

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA. FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

INFLUENCIA DE LA EDAD Y LA RAZA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE EN EL RATON

GERARDO ALVAREZ DE CIENFUEGOS LÓPEZ, ALFONSO RUIZ-BRAVO
LÓPEZ, CONCEPCIÓN RUIZ RODRÍGUEZ, RAFAEL
JIMÉNEZ TORRES, ALBERTO RAMOS CORMENZANA

RESUMEN

Se estudia la influencia de la edad y la raza en la capacidad de respuesta inmunitaria de ratones de laboratorio. Los parámetros investigados fueron: respuesta de leucocitos peritoneales (número total y porcentaje de fagocitos) al estímulo inflamatorio debido a la inyección intraperitoneal de una bacteria patógena gram negativa (*Yersinia enterocolitica*); y la respuesta de células formadoras de anticuerpos hemolíticos (de la clase IgM) en el bazo y títulos séricos de hemaglutininas totales y resistentes al 2 Mercaptoetanol de ratones inmunizados previamente con hematíes de carnero.

Se observaron claras diferencias de respuesta entre ratones de diferente edad y raza, y se evalúa la influencia de ambos factores en los mecanismos inmunitarios.

SUMMARY

The influence of factors as, age and the strain of the experimental mice on some parameters of the immune response is described. The response of peritoneal leukocytes (Total number and phagocytic ability) to inflammation induced by intraperitoneally injection with a gram negative pathogenic bacterium, *Yersinia enterocolitica*; and both the response of hemolytic antibody (IgM) forming cells in spleen and the hemagglutinin titers in serum of mice immunized previously against sheeps red blood cells were examined.

Differences in the immune response of mice from several ages and strain are observed.

INTRODUCCION

En los animales superiores la defensa inmunitaria descansa en poblaciones de células especializadas que proceden de la médula roja de los huesos largos, y en sistemas bioquímicos, en su mayoría de origen enzimático cuyo principal representante es el Complemento. Los muy diversos mecanismos que forman parte del Sistema Inmune están intercorrelacionados y sometidos a complejas regulaciones que, en última instancia, vienen codificados por el genoma del organismo. Sin embargo, el potencial actual que presenta un organismo determinado y su capacidad defensiva inmunológica depende en gran medida de factores no genéticos que contribuyen a la expresión del fenotipo.

Podemos considerar dos tipos de factores que influyen en la expresión de los mecanismo inmunitarios: factores endógenos, propios del individuo, y factores exógenos. Entre los primeros figura la especie, raza y sexo del individuo, factores todo ellos codificados genéticamente y ligados directamente, en el caso de especie y raza, con la presencia de determinados haplotipos de genes responsables de la inmunidad (1, 2, 3). La influencia del sexo puede ser, por el contrario, indirecta, por medio de influencias hormonales (4). También la edad es un factor endógeno capaz de influir en el estado inmunitario actual de un individuo (5). Ya que nos referimos a individuos normalmente constituidos, no incluimos entre los factores endógenos la presencia de posibles anomalías genéticas con trascendencia inmunológica. Entre los acontecimientos exógenos, cabe citar los posibles contactos con microorganismo (no necesariamente patógenos), poseedores de propiedades inmunomoduladoras, ejerciendo ya sea supresión, ya potenciación sobre algunos mecanismos inmunitarios (6). Otros factores exógenos de gran importancia son: el estado nutricional del individuo (7); factores ambientales tales como iluminación, temperatura, etc. En cada caso, otros factores tales como la vía de administración (9, 10), dosis y otras característica del tratamiento con sustancias inmunológicamente activas (11, 12), son asimismo de gran importancia.

Dado que en nuestro laboratorio estudiamos, desde hace varios años, las propiedades inmunomoduladoras de agentes microbianos, hemos obtenido cierta experiencia que corroborara la variabili-

dad de los resultados en Inmunología experimental en función de algunos de los factores antes citados. En este sentido es fundamental conocer con la mayor exactitud las características y circunscripciones de los animales utilizados en cualquier experiencia. Ante el interés de este tema, en el presente trabajo exponemos y valoramos la influencia que ejercen sobre varios parámetros inmunitarios la raza y la edad de ratones homocigotos machos utilizados en nuestro laboratorio.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se han utilizado grupos homogéneos de ratones machos homocigotos de las razas B1OHTT, C57BL/6 y Balb/c, mantenidos en nuestro laboratorio, procedente del Department of Immunology, London Medical Hospital College, Inglaterra. Los animales fueron mantenidos en iluminación artificial permanente, con temperatura ambiental de 20° C y alimentación y bebida *ab libitum*. En cada experiencia se indica la edad de los ratones utilizados.

BACTERIAS.

Hemos utilizado una cepa de *Yersinia enterocolitica* serotipo 03 correspondiente al número 134 de la Colección del Instituto Pasteur (París).

INFECCIÓN DE LOS ANIMALES

Las bacterias fueron cultivadas en agar tripticosa-soja (TSA) e incubadas a 22° C durante 48 h. Las bacterias se recogieron en solución salina fisiológica estéril, se lavaron tres veces por centrifugación a $400 \times G$ durante 15 minutos y se resuspendieron finalmente a una concentración de 5×10^8 bacterias por ml., de esta suspensión bacteriana inyectamos 0,1 ml. por cada 10 g. de peso corporal a los ratones utilizados en las pruebas de leucocitos peritoneales y fagocitosis.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LEUCOCITOS PERITONEALES

Para este estudio hemos analizado dos parámetros, el número de leucocitos peritoneales y la cuantificación de la fagocitosis de esta población de células. Para ambos casos hemos seguido la técnica descrita por Ruiz-Bravo y col. (13).

ANTÍGENOS

Para las pruebas de inmunidad humoral hemos utilizado como antígenos, glóbulos rojos de carnero (GRC), conservados en solución de Alsever, lavados antes de su empleo con solución salina fisiológica por centrifugación a $400 \times G$ durante 15 minutos y ajustados finalmente a una concentración del 10 por 100.

INMUNIZACIÓN

Los ratones recibieron 0,5 ml. intraperitonealmente de una suspensión de GRC al 10 por 100 cuatro días antes de su sacrificio para la cuantificación de la respuesta de anticuerpos anti-GRC.

CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS ESPLÉNICAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS HEMOLÍTICOS (PFC) ANTI-GRC

Hemos seguido la técnica descrita por Cunninham y Szemberg (14).

HEMAGLUTINACIÓN

Los ratones son anestesiados con uretano y sangrados por punción cardíaca. El suero obtenido por coagulación espontánea se centrifuga a $1.000 \times G$, para eliminar restos celulares y fragmentos del coágulo. El suero centrifugado se divide en parte alícuotas, una de las cuales se somete a tratamiento con 2-Mercapto-etanol (2ME) para eliminar la actividad aglutinante de la IgM, según la técnica descrita por Hudson y Hay (15). Se determinan los títulos de anticuerpos aglutinantes resistentes al 2ME (IgC), mediante la técnica usual de hemaglutinación al límite en placas de microtitulación.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la respuesta de célula peritoneales a la infección de *Y. enterocolitica* ser. 03 se muestra en la tabla I. Como en ella se observa, existe en todos los casos estudiados una respuesta inflamatoria en los animales estudiados, respuesta que es más acentuada cuando se trata de animales jóvenes. Además hay notables

yados, ya que el rendimiento de leucocitos peritoneales fue siempre mayor en la raza B1OHTT, siendo también estos ratones más sensibles a la inducción de la respuesta inflamatoria por *Y. enterocolitica* administrada i.p.

TABLA I

LEUCOCITOS PERITONEALES TOTALES ($\times 10^6$) POR RATON 24 H. DESPUES DE LA INFECCION POR *Y. ENTEROCOLITICA* (a)

Razas	Edad			
	8-12 Semanas		16-18 Meses	
	Testigos	Tratados	Testigos	Tratados
B1OHTT	$6,3 \pm 1,4$ (b)	$24,0 \pm 4,9$	$4,0 \pm 1,3$	$17,7 \pm 3,4$
C57BL/6	$5,5 \pm 1,5$	$19,6 \pm 3,2$	$4,1 \pm 1,8$	$14,4 \pm 2,7$
BALB/C	$3,2 \pm 1,2$	$12,0 \pm 2,9$	$2,7 \pm 0,8$	$10,5 \pm 1,9$

(a) Cada animal recibió una inyección i.p. de 10^8 bacterias por 20 g de peso corporal.

(b) Los resultados representan medias aritméticas, límites de confianza de al menos 6 determinaciones.

En cuanto al valor de los porcentajes de las células que se muestran como fagocitos activos, tabla II, observamos un incremento de los mismos en los ratones viejos, manteniéndose las diferencias citadas entre las distintas razas de los animales examinados.

En la tabla III figuran los resultados de la cuantificación de PFC en los bazos de los ratones inmunizados frente a GRC. En este ensayo, las inmunoglobulinas detectadas son de la clase IgM, observamos que los animales jóvenes responden con un nivel de células productoras del IgM mayor que los animales viejos en todas las razas estudiadas.

TABLA II
 PORCENTAJE DE FAGOCITOS EN CELULAS PERITONEALES
 DE RATONES INFECTADOS CON *Y. ENTEROCOLITICA* (a)

Razas	Edad	
	8-12 Semanas	16-18 Meses
B1OHTT	52	75
C57BL/6	47	68
BALB/C	50	60

(a) Cada ratón recibió una inyección i.p. de 10^8 bacterias por 20 g de peso corporal.

TABLA III
 RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE PFC ANTI-GRC ($\times 10^3$) (a)

Razas	Edad	
	8-12 Semanas	16-18 Meses
B1OHTT	250 ± 80 (b)	104 ± 48
C57BL/6	180 ± 45	80 ± 43
BALB/C	155 ± 50	65 ± 38

(a) Cada animal recibió 5×10^8 GRC i.p. cuatro días antes del sacrificio.

(b) Medias aritméticas \pm límites de confianza de al menos 6 determinaciones.

Con respecto a la tabla IV, podemos apreciar que en los animales viejos gran parte de la respuesta consiste en anticuerpos resistentes al 2ME, cuyos títulos son superiores a los exhibidos por los animales jóvenes.

DISCUSION

Los resultados obtenidos confirman que factores tales como la edad y raza de los animales de experimentación condicionan en gran medida la respuesta inmune.

La influencia del factor edad cuenta con abundante respaldo en la bibliografía. Así, es bien conocido que los ratones neonatos cumplen un periodo de inmadurez inmunológica, en el cual su ca-

TABLA IV
VALORES DE LOS TITULOS HEMAGLUTINANTES DE LOS SUEROS
TOTALES Y TRATADOS CON 2ME

Razas	Días	Edad			
		8-12 Semanas		16-18 Meses	
		Anticuerpos Totales	Anticuerpos resistentes al 2ME	Anticuerpos Totales	Anticuerpos resistentes al 2ME
B1OHTT	2	1.024	1.024	1.024	1.024
	2	64	16	128	64
	3	128	16	512	128
	4	512	64	1.024	512
	5	1.024	512	1.024	1.024
	6	2.048	1.024	4.096	2.048
C57BL/6	2	32	8	128	64
	3	64	16	512	256
	4	256	16	1.024	1.024
	5	512	256	2.048	2.048
	6	1.024	512	2.048	2.048
	BALB/C	2	32	8	64
3		128	8	128	64
4		256	64	512	256
5		1.024	256	2.048	1.024
6		1.024	512	2.048	1.024

pacidad de responder con formación de anticuerpos es incompleta, estando restringida a algunos antígenos timoindependientes (16), y siendo má sensibles a la inducción de tolerancia que durante la edad adulta. Los macrófagos de estos animales inmaduros son funcionalmente maduros, salvo en lo que respecta a su capacidad de presentar antígenos a las células inmunocompetentes (17). Durante el período juvenil desarrolla todo su potencial fenotípico; el final de este periodo viene señalado por la involución del timo, conservándose, sin embargo, durante la edad adulta la capacidad defensiva. Cabe pensar que la progresiva pérdida en potencial de generación de nuevos clones inmunocompetentes se ve compensada por la respuesta anamnésica instauradas durante los primeros contac-

tos con antígenos. Numerosos trabajos han confirmado la progresiva depresión de los mecanismos inmunitarios en animales viejos. Recientemente se ha comprobado que el microambiente intratímico en estos animales es desfavorable para la diferenciación de linfocitos T (18). La capacidad de respuesta a mitógenos es menor en linfocitos de animales viejos (19). También se encuentran deprimidas otras funciones linfocitarias como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) (20); y la producción de anticuerpos, tanto en lo que respecta al número de células formadoras de anticuerpos como los niveles de anticuerpos séricos (21, 22, 23). Asimismo, el número de especificidades antigénicas que pueden ser reconocidas por los clones de linfocitos B disminuye en las edades avanzadas (24). En este contexto, nuestras experiencias indican que las tasas de leucocitos peritoneales constituyen uno de los parámetros más afectados por el envejecimiento de los ratones. Este parámetro es un componente importante de los mecanismos de la inmunidad constitutiva; y su medida es útil en el estudio de agentes inmunomoduladores y coadyuvantes de la inmadurez (13). No obstante, esta disminución en número de los leucocitos peritoneales parece compensada en parte con la mayor eficacia fagocítica de los mismos en respuesta a la inflamación, según se desprende de nuestros resultados. Esta mayor actividad fagocítica puede explicarse en virtud de los repetidos contactos de estos animales con microflora saprofítica, colonizadores habituales de diversos ambientes del organismo, algunos de cuyos componentes pueden ser muy efectivos como agentes inmunomodulares (6). Sin embargo, en lo referente a la respuesta de anticuerpos frente a GRC, la depresión de PFC en los ratones viejos no debe atribuirse a una inmunosupresión debida a la edad, sino al hecho de que la técnica seguida sólo detecta células productoras de IgM. Como demuestran los resultados de la titulación sérica de anticuerpos totales y anticuerpos resistentes al 2ME, los animales viejos responden a la inmunización con GRC con títulos altos de anticuerpos resistentes al 2ME. Cabe pensar que estos animales han desarrollado clones de células B-memoria frente a por lo menos algunos de los determinantes principales antigénicos presentes en los GRC; y como es sabido, los linfocitos B-memoria son células que por haber realizado el cambio de IgM a IgG, han perdido la capacidad de sintetizar IgM (25). Los

memoria deben proceder de reactividades cruzadas entre determinantes de GRC y determinantes de otra índole, muy probablemente de microorganismos con los que tuvieron contactos los animales estudiados, ya que éstos nunca fueron inmunizados deliberadamente antes de ser usados en estas experiencias.

El otro factor estudiado por nosotros es la raza. Como es sabido, diversos factores genéticos que controlar mecanismos inmunitarios están ligados a los genes que codifican los antígenos de histocompatibilidad (3). Las tres razas de ratones usadas en este trabajo constituyen líneas puras; los individuos de cada una de ellas son homocigóticos y genéticamente idénticos entre sí, y difieren de los de otras líneas en sus haplotipos de histocompatibilidad. Por ello es lógico encontrar diferencias entre las tres razas en los parámetros inmunitarios estudiados. En un estudio sobre sensibilidad frente a coadyuvantes de la inmunidad, Florentín y Orbach-Arbouys (26) encuentran asimismo importantes diferencias de comportamiento en ratones de razas diferentes.

Podemos concluir que, dada su influencia sobre los mecanismos inmunitarios, la edad y raza de los ratones usados en experiencias inmunológicas son dos datos a los que debe prestarse atención en la planificación y discusión de los trabajos; asimismo es imprescindible consignarlos claramente en las publicaciones. Parece aconsejable trabajar con ratones de edades comprendidas entre ocho y doce semanas, especialmente cuando se pretenden evaluar respuestas de células formadoras de IgM. Si bien cualquiera de las razas usadas, B1OHTT, C57BL/6 y BALB/C, deben considerarse satisfactorias, la raza B1OHTT parece ser, en nuestras condiciones experimentales, la que ha ofrecido mejores resultados de sensibilidad.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—LESOURD, B.: En *Immunologie*, Ed. Medicales Universitaires. Paris, 1977, p. 39.
- 2.—CALDWELL, J.: En *Manual de Inmunología Clínica*, Ed. El Manual Moderno. México, 1978, p. 138-149.
- 3.—BENACERRAF, B. and E. UNANUE: *Textbook of Immunology*, Ed. Williams and Wilkins Company. Baltimore, 1979, p. 138-149.
- 4.—DE CASTRO, J. E.; P. B. MEDAWAR and D. N. H. HAMILTON: *Immunopotential*, CIBA Foundation Symposium 18, Ed Elsevier Excerpta Medica, Amsterdam, 1973, p. 237-254.

- 5.—GILLIS, S.; R. KOZAK, M. DURANTE, M. E. WEKSLER: *J. Clin. Invest.* 67, 937-942 (1981).
- 6.—SCHWAF, J. H.: *Microbiology-1977*, Ed. D. Schlessinger. Washington D.C. 1977, p. 614.
- 7.—REINERT, D.: *Immunologie*, Ed. Medicales Universitaires. Paris 1977, p. 614.
- 8.—Report de l'Institut de Cancerologie et d'Immunogenetiçue (I.C.I.G.) 1978, p. 31.
- 9.—FLORENTIN, I.; R. HUCHET, M. BRULEY-ROSSET, D. HALLE-PANNEKO, G. MATHE: *Cancer Immunol. Immunother.* 1, 31-39 (1976).
- 10.—MATHE, G.; M. KAMEL, M. DEZFULIAN, D. HALLE-PANNEKO, C. BOURUT: *Cancer Res.* 33, 1987-1997 (1973).
- 11.—WARR, G. W. and V. S. SLJIVIC: *Clin. Exp. Immunol.* 17, 519(532 (1974).
- 12.—BESTHAUX, P.: *Immunologie*, Ed. Medicales Universitaires, Paris, 1977, p. 39.
- 13.—RUIZ-BRAVO, A.; K. KOUWATLI, G. ALVAREZ DE CIENFUEGOS, A. RAMOS-CORMENZANA: *Immunol. Lett.* 3, 39-43 (1981).
- 14.—CUNNINGHAM, A. and A. SZEMBERG: *Immunology*, 14, 599-600 (1968).
- 15.—HUDSON, L. y F. C. HAY: *Immunología Práctica*, Ed. Jims. Barcelona, 1979, p. 137-138.
- 16.—MOSIER, D. E.; I. M. ZITRON, J. J. MOND, W. E. PAUL: *En Developmental Immunobiology*, Ed. Grune and Stration, New York, 1979, p. 25-32.
- 17.—LU, C. Y.; E. M. UNANUE: *Infect. Immun.* 36, 169-175 (1982).
- 18.—OOSTERM, R. and L. KATER: *Clin. Immunol. Immunopathol.* 18, 195-202 (1981).
- 19.—KENNES, B.; C. HUBERT, P. NEVE: *Immunol. Lett.* 2, 231-238 (1981).
- 20.—LIMS, T. S.; N. MESSINA, R. R. WATSON: *Immunology*, 43, 401-407 (1981).
- 21.—BENNER, R. and J. J. HAAIJMAN: *Dev. Comp. Immunol.* 4, 591-603 (1980).
- 22.—PAHWA, S. W.; R. N. PAHWA, R. R. Good: *J. Clin. Invest.* 67, 1094-1102 (1981).
- 23.—KLINMAN, M.: *J. Exp. Med.* 154, 647-551 (1981).
- 24.—FONG, S.; J. L. PASQUALI, C. D. TSOUKAS: *Clin. Immunol. Immunopathol.* 18, 344-350 (1981).
- 25.—VITETTA, E. S.; J. C. CAMBIER, E. S. LIGLER, R. KETTMAN, S. SCROBER, I. ZAN-BAR, J. W. UHR: *En Developmental Immunobiology*, Ed. Grune and Stration, New York, 1979, p. 109-129.
- 26.—FLORENTIN, I.; S. ORBACH-ARBOUYS: *Ann. Immunol (Inst. Pasteur)* 128 C, 271-272 (1977).