético en gel de acrilamida con resultados que se muestran en la Fig. 3.

## *IV.-Cálculo del peso molecular*

El cálculo del peso molecular se realizó sometiendo a electroforesis muestras purificadas de alfafetoproteína junto con proteínas de peso molecular

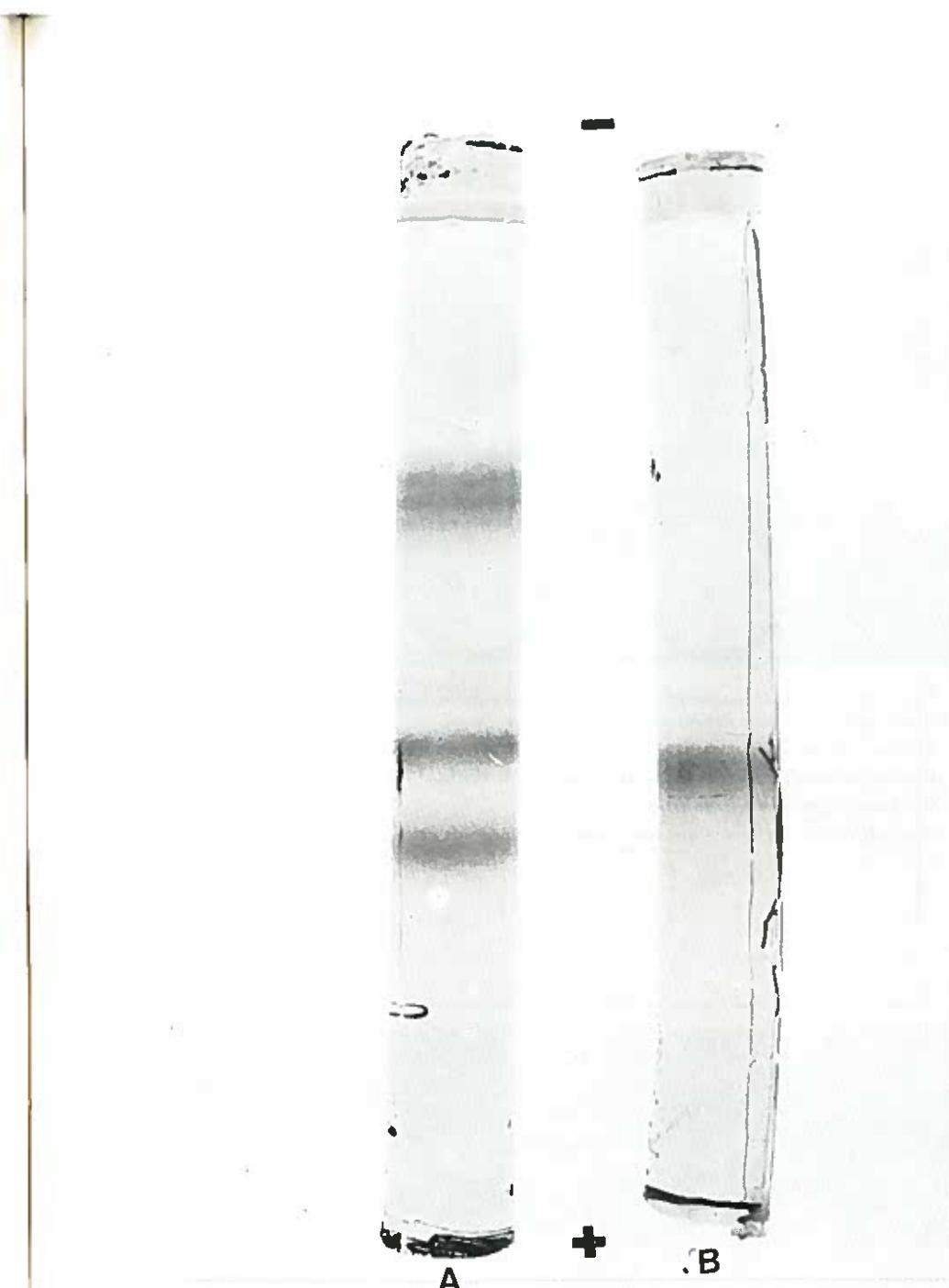


Figura 1A.-Electroforesis en gel de acrilamida de líquido amniótico de cerda y una muestra de alfa-fetoproteína de la misma procedencia purificada.

A.-Líquido amniótico de cerda.

B.-Alfa-fetoproteína de cerda purificada.

Electroforesis de disco en gel de acrilamida al 7 %.

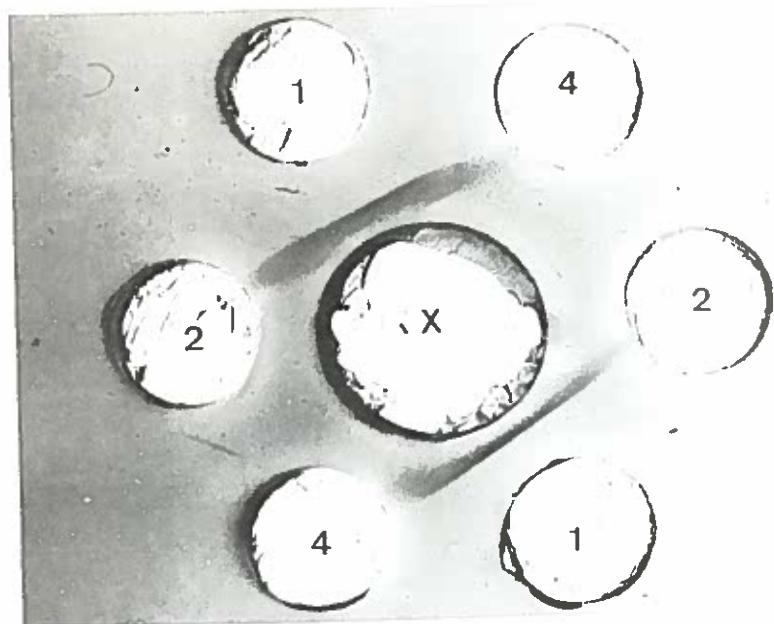


Figura 2.-Prueba de immunodifusión demostrativa de la especificidad del antisuero contra alfa-fetoproteína de líquido amniótico de cerda.

X.: Antisuero específico contra alfa-fetoproteína de líquido amniótico de cerda.

1.: Alfa-fetoproteína purificada de líquido amniótico de cerda.

2.: Alfa-fetoproteína de fetos de ratas.

4.: Alfa-fetoproteína de líquido amniótico-suero sanguíneo de ratones en periodo de gestación.

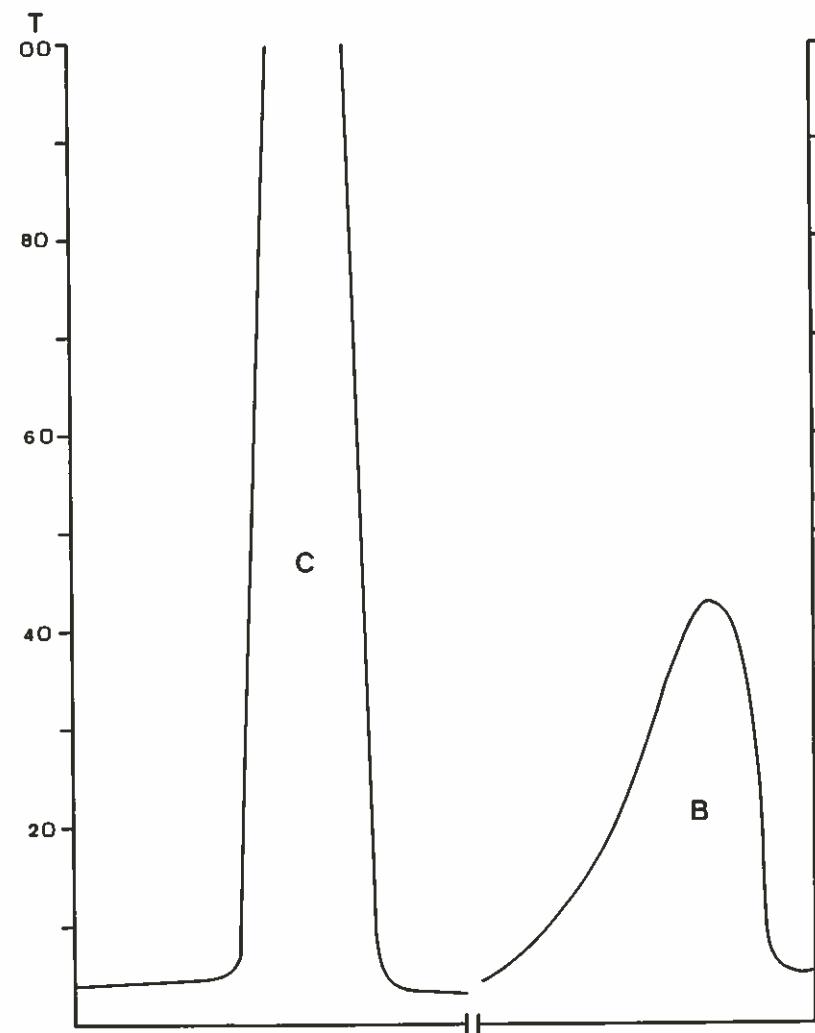


Figura 3.-Cromatografía de afinidad sobre CNBr 4B Sepharosa y electroforesis de disco sobre gel de acrilamida al 7 % de las fracciones obtenidas, de líquido amniótico de cerda.

a.-Líquido amniótico de cerda antes de la cromatografía.

B.-Fracción absorbida.

B<sub>1</sub>.-Comportamiento electroforético de la fracción B.

C.-Fracción no absorbida.

C<sub>1</sub>.-Comportamiento electroforético de la fracción C.

conocido. Los resultados obtenidos que demuestran que la alfafetoproteína de líquido amniótico suero de fetos de ratones tiene un peso molecular de 72.000 daltons, similar al obtenido por otros autores en muestras similares. La alfafetoproteína de líquido amniótico de cerdo resultó tener un peso molecular comparable 70-72.000 daltons.

#### V.-Estudio de la interacción alfafetoproteína-estradiol.

El estudio de la interacción de la alfafetoproteína purificada procedente de LA de cerda y LA-SS de ratones se realizó por dos métodos diferentes:

a) Cromatografía en columna de Sephadex: muestras purificadas de alfafetoproteína se incubaron con el estradiol marcado ( $10^{-8}$  M) durante 30 min. a 35° C, al cabo de los cuales se cromatografiaron en columna de Sephadex G25. En las fracciones obtenidas (1 ml) se determinó el contenido protéico y la actividad radiactiva. Los resultados obtenidos (Fig. 4 y 5) demuestran que la  $\alpha$ -FP procedente de LA-SS de ratones interacciona con el estradiol, pero no la procedente de LA de cerdas.

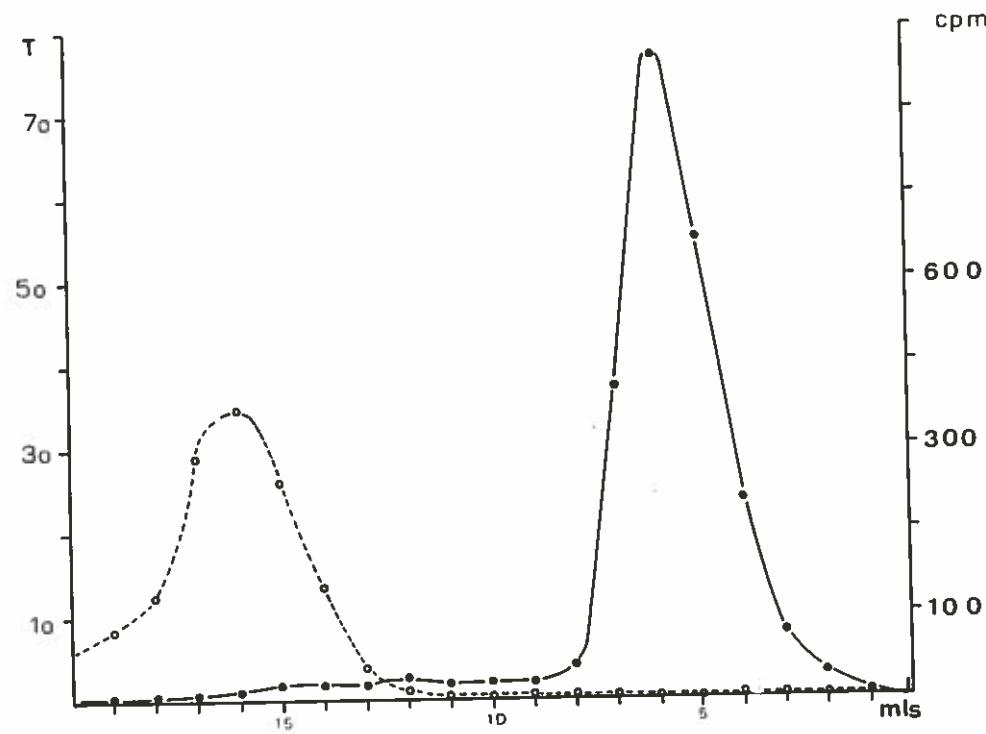


Figura 4.-Cromatografía en columna de Sephadex G25 de alfafetoproteína purificada de líquido amniótico suero sanguíneo de fetos de ratones incubada previamente con  $^3\text{H}$  estradiol ( $10^{-8}$  M). En las fracciones obtenidas (1 ml) se determinó el contenido proteíco y la actividad radiactiva.

- Proteína.
- Radioactividad.

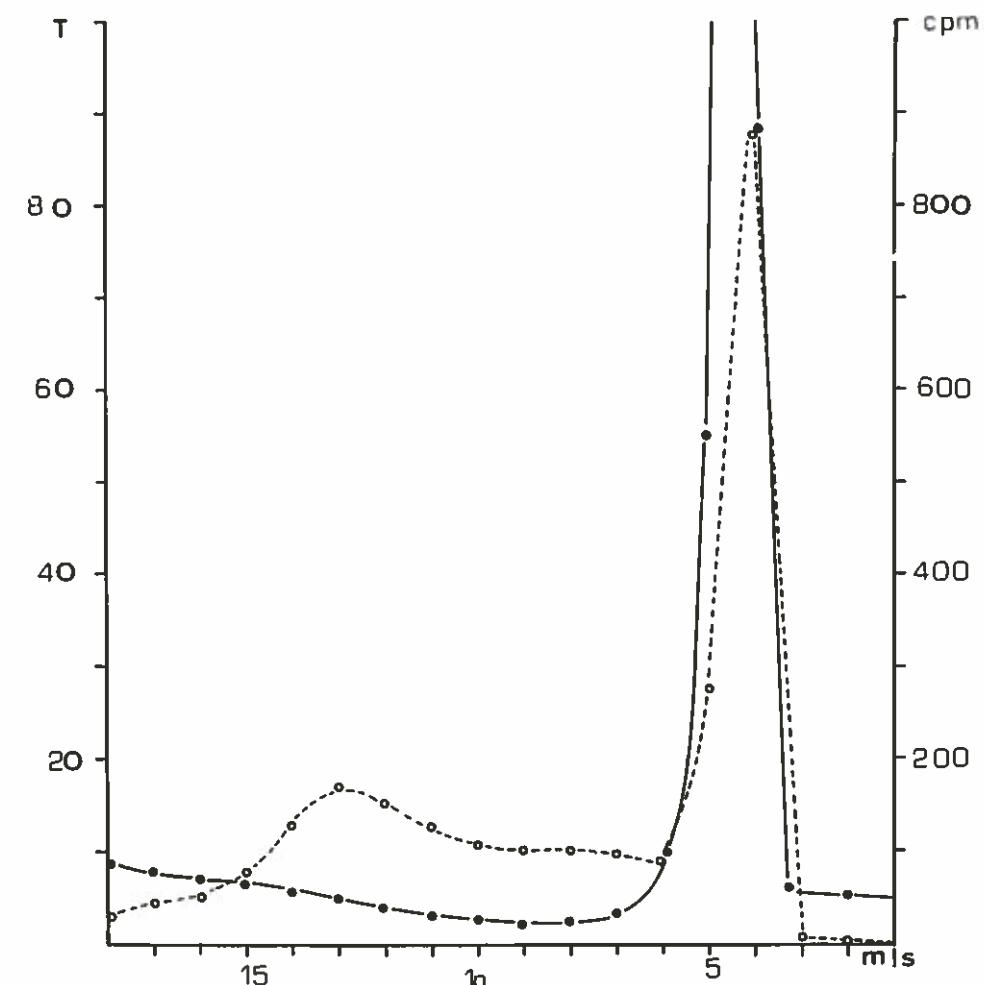


Figura 5.-Cromatografía en columna de Sephadex G 25 de alfa-fetoproteína purificada de líquido amniótico suero sanguíneo de fetos de ratones incubada previamente con  $^3\text{H}$  estradiol ( $10^{-8}$  M). Las fracciones obtenidas (1 ml) se sometieron al examen de la radioactividad y contenido en proteína.

- Proteína.
- Radioactividad.

b) Electroforesis de disco en geles de acrilamida. Muestras purificadas de  $\alpha$ -FP (100  $\mu\text{gr}$ ) se incubaron con estradiol ( $10^{-9}$  M) y se sometieron a análisis electroforético. Uno de los geles se cortó en láminas de 2 mm que se sometieron al recuento de radioactividad. El otro se reveló para la detección de proteínas<sup>8</sup>. Los resultados obtenidos demuestran, al igual que en el método anterior que, a diferencia de lo que ocurre con la procedente de LA-SS de ratón, la alfafetoproteína procedente de LA de cerda no interacciona con el estradiol.

## DISCUSION

Aunque son muy numerosos los estudios realizados sobre la alfafetoproteína de rata<sup>13</sup> y ratones<sup>14</sup> y de la especie humana<sup>14</sup>, son en cambio escasos los llevados a cabo con la alfafetoproteína de otros mamíferos.

Tanto en lo que a su comportamiento electroforético como en cuanto a su peso molecular se refiere no se observa diferencias especiales entre unos<sup>14</sup> y otros.

La diferencia fundamental estriba en su capacidad de interaccionar con los estrógenos a la que se ha atribuido el desempeño de un papel «protector» de los estrógenos mientras se hallan en el torrente circulatorio bloqueándolos y dificultando así la posibilidad de que alcancen «libres» los tejidos altamente receptores de esta hormona, en los que desempeñan importantes papeles en la diferenciación celular; en la interacción alfafetoproteína-estradiol parece hallarse implicada la porción carbohidratos de esta glicoproteína<sup>12</sup>.

La alfafetoproteína de líquido amniótico de cerdo, al igual que la de la especie humana y conejillo de indias, no interacciona con el estradiol, reforzando la hipótesis de que el fenómeno debe hallarse restringido a la rata, ratón y quizá a alguna especie muy próxima.

Sin embargo el hecho de que los estrógenos, al igual que otras hormonas esteroides son transportadas por proteínas presentes en el suero sanguíneo hasta la hipófisis, hipotálamo y otros tejidos altamente receptores, no impidiendo su acción, pone en duda que la función fundamental desempeñada por la alfafetoproteína sea bloquear los estrógenos al interaccionar con estos.

Es de creer por tanto que la alfafetoproteína pueda desempeñar funciones diferentes, sobre todo en las especies en las que la interacción no tiene lugar, habiéndose atribuido en este sentido, importantes papeles como antígeno fetal<sup>1</sup>.

## RESUMEN

Se ha aislado e identificado, siguiendo técnicas electroforéticas y cromatográficas, alfa-fetoproteína de líquido amniótico de cerda en período de gestación de 112-114 días.

La alfa-fetoproteína del líquido amniótico de cerda tiene un peso molecular de 70.000 dalton y no interacciona con el estradiol.

## SUMMARY

Alpha-fetoprotein from the amniotic fluid of 112-114 days of gestation female pig have been isolated. and purified following electrophoretic and chromatographic procedures. Female pig alpha-fetoprotein has a molecular weight of 70.000 daltons and does not interacts with estradiol.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) MASSEYFF, R. (1972).-Pathol. Biol., **20**, 703-725.
- 2) STANISLAWSKI-BIREŃCWAJC, M. y col. (1967).-Cancer Res., **27**, 1990-1997.
- 3) URIEL, J. y col. (1972).-Ann. Inst. Pasteur, **122**, 829-839.
- 4) NUÑEZ, E. A. y col. (1971).-C. R. Acad. Sci., Paris, **273**, 242.
- 5) RAYNAUD y col. (1971).-Steroids, **18**, 767.
- 6) NUÑEZ, E. A. y col. (1971).-C. R. Acad. Sci., Paris, **273**, 831.
- 7) LOWRY, O. H. y col. (1951).-J. Biol. Chem., **193**, 265.
- 8) DAVIS, B. S. (1964).-Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404.
- 9) WEBER y col. (1969).-J. Biol. Chem., **244**, 4406.
- 10) OUCHTERLONY, O. (1953).-Acta Pathol. Microbiol. Scand., **32**, 231.
- 11) SCHEIDEGGER (1955).-Int. Arch. Allergy Appl. Imm., **7**, 103.
- 12) BENASSAYAG y col. (1975).-Bichim. Biophys. Acta, **412**, 295.
- 13) VALLETTE, G. y col. (1976).-Steroids, **28**, 423.
- 14) Proc. Of Int. Conf. St. Paul de Vence (Francia). Colloquium on Alpha-Fetoprotein. Ed. I.N.S.E.R. (1974).