

El deterioro conductual e inmunológico de ratones hemizigotos para la tirosina hidroxilasa depende del ambiente social

Idoia Iriarte Arce. Antonio Garrido Tarrío. Julia Cruces González.

Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.
iriarte.idoia@gmail.com

Tutora
Mónica De la Fuente del Rey

Departamento de Fisiología Animal II. Facultad de Ciencias Biológicas, 28040 Madrid.
mondela@bio.ucm.es

Resumen: Una adecuada homeostasis, la cual supone una correcta comunicación entre los sistemas reguladores (nervioso, endocrino e inmunitario), es fundamental para el mantenimiento de la salud. El eje simpático- adreno-medular (SAM) y sus productos finales, las catecolaminas (CAs), representa un ejemplo relevante de esa comunicación, dada la capacidad de las células inmunitarias para responder a dichas CAs. No obstante, se desconoce si individuos con déficit de CAs podrían tener un deterioro tanto del sistema nervioso como del inmunitario. El objetivo del trabajo fue estudiar si este deterioro tenía lugar en ratones hemizigotos para la tirosina hidroxilasa (ThKO), enzima limitante de la síntesis de CAs. Además, se quiso considerar la influencia del ambiente social en los resultados obtenidos. Se utilizaron ratones ICR-CD1 hembras adultas, tanto ThKO como los correspondientes controles (C). Había 4 grupos de animales dependiendo de la presencia en la jaula de más de un 50% de uno u otro tipo (ThKO o C). Se valoró la respuesta conductual en un laberinto en T, así como varias funciones (fagocitosis, actividad Natural Killer y linfoproliferación) de las células inmunitarias peritoneales. Los resultados mostraron que, en conjunto, los ratones ThKO no diferían conductual e inmunológicamente de los ratones C. Sin embargo, los ThKO que conviven en jaulas con más de un 50% de ThKO, sí muestran un significativo deterioro en los parámetros valorados respecto a los demás grupos. En conclusión, el ambiente social parece determinar, en mayor medida que la mutación, el estado de los animales a nivel conductual e inmunitario.

Palabras clave: homeostasis. Eje SAM. Catecolaminas. Tirosina hidroxilasa. Ambiente.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas reguladores (nervioso, endocrino e inmunitario), encargados de mantener la homeostasis, el equilibrio funcional que permite la salud del organismo,

funcionan en estrecha comunicación constituyendo lo que se denomina el sistema psiconeuroinmunoendocrino ^(1,2). Un ejemplo de esta comunicación es el eje simpático-adreno-medular (SAM), muy implicado en la respuesta neuroendocrina al estrés y cuyos productos finales, las catecolaminas (CAs), modulan la función inmunitaria ^(2, 3).

Las CAs, dopamina, noradrenalina y adrenalina, son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina en una ruta metabólica cuya primera enzima es la tirosina hidroxilasa (TH). Cuando un individuo se enfrenta a un estrés agudo, el eje SAM se activa, induciendo la liberación de CAs en un intento por mantener la homeostasis ^(2, 3), dándose cambios conductuales e inmunitarios necesarios para llevar a cabo una adecuada respuesta del organismo a la situación de estrés y permitiendo los procesos de adaptación. Por lo indicado, el producir unos niveles adecuados de CAs es fundamental para preservar la funcionalidad de esos sistemas.

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que el ambiente social en el que se encuentre un individuo condiciona su respuesta conductual e inmunitaria ^(3,4,5). Por todo ello el objetivo del presente trabajo fue estudiar en ratones hemizigotos para la tirosina hidroxilasa (*Tyrosine Hydroxylase Knock Out*, ThKO), los cuáles únicamente contienen un alelo para el gen que la codifica ⁽⁶⁾, una serie de respuestas conductuales y funciones de las células inmunitarias. Además, se quiso comprobar si el convivir con un mayor número de ThKO o de controles podían condicionar los resultados obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado ratones ICR-CD1 hembra adultas ThKO y controles (C), distribuidas en 4 grupos: 1) C que conviven con más de un 50% de C; 2) C que lo hacen con más de un 50% de ThKO; 3) ThKO que conviven con más de un 50 % de C, y 4) ThKO que conviven con más de un 50% de ThKO. Todas las jaulas se mantuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura, con comida y agua *ad libitum* y en ciclo invertido de 12 horas de luz/12 de oscuridad.

Las respuestas conductuales se estudiaron utilizando un laberinto en T, siguiendo el método previamente descrito ⁽⁷⁾. Se obtuvieron los siguientes parámetros: tiempo de cruce, entendiendo por el mismo el tiempo que tarda el animal en cruzar la intersección; eficacia exploratoria, siendo ésta el tiempo que tarda el animal en explorar por completo el laberinto; y número de *rearings*.

Para estudiar las funciones inmunitarias se obtuvieron los leucocitos peritoneales usando una técnica previamente descrita ⁽⁸⁾. En las células se estudió la capacidad de fagocitosis de los macrófagos, expresando los resultados como índice fagocítico (IF: número de bolas de látex ingeridas por 100 macrófagos) y eficacia fagocítica (EF: porcentaje de macrófagos que han ingerido bolas de látex).

El método utilizado para valorar la actividad antitumoral natural killer (NK) fue el descrito por Ferrández et al ⁽⁹⁾. Se usaron células de linfoma murino (YAC-1) como

células diana y los leucocitos peritoneales como células efectoras. Se utilizó el kit Cytotox 96 TM® (Promega), que mide la actividad lactato deshidrogenasa, indicadora de las células tumorales lisadas, expresándose los resultados como porcentaje de lisis.

La capacidad de proliferación de los linfocitos se valoró siguiendo el método descrito por Del Río et al ⁽¹⁰⁾. Se analizó tanto la proliferación basal como la existente en respuesta a dos mitógenos: Concanavalina A (Con A) y Lipopolisacárido (LPS). Los resultados fueron expresados en cuentas por millón (cpm).

En el análisis estadístico se comprobó la normalidad y la homocedasticidad de los datos utilizando el test *Kolgomorov-Smirnov* y el test de *Levene*, respectivamente. La comparación entre las medias de los valores obtenidos se realizó mediante la prueba “t” de *Student*.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el laberinto en T no muestran diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan en conjunto ThKO y C (datos no mostrados). Sin embargo, al tener en cuenta la proporción de ratones que conviven juntos de uno u otro tipo, los ThKO que conviven con más de un 50% muestran un mayor tiempo ($p < 0,05$) de cruce (Fig.1A) y un menor ($p < 0,01$) número de *rearing*s (Fig.1B) al compararlos con los C que conviven con más de un 50% de C.

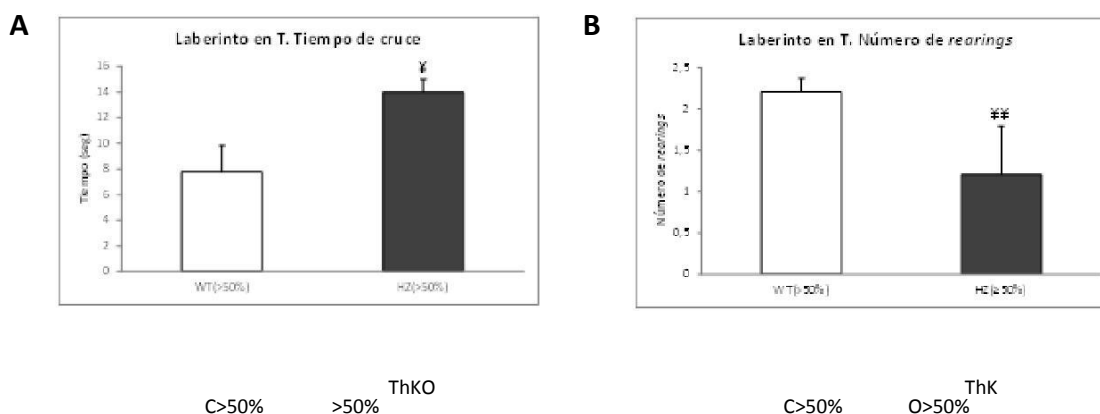


Figura 1. Tiempo de cruce en segundos (A) y número de *rearing*s (B) en C >50% y ThKO >50%. ¥ p-valor $\leq 0,05$; ¥¥ p-valor $\leq 0,01$.

Los porcentajes de lisis de la actividad NK (Fig. 2) no muestran diferencias significativas al comparar en conjunto los ThKO y los C (Fig. 2 A). Sin embargo, los ThKO que conviven con una mayor proporción de ThkO muestran un menor porcentaje de lisis con respecto a los demás grupos (Fig. 2 B).

En la proliferación de los linfocitos, en conjunto (Fig.3A) no se observan diferencias significativas entre ThKO y C, pero los ThKO que conviven con más de un 50% de ThKO (Fig.3B) muestran una menor proliferación tanto basal como en presencia de ambos mitógenos en relación a los otros grupos.

Respecto al índice fagocítico los ThKO, tanto considerados en conjunto (Fig.4A) como por grupos (Fig.4B), muestran un menor índice, siendo esta disminución más marcada en los ThKO que conviven en más de un 50% de ThKO (Fig.4B). El mismo patrón se observa en la eficacia fagocítica (datos no mostrados).

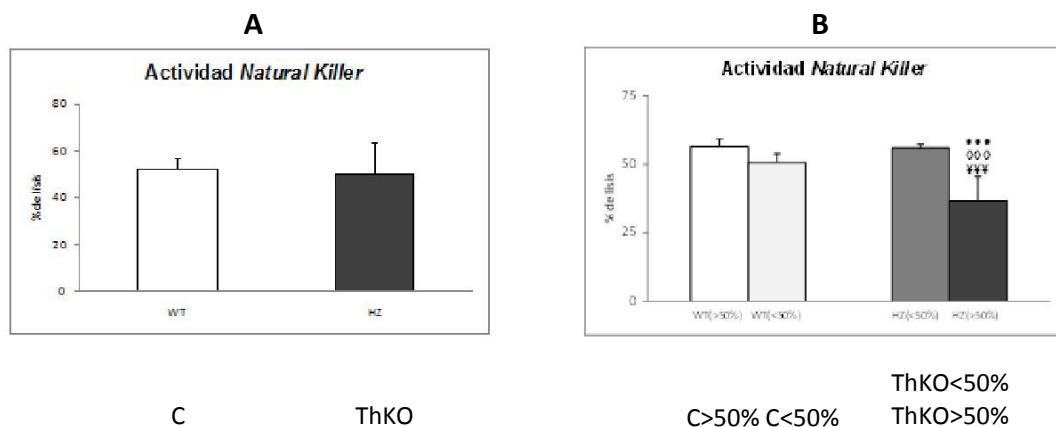


Figura 2. % de lisis en conjunto (A) y en los diferentes grupos (B). ¥ diferencias con respecto a WT>50%; ◊ diferencias con respecto a WT<50%; • diferencias con respecto a ThKO<50%. ¥¥¥ p-valor ≤ 0,001; ◊◊◊ p-valor ≤ 0,001; ••• p-valor ≤ 0,001.

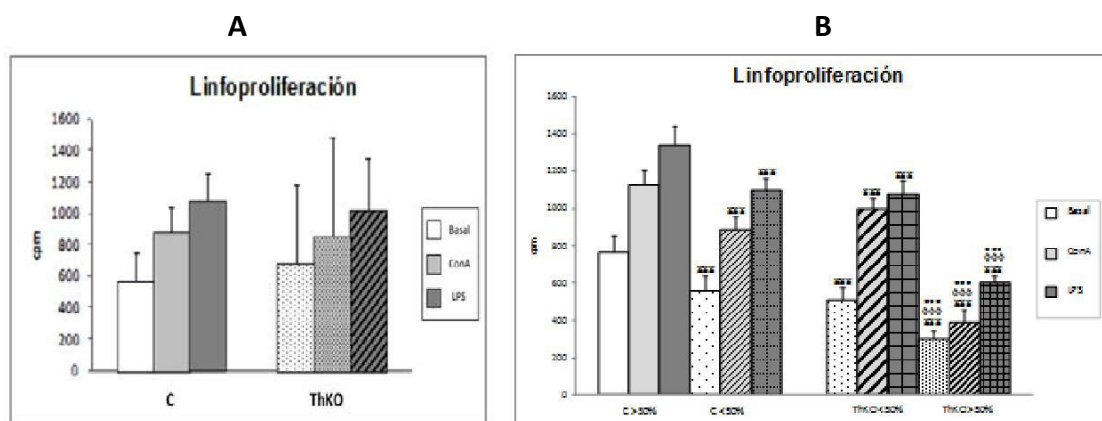


Figura 3. Cpm en conjunto (A) y en los diferentes grupos (B). ¥ diferencias con respecto a WT>50%; ◊ diferencias con respecto a WT<50%; • diferencias con respecto a ThKO<50%. ¥¥¥ p-valor ≤ 0,001; ◊◊◊ p-valor ≤ 0,001; ••• p-valor ≤ 0,001.

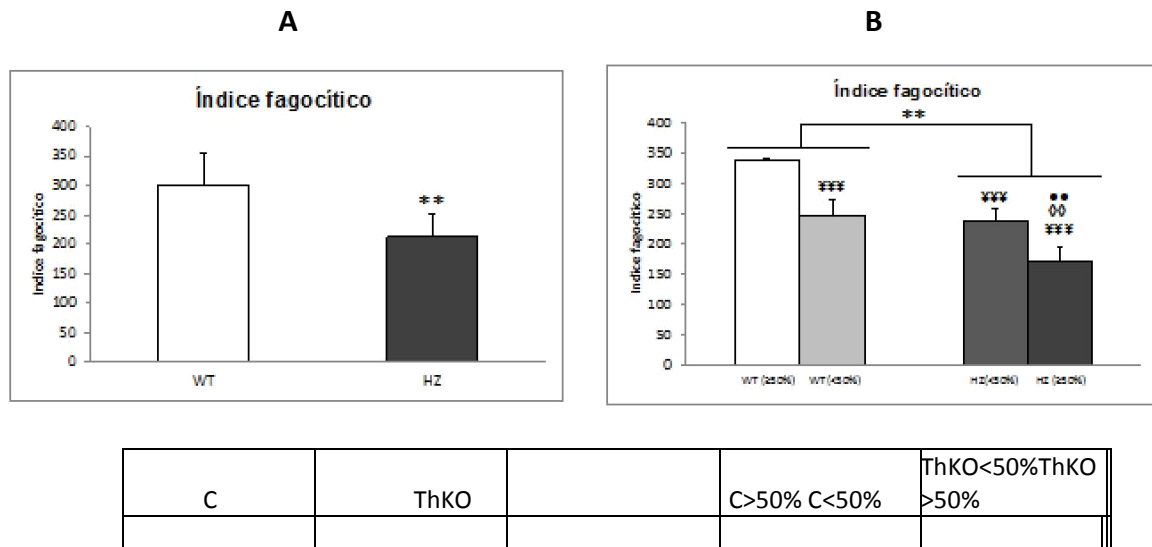


Figura 4. IF en conjunto (A) y en los diferentes grupos (B). ¥ diferencias con respecto a WT>50%; £ diferencias con respecto a WT<50%; • diferencias con respecto a ThKO<50%. ¥¥¥ p-valor ≤ 0,001; £££

p-valor ≤ 0,001; ••• p-valor ≤ 0,001. £ Tendencia, p-valor = 0,054.

DISCUSIÓN

Los ThKO muestran un deterioro conductual que se manifiesta por una peor respuesta al estrés que genera el enfrentarse al laberinto en T, y que se manifiesta en valores de tiempo más altos para cruzar el laberinto. Resultados similares se han obtenido en ratones de esa cepa que están caracterizados como prematuramente envejecidos (PAM: *prematurely ageing mice*)^(1,8). El menor número de *rearings* de los ThKO es indicativo de una menor exploración, lo que se relaciona también con una inadecuada respuesta a situaciones de estrés^(8,11). Los niveles de CAs, que se encuentran involucrados en la capacidad para iniciar las respuestas de lucha o huida, al estar disminuidos en los ThKO, podrían explicar el deterioro conductual de los mismos⁽³⁾.

En los tres parámetros inmunitarios estudiados (actividad NK, linfoproliferación y fagocitosis) los ThKO muestran valores más bajos que los C, siendo el deterioro más marcado en aquellos ThKO que conviven con una mayor proporción de hemizigotos. Parece evidente que los niveles alterados de CAs afectan a las células inmunitarias, las cuales tienen receptores para las mismas^(2,3). Es relevante destacar que el deterioro de los ThKO que conviven con una mayor proporción de C es similar al que muestran los C que conviven con una proporción alta de ThKO. Este hecho permite afirmar que el ambiente social es capaz de modular y superar los efectos en el sistema nervioso e inmunitario debidos a la mutación. Hay estudios que apoyan la incidencia del ambiente social en la comunicación neuroinmunoendocrina^(3,4,5). No obstante, los mecanismos implicados en la misma se desconocen. Bien sean moléculas odoríferas liberadas por los animales⁽⁴⁾ o pautas comportamentales alteradas que son percibidas⁽⁵⁾, el hecho es que las características de los individuos con los que se convive

influyen en gran medida la funcionalidad del sistema nervioso e inmunitario y, consecuentemente, la salud de los sujetos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Paz Viveros M, Ferrández B, Guayerbas N, De la Fuente M. Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *Journal of Neuroimmunology* 2001; 114: 80-88.
2. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The Sympathetic Nerve-An integrative interface between two supersystems: the Brain and the Immune system. *Pharmacological Reviews* 2000; 52 (4): 595-638.
3. Cruces J, Venero C, Pereda-Pérez I, De la Fuente M. The effect of psychological stress and social isolation on neuroimmunoendocrine communication. En vías de publicación.
4. Palermo-Neto J, Alves GJ. Neuroimmune interactions and psychological stress induced by cohabitation with a sick partner: a review. *Current Pharmaceutical Design* 2014: 30.
5. Hashimoto Y, Arai I, Takano N, Tanaka M, Nakaike S. Induction of scratching behavior and dermatitis in various strains of mice cohabiting with NC/Nga mice with chronic dermatitis. *British Journal of Dermatology* 2006; 154 (1): 28-33.
6. Zhou QY, Quaife CJ, Palmiter RD. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* 1995; 374: 640-643.
7. Baeza I, De Castro NM, Giménez-Llort L, De la Fuente M. Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *Journal of Neuroimmunology* 2010; 219: 90-99.
8. Guayerbas N, Catalán M, Víctor VM, Miquel J, De la Fuente M. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behavioural Brain Research* 2002; 134: 41-48.
9. Ferrández MD, Correa R, Del Río M. Effect in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp. Gerontol* 1999; 34: 675-685.
10. Del Río M, Herranz A, De la Fuente M. Bombesin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C. *Peptides* 1994; 15: 15-22.

11. Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. A model os premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14: 157-162.

Recibido: 17 marzo 2014.

Aceptado: 26 abril 2014.