

LOCALIZACION INTRACELULAR DE LA ALFAFETOPROTEINA EN EL DIENCEFALO DE RATON NEONATO

Por J. Ventanas Barroso*
M. C. García González*
C. J. López Bote*
A. López Pérez#
M. A. Fernández Martínez#

I. INTRODUCCION

La alfafetoproteína (AFP) de ratón es la proteína del suero mayoritaria durante el período fetal (niveles de mg/ml), descendiendo progresivamente tras el parto hasta valores sumamente bajos ($\mu\text{g/ml}$) en el adulto^{1, 2}.

La capacidad de la AFP de ratón y rata para ligar estrógenos con alta afinidad ha sido el punto de partida de numerosos estudios encaminados a esclarecer su papel en el crecimiento y diferenciación de los tejidos «blanco» de los estrógenos^{3, 4}. Aunque ha sido ampliamente aceptado que la localización de la AFP durante el período crítico para la diferenciación sexual del cerebro es extracelular, cuya finalidad es proteger el cerebro inmaduro de la hembra contra una excesiva estrogeneización (masculinización)^{5, 6}, experimentos realizados «in vitro» empleando cerebro de ratón, han puesto de manifiesto que el estrógeno es esencial para el crecimiento y expansión de las neuritas⁷. También la administración de estradiol durante este período es capaz de inducir cambios en la síntesis de aminoácidos, neurotransmisores y en la actividad eléctrica^{8, 9}.

La falta de una base morfológica que corrobore los datos bioquímicos antes expuestos, que apunten hacia una localización intraneuronal donde la AFP desempeñaría un papel activo, nos ha movido a desarrollar un procedimiento inmunocitoquímico con el fin de establecer su localización precisa. Cuestión que puede proporcionar la clave para esclarecer el papel fisiológico de esta proteína.

* Cátedra de Bioquímica y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura. Cáceres).

Cátedra de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad de León.
An. Fac. Vet. León, 1984, 30, 217-224.

II. MATERIAL Y METODOS

Preparación de los cortes de tejido hipotalámico.—Se emplearon ratones albinos cepa NMRI, machos y hembras, que fueron sexados el mismo día del nacimiento de acuerdo con la distancia ano-genital. Los animales se sacrificaron por decapitación cervical y se diseccionó el área correspondiente al hipotálamo sobre una superficie refrigerada. A continuación el bloque hipotalámico se sumergió en el líquido de fijación (solución saturada de sublimado en formol neutro al 10%) permaneciendo así 3, 4 días. Posteriormente se procedió a la inclusión en parafina y al montaje de los cortes ($1\ \mu$ de espesor) a la albúmina glicerínada. Los cortes se desparafinaron y rehidrataron estando ya dispuestos para la reacción inmunológica.

Preparación del suero anti-AFP marcado con el fluorocromo.—Partiendo de las Ig G anti-AFP, preparadas como previamente hemos descrito¹⁰, el método seguido comprende las siguientes etapas:

a) Combinación de las IgG con el isotiocianato de fluoresceína. Para lo cual se hizo reaccionar la disolución de Ig G con una cantidad de isotiocianato equivalente al 1/50 de su peso en medio alcalino (pH 9,25) durante cuatro horas.

b) Separación del isotiocianato libre del ligado al anticuerpo por cromatografía en Sephadex G-25. Una vez empaquetado el gel de Sephadex en la columna y equilibrado con Pbs* se aplicó la muestra. Inmediatamente una banda amarilla fuertemente teñida (complejos Ig G-isotiocianato) se separa del fluorocromo libre que difunde más lentamente por el gel. Ambas fracciones se recogieron por separado con un colcctor LKB-Ultrorac 7000.

c) Cálculo de la relación fluoresceína/proteína. La proteína se cuantificó por el método de LOWRY et al.¹¹ y la fluoresceína por absorción a $493\ m\mu$.

Práctica de la reacción de inmunofluorescencia.—Sobre los cortes de tejido hipotalámico se colocó una gota de la disolución de Ig G isotiocianato y se incubó durante una hora a 37°C en cámara húmeda. El anticuerpo no ligado se eliminó por lavados sucesivos con buffer Pbs y se investigó la localización de los complejos Ig G-fluorocromo unidos al antígeno con un microscopio de fluorescencia Nikon Labophot 104, equipado con cámara fotográfica.

III. RESULTADOS

Para evidenciar la presencia de AFP en los cortes de tejido hipotalámico mediante inmunofluorescencia directa, fue necesario previamente la obtención de anticuerpos específicos contra la AFP marcados con un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína). La preparación del antisuero contra la AFP se realizó de acuerdo con un procedimiento ya descrito¹⁰, que permite purificar la fracción Ig G hasta la homogeneidad electroforética (fig. 1). Las Ig G se marcaron con el fluorocromo, procediéndose a la separación del isotiocianato libre por cromatografía en Sephadex

* Pbs (Phosphate buffered saline): solución salina fisiológica tamponada a pH 7,3 con buffer fosfato sódico 0,15M.

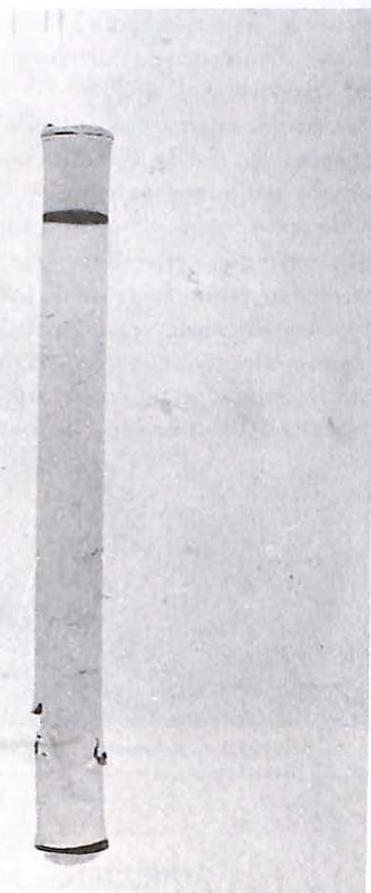


Figura 1.—*Electroforesis en gel de acrilamida (7% de acrilamida) de las Ig G anti-AFP purificadas. Los gels se tiñeron con Coomasie Blue. Anodo en la parte inferior y cátodo en la superior.*

G-25 (fig. 2). La proteína unida al isotiocianato (fracción 1) se recoge con el volumen-vacío y la posterior elución de la columna proporciona el fluorocromo libre (fracción 2). Ambas fracciones se recogieron por separado y se comprobó que únicamente la fracción 1 reaccionaba inmunológicamente con la AFP purificada. También se calculó la relación fluoresceína/proteína, resultando ser 2,58 mol fluoresceína/mol Ig. El grado de marcaje obtenido es adecuado para la práctica de reacciones de inmunofluorescencia en cortes de tejidos, ya que las Ig con menos de dos moléculas de fluoresceína dan reacciones poco sensibles y las muy marcadas (7 o más mol fluoresceína/mol Ig) a menudo conducen a falsas reacciones positivas por absorción no específica sobre el antígeno¹².

La localización del antígeno (AFP) se llevó a cabo incubando las Ig G-isotiocianato de fluoresceína con los cortes obtenidos a partir de hipotálamos de ratones machos y hembras de un día de edad, tal como se describe en el apartado de material y métodos.

La presencia de AFP en el citoplasma de las células hipotalámicas, revelada por inmunofluorescencia directa (IF), es perceptible incluso a bajos aumentos (x100 y x400) siendo ya resolutive la observación a x1000 con objetivo de inmersión (figs. 3 y 4). La presencia de fluorescencia inespecífica fue descartada mediante los oportunos controles. Tampoco la posibilidad de reacción cruzada del antisuero con otras proteínas, en particular la albúmina, justificaría la reacción positiva de IF ya que la monoespecificidad de las Ig G-isotiocianato frente a la AFP había sido comprobada previamente por inmunodifusión¹³ e inmunolectroforesis¹⁴.

En ambos sexos, diversos grupos de células hipotalámicas reaccionaron positivamente mostrando fluorescencia específica que se circunscribe a las neuronas (figs. 3 y 4), apareciendo también teñidos los vasos sanguíneos y débilmente fluorescentes los espacios extracelulares. Dentro de las células la localización del antígeno es intracitoplasmática, contrastando la total ausencia de fluorescencia en el núcleo con el halo brillante perinuclear extensivo al resto del citoplasma. Observándose incluso (fig. 4) teñidos los segmentos iniciales del axón y prolongaciones dendríticas.

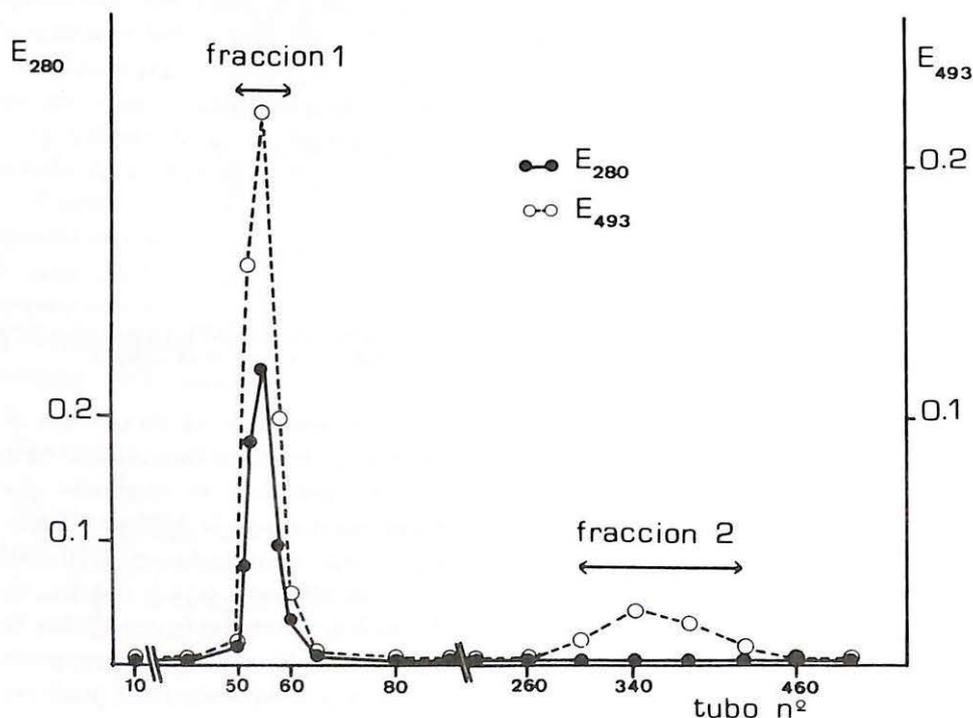


Figura 2.—Separación de los complejos Ig G-isotiocianato de fluorocromo libre por cromatografía en Sephadex G-25. Tras la incubación de las Ig G con el isotiocianato la mezcla se aplicó a una columna de Sephadex G-25. Al eluir con Pbs se obtienen dos fracciones, la fracción 1, que contiene los complejos Ig G-isotiocianato, y la fracción 2 que únicamente contiene fluorocromo.

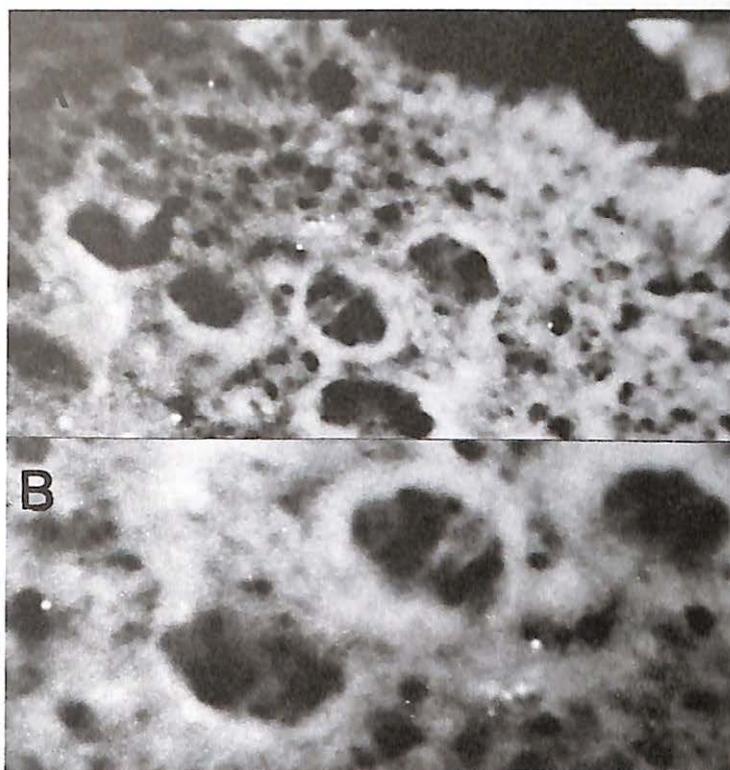


Figura 3.—Localización intracelular de la AFP en las neuronas del hipotálamo de ratón. En A se muestra un grupo de células que dan una reacción positiva, nótese la ausencia total de fluorescencia en el núcleo. B: detalle de A.

IV. DISCUSION

La localización intracelular de la AFP en el hipotálamo de ratón observada por nosotros, viene a corroborar que desempeña un papel activo en el crecimiento y diferenciación neuronal, suposición que hasta ahora se basaba únicamente en datos bioquímicos^{8, 9}, pero no morfológicos. Estos hechos, unidos a la capacidad de la AFP para ligar estrógenos con alta afinidad^{3, 4}, ponen en duda que la función de la AFP en la diferenciación sexual del cerebro sea puramente pasiva por bloquear el estradiol circulante. Más bien su presencia intracelular sugiere que actúa como transportador de estradiol al interior de las neuronas. Una vez en el citoplasma, tendría lugar una disociación de los complejos AFP-estradiol y la captación de éste por sus receptores de alta afinidad, cuya presencia en el área hipotalámica ha sido demostrada por autorradiografía¹⁵. De esta manera la AFP se convertiría en una proteína capaz de suministrar estradiol al cerebro en diferenciación, cuya presencia es necesaria tanto para el desarrollo del tipo masculino como femenino¹⁶, y además, como recientemente ha sido demostrado¹⁷, ácidos grasos poliinsaturados (a.g. esenciales) cuya importancia es esencial para el desarrollo del sistema nervioso.

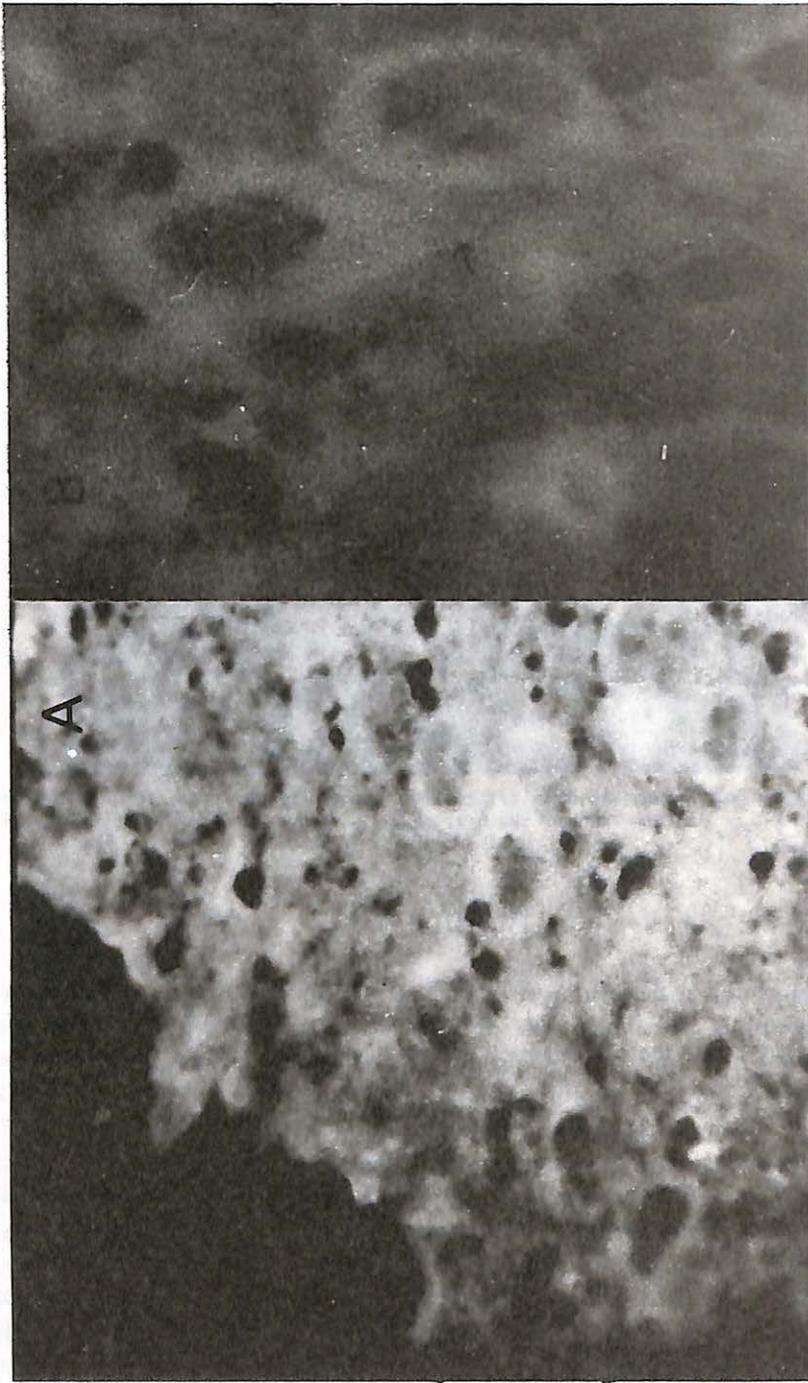


Figura 4.—Grupo de células hipotalámicas que reaccionan positivamente. Al igual que en la figura 3, se aprecia que la localización del antígeno es intracitoplasmática. En B se muestran con más detalle dos células positivas de A, observándose la extensión de la fluorescencia a las prolongaciones neuronales (flecha).

Una cuestión no resuelta a partir de los resultados aportados en esta publicación es si la presencia intracitoplasmática de la AFP se debe a que es sintetizada por las propias células nerviosas o es un filtrado del plasma, posibilidad esta última perfectamente factible dada la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica durante este período¹⁸.

VI. RESUMEN

Se ha investigado la localización de la AFP en el hipotálamo de ratón mediante inmunofluorescencia directa. Diversos grupos de células hipotalámicas reaccionan positivamente mostrando fluorescencia específica. Dicha fluorescencia se circunscribe al citoplasma, estando ausente en el núcleo. La localización intracelular de la AFP pone en duda el papel de la AFP como protector del cerebro de la hembra frente a los altos niveles de estrógenos circulantes durante el período crítico para la diferenciación sexual.

EVIDENCE FOR INTRACELLULAR LOCALIZATION OF ALPHA-FETOPROTEIN (AFP) IN THE MOUSE HYPOTHALAMUS

SUMMARY

The morphological localization of the estrogen binding serum protein, alpha-fetoprotein, has been studied in the mouse hypothalamus by direct immunofluorescence. Positive staining for AFP was observed in some, but not all of the hypothalamic neuros. These cells contained darkly stained cytoplasm with pale zones of nuclear sparing. The intraneuronal localization of AFP forces one to reconsider the generally held concept that AFP protect the female rodent brain against masculinization from the high oestrogens levels present during the critical period for sexual differentiation.

V. BIBLIOGRAFIA

- 1) ABELEV, G. I.; E. ALPERT; E. W. HULL; R. MASSEYEFF; B. DE NECHAUD; J. S. TATARINOV y J. URIEL (1970).—Fetospecific serum proteins: Recomendations for a uniform terminology. *Bull WHO*, **43**, 309-310.
- 2) GITLIN, D., y M. BOESMAN (1967).—Fetus-specific serum proteins in severals mammals and their relation to human fetoprotein. *Comp. Biochem. Physiol.*, **21**, 327-336.
- 3) URIEL, J.; B. DE NEUCHAUD, y M. DUPIERS (1972).—Estrogen binding properties of rat, mouse and man fetospecific serum proteins. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **46**, 1175-1180.

- 4) AUSSEL, C., y R. MASSEYEF (1978).—Rat alpha-fetoprotein-estrogen interaction. *J. Steroid Biochem.*, **9**, 547-551.
- 5) McEWEN, B. S. (1976).—Interaction between hormones and nerve tissue. *Scientific Am.*, **235**, 48-58.
- 6) DAVIES, I. J.; F. NAFTOLIN; K. J. RYAN, y J. SIU (1976).—Specific binding of steroids by neuroendocrine tissues. En «Subcellular Mechanism in Reproductive Neuroendocrinology» (F. Naftolin, K. J. Ryan, y I. J. Davies, Ed.). Elsevier. Amsterdam, 263-275.
- 7) TORAN-ALLERAND, C. D. (1976).—Sex steroids and the development of the newborn hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation. *Brain Res.*, **106**, 407-412.
- 8) HUDSON, D. B.; A. VERNADAKIS, y P. S. TIMIRAS (1970).—Regional changes in aminoacid concentration in the developing brain and the effects of neonatal administration of estradiol. *Brain Res.*, **23**, 213-222.
- 9) HEIM, L. M., y P. S. TIMIRAS (1963).—Gonad-brain relationship: precocious brain maturation after estradiol in rats. *Endocrinology*, **72**, 598-606.
- 10) VENTANAS, J.; A. LÓPEZ, y J. BURGOS (1982).—Purificación de las IgC-anti AFP de suero de ratón. *Ann. Fac. de Vet. León*, **28**, 245-254.
- 11) LOWRY, O. H.; N. J. ROSSEBROUGH; A. L. FARR, y R. J. RANDALL (1951).—Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 12) McKINNEY, R. M.; J. T. SPILLANE, y G. W. PEARCE (1965).—A simple method for determining the labelling efficiency of fluoresceine isothiocyanate products. *Ann. Biochem.*, **14**, 421-424.
- 13) OUCHTERLONY, O. (1953).—Antigen-antibody reactions in gel; types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Path. Med. Scand.*, **32**, 231-240.
- 14) SCHEIDEGGER, J. J. (1955).—Une micro-methode de l'immuno-electrophorese. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, **7**, 103-109.
- 15) Mc LUSKY; N. J. y F. NAFTOLIN (1981).—Sexual Differentiation of the central nervous system. *Science*, **211**, 1294-1301.
- 16) TORAN-ALLERAND, C. D. (1980).—Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: morphological correlates and hormonal specificity. *Brain Res.*, **189**, 413-427.
- 17) PINEIRO, A.; A. M. OLIVITO, y J. URIEL (1979).—Fixation of poliunsaturated fatty acids by rat alpha-fetoprotein. Relation with the incorporation of these acids by the developing rat brain. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **289**, 1053-1056.
- 18) DAVSON, H. (1976).—Review lecture, the blood brain barrier. *J. Physiol. (London)*, **255**, 1-28.