

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON IGG-ANTIAFP SOBRE EL DIMORFISMO SEXUAL EN CUANTO A PESO CORPORAL EN EL RATON

Por J. Ventanas Barroso#

A. López Pérez*

J. Burgos González*

M. A. Fernández Martínez*

INTRODUCCION

Es generalmente aceptado que la diferenciación sexual del cerebro de ratón y rata se encuentra influida por la exposición a las hormonas esteroides durante los días 1 a 5 post-partum^{1, 2}. La administración de estradiol andrógenos aromatizantes (testosterona) a las hembras durante este «período crítico» tiene como resultado una masculinización artificial del comportamiento, funciones reproductivas y otras manifestaciones morfológicas externas^{2, 3, 4}. Observaciones como estas han servido de soporte a la idea de que la masculinización del cerebro es debida a la conversión de los andrógenos en estrógenos mediante los enzimas aromatizantes presentes en el sistema límbico⁵.

Las alfabetoproteínas (AFP) de ratón y rata, a diferencia de otras AFP como la humana, interaccionan con el estradiol y estrona con alta afinidad^{6, 7}. Se ha sugerido por esta razón que la AFP protege el cerebro contra un exceso de estradiol circulante, por tanto, sería lógico pensar que la neutralización de la AFP de ratón con anticuerpos homólogos ejerza efectos fisiológicos similares a los de la administración de estradiol o testosterona durante el período crítico. En el trabajo que aquí se describe, se estudian los efectos que sobre el peso corporal —una de las manifestaciones del dimorfismo sexual— tiene la administración de IgG anti-AFP a ratones machos y hembras de 1, 3 y 5 días de edad.

MATERIAL Y METODOS

Para la obtención de suero sanguíneo se emplearon ratones albinos cepa NMRI de 1 día de edad. Los animales se sacrificaron por decapitación cervical y se recogió la

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, 225-231.

sangre con buffer fosfato 0,15M (pH 7,3). El suero se separó de las células sanguíneas por centrifugación a 2.000 xg durante 5 minutos.

Para la obtención rápida de pequeñas cantidades de alfa-fetoproteína a partir del suero de ratón se empleó el método electroforético descrito por BENASSAYAG⁸. La electroforesis se efectuó en gel de poliacrilamida siguiendo el método de DAVIS⁹.

En la preparación del suero anti-AFP se utilizaron conejos New Zeland de 2,5 kg de peso. La especificidad del antisuero obtenido se comprobó por inmunodifusión e inmunoelectroforesis; para la inmunodifusión se siguió la técnica de OUCHTERLONI¹⁰ y la inmunoelectroforesis se efectuó de acuerdo con SCHEIDEGGER¹¹. La IgG anti-AFP se obtuvo a partir del antisuero, como se describe en un trabajo previo¹². Con el método empleado se consigue purificar las IgG hasta la homogeneidad electroforética.

Para los tratamientos con IgG anti-AFP se emplearon un total de 192 ratones NMRI distribuidos en 12 lotes de 16, uno de machos y otro de hembras, con sus correspondientes controles. El sexage se efectuó el mismo día del nacimiento basándose en la distancia ano-genital, y se ajustó a 8 el número de animales por camada. Los lotes experimentales fueron inyectados por vía subcutánea con IgG anti-AFP disuelta en suero fisiológico y los controles sólo con el suero, tras la filtración del inóculo a través de un Millipore (poro de 0,22 μ m). Los animales se alimentaron *ad libitum* con leche materna hasta su destete, el día 21, a partir del cual recibieron una dieta standard para ratones, controlándose semanalmente el peso vivo.

RESULTADOS

Las IgG anti-AFP se purificaron siguiendo una metodología ya descrita por nosotros anteriormente¹² mediante inmunización de conejos New-Zeland de 2,5 kg de peso con AFP de suero de ratón. AFP que fue aislada (fig. 1) de acuerdo con el método electroforético propuesto por BENASSAYAG⁸. Los anticuerpos se administraron, por vía subcutánea, en una sola inoculación, siendo el vehículo suero

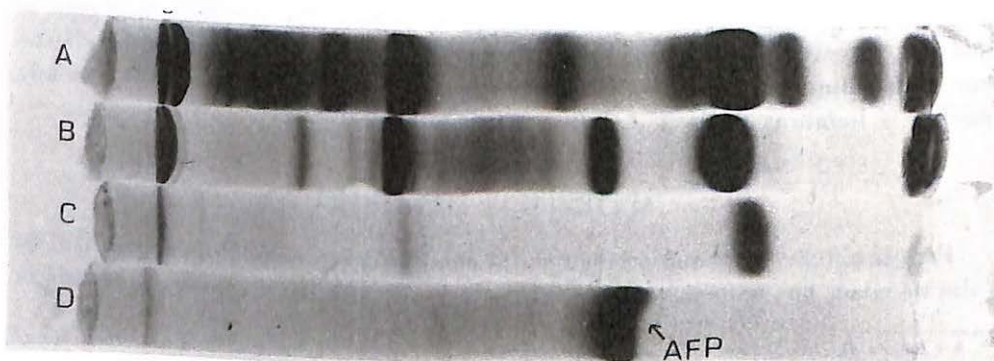


Figura 1.—Electroforesis de disco en gel de acrilamida al 7%. (A) Suero de ratón adulto. (B) Suero de ratón de 1 día. (C) Albúmina de suero de ratón. (D) AFP purificada por el método de Benassayag.

fisiológico. En antisuero contenía 10 mg/ml de anticuerpos específicos contra la AFP, como se determinó por precipitación cuantitativa¹³, que de acuerdo con el volumen empleado (10 μ l) arroja una dosis de 0,1 mg/animal. Cantidad capaz de inmunoprecipitar la AFP contenida en 150 ml de suero de ratón neonato, hecho que fue comprobado mediante inmunodifusión radial según MANCINI¹⁴.

En la tabla I se muestran los resultados del tratamiento con IgG anti-AFP sobre el peso corporal.

El estudio estadístico de los pesos corporales al fin del período experimental (55 días) muestra (ver tabla I) que el correspondiente de las hembras no se ve afectado por el tratamiento de IgG anti-AFP efectuado a los 1, 3 y 5 días de edad, ya que no existen diferencias significativas con respecto a las hembras controles.

En cambio en los machos, el bloqueo de la AFP con anticuerpos homólogos provoca una disminución del peso corporal final estadísticamente significativa ($P < 0,01$) cuando el tratamiento se efectúa los días 3 y 5 de su vida. El peso de los machos tratados el día 1 es ligeramente superior al de los controles, pero la diferencia carece de significación estadística ($P > 0,05$).

TABLA I
Efectos del tratamiento con IgG anti-AFP sobre el peso corporal

Los valores abajo expresados se refieren al peso adulto, considerando como tal el peso a los 55 días de edad.

Abreviaturas: M, macho. H, hembra.

Sexo	Tratamiento	Peso vivo (g) \pm SD	
M	Suero fisiológico	40,18 \pm 2,13	—
M	IgG anti-AFP en el día 1	40,46 \pm 1,98	N.S.
M	IgG anti-AFP en el día 3	36,59 \pm 1,23	$P < 0,01$
M	IgG anti-AFP en el día 5	35,34 \pm 1,26	$P < 0,01$
H	Suero fisiológico	31,50 \pm 1,94	—
H	IgG anti-AFP en el día 1	31,15 \pm 2,01	N.S.
H	IgG anti-AFP en el día 3	31,42 \pm 1,72	N.S.
H	IgG anti-AFP en el día 5	30,80 \pm 1,96	N.S.

Los efectos del tratamiento sobre el dimorfismo sexual del crecimiento, se expresan en la figura 2, en la que se representan las diferencias de peso de los machos con respecto a las hembras en cada uno de los cuatro grupos establecidos (controles y tratados días 1, 3 y 5, con el fin de determinar en qué medida el tratamiento con IgG anti-AFP modifica las diferencias del peso relacionadas con el sexo.

En los animales tratados el día 1, la administración de IgG anti-AFP no modifica significativamente el curso normal de las desviaciones de peso; es decir, se inicia —al igual que en los controles— un despegue del peso de los machos con respecto al de las hembras, coincidiendo con la llegada de la pubertad en éstas, estabilizándose las diferencias relacionadas con el sexo cuando los machos alcanzan este mismo estado fisiológico (40-45 días). A partir de ese momento, el ritmo de crecimiento sigue un curso paralelo en ambos sexos.

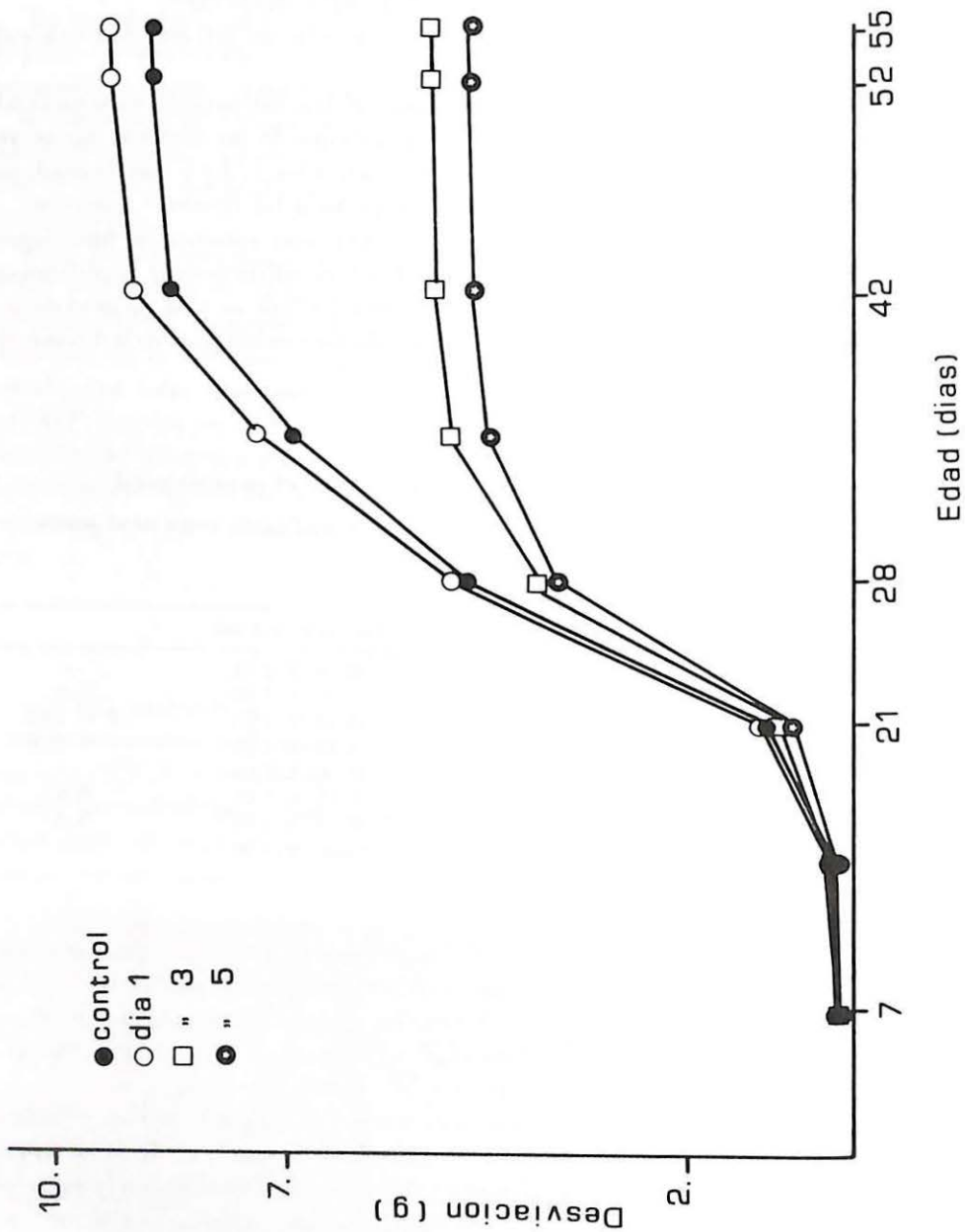


Figura 2.—Desviación del peso corporal entre los machos y hembras controles (●), tratados el día 1 (○), 3 (□) y 5 (●), a lo largo del crecimiento.

En cambio los animales tratados los días 3 y 5 se observa que la fase prepuberal de crecimiento rápido se acorta en los machos, aproximándose el momento de tránsito a la de crecimiento lento a aquél en que el fenómeno se produce en las hembras, con lo que se atenúa notablemente el dimorfismo sexual del crecimiento...

DISCUSION

De acuerdo con la hipótesis, generalmente admitida, sobre el papel de la AFP como bloqueadora del estradiol circulante, sería de esperar que el tratamiento con IgG anti-AFP condujera a una masculinización (androgeneización) con el consiguiente incremento en el peso corporal de las hembras, tal como se observa al tratarlas con estradiol o testosterona durante el período crítico.

No obstante, experimentos realizados por MIZEJEWSKI y cols.¹⁵, quienes administran anti-AFP a ratones hembras NYLAR de acuerdo con el mismo protocolo al seguido ahora por nosotros, demuestran que no sólo no se obtiene un incremento del peso corporal, sino que se reduce hasta un 20% respecto a los controles; aún a pesar que el tratamiento induce efectivamente una masculinización de las funciones reproductivas (sólo el 14% mostraban cuerpos lúteos en sus ovarios frente al 78% de los controles). Los autores referidos¹⁵ atribuyen la disminución del peso corporal en las hembras a la aparición de cambios neurológicos (hidrocefalia principalmente) asociados al tratamiento, hecho no observado por nosotros, por lo que en este punto pensamos que no existe discrepancia entre ambas experiencias.

En cuanto al descenso en el peso de los machos, es un hecho compatible con el papel, recientemente atribuido a AFP, como transportadora de ácidos grasos esenciales y estradiol al sistema nervioso en desarrollo¹⁶. Estradiol necesario para el desarrollo del modelo masculino¹⁷. La disminución del peso en los machos obedecería entonces a un fallo en el sistema de transporte del esteroide. Que el tratamiento sea más efectivo en los días 3 y 5 lo atribuimos a que los niveles de AFP disminuyen en sangre tras el nacimiento siguiendo un curso logarítmico, así como a que la capacidad del suero de ratón para ligar estradiol representa a los 4 días de edad menos del 1% del neonato. Por estas razones el bloqueo inmunológico pudo ser más efectivo en los días 3 y 5, edades aún incluidas dentro del «período crítico».

RESUMEN

Se han estudiado los efectos del bloqueo inmunológico de la alfafetoproteína durante el período crítico sobre el peso corporal —una de las manifestaciones del dimorfismo sexual— en ratones machos y hembras. Para ello fue necesario la purificación de la IgG anti-alfafetoproteína que se realizó mediante precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 50% del suero de conejo inoculado con AFP electroforéticamente pura y el pase a través de DEAE-Sephadex A-50.

La inyección de IgG anti-AFP no se traduce en diferencias significativas en el

peso de las hembras tratadas respecto a los controles. En los machos, en cambio, provoca una disminución del ritmo de crecimiento pero sólo cuando el tratamiento se efectúa los días 3 y 5 post-partum.

Estos resultados son difíciles de conciliar con el papel de la AFP como antígeno fetal, sugiriendo más bien que se trata de una proteína transportadora.

IMMUNOLOGICAL BLOCK OF ALPHA-FETOPROTEIN: EFFECT ON MICE GROWTH

SUMMARY

IgG anti-AFP, isolated from rabbit antiserum to mouse AFP, or vehicle (controls) were injected s.c. on 1, 3 and 5 days old male and female mice. The mice were observed weekly for litter size, mortality, etc., and the body weight was recorded.

The IgG injection on male 3 and 5 days old depressed growth below vehicle treated males. However, the antibody treated males 1 day old and female 1, 3 and 5 days old don't show body weight statistically different from controls. These findings force one to reconsider the generally held role of AFP as foetal antigen, suggesting more that is a carrier protein.

BIBLIOGRAFIA

- 1) McEWEN, B. S. (1976).—Interaction between hormones and nerve tissue. *Sci. American*, **235**, 48-58.
- 2) HARRIS, G. W. (1964).—Sex hormones, brain development and brain function. *Endocrinology*, **75**, 627-648.
- 3) CLEMENS, L. G.; CLAUDE, B. A., y CONIGLIO, L. P. (1978).—Prenatal endogenous androgenic influences on masculine sexual behavior and genital morphology in male and female rats. *Horm. Behav.*, **10**, 40-53.
- 4) HART, B. L. (1977).—Neonatal dihydrotestosterone and estrogen stimulation. *Horm. Behav.*, **8**, 193-200.
- 5) NAFTOLIN, F.; RYAN, K. J., y DAVIES, I. J. (1975).—The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Progr. Horm. Res.*, **31**, 295-319.
- 6) URIEL, J.; DE NECHAUD, B., y DUPIERS, M. (1972).—Estrogen binding properties of rat, mouse and man fetospecific serum proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **46**, 1175-1180.
- 7) AUSSER, C., y MASSEYEF, R. (1978).—Rat alpha-fetoprotein-estrogen interaction. *J. Steroid Biochem.*, **9**, 547-541.
- 8) BENASSAYAG, C.; VALLETE, G.; CITANOVA, N.; NÚÑEZ, E., y JAYLE, M. (1975).—Isolation of two forms of rat AFP and comparison of their binding parameters with estradiol-17. *Biochem. Biophys. Acta* **412**, 295-305.
- 9) DAVIS, B. J. (1964).—Disc electrophoresis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
- 10) OUCHTERLONI, O. (1953).—Antigen-antibody reactions in gels; types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Path. Microb. Scand.*, **32**, 231-240.
- 11) SCHEIDEGGER, J. J. (1955).—Une micro methode de l'immuno-electrophorese. *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.*, **7**, 103-109.
- 12) VENTANAS, J.; LÓPEZ, A., y BURGOS, J. (1982).—Purificación de las IgG anti-AFP de suero de ratón. *Ann. Fac. de Vet. León*, **28**, 245-254.

- 13) CAMPBELL, D. H.; GARVEY, J. S., y CREMER, N. E. (1970).—Quantitative determination of precipitating antibody. En *Methods in Immunology* 2nd Ed. Benjamin, N. Y., 245-250.
- 14) MANCINI, G.; CARBONARA, A. O., y HEREMANS, J. F. (1965).—Immunochemical quantitation of antigens by single radial diffusion. *Immunochem.*, **2**, 237-245.
- 15) MIZEWSKI, G. J.; VONNEGUT, M., y SIMON, R. (1980).—Neonatal androgeneization using antibodies to AFP. *Brain Res.*, **178**, 273-277.
- 16) PINEIRO, A.; OLIVITO, A. M., y URIEL, J. (1979).—Fixation of polyunsaturated fatty acids by rat AFP. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **289**, 1053-1056.
- 17) TORAND-ALLERAND, C. D. (1980).—Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro. *Brain Res.*, **189**, 413-427.
- 18) SAVU, L. (1973).—Colloque on AFP. *Proc. Int. Conf. Saint Paul de Vence*, France, INSERM Ed., 75-83.