



ORIGINAL/Sección Biológica

## Inmunosenescencia prematura en ratones triple-transgénicos para la enfermedad del Alzheimer

Ianire Mate<sup>a</sup>, Julia Cruces<sup>a</sup>, Carmen Vida<sup>a</sup>, Coral Sanfeliu<sup>b</sup>, Rashed Manassra<sup>a</sup>, Lydia Giménez-Llort<sup>c</sup> y Mónica De la Fuente<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, España

<sup>c</sup> Instituto de Neurociencia, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 14 de enero de 2013

Aceptado el 26 de abril de 2013

On-line el 7 de diciembre de 2013

#### Palabras clave:

Alzheimer

Ratones triple-transgénicos para la enfermedad de Alzheimer

Inmunosenescencia

Leucocitos esplénicos

### R E S U M E N

**Introducción:** En la enfermedad del Alzheimer (EA) se ha comprobado que existe un deterioro en la comunicación neuroinmunoendocrina. Sin embargo, apenas hay estudios a un nivel periférico en esta enfermedad neurodegenerativa, en concreto en lo que respecta a la función inmunitaria. Dado que recientemente se ha establecido que ciertos parámetros de función inmunitaria son marcadores de la velocidad de envejecimiento y pueden predecir la longevidad, el propósito del presente trabajo fue valorar algunas de esas funciones en leucocitos esplénicos de ratones transgénicos para la EA de diversas edades.

**Material y métodos:** Se emplearon ratones triple-transgénicos para la EA (3 xTgAD) hembras, así como sus controles no transgénicos (NTg) jóvenes ( $4 \pm 1$  meses), adultos ( $9 \pm 1$  meses) y maduros ( $12 \pm 1$  meses). Se valoraron la quimiotaxis, la actividad citotóxica de las «natural killer» (NK) y la respuesta linfoproliferativa en presencia de los mitógenos concanavalina A y lipopolisacárido en leucocitos esplénicos, funciones que disminuyen al envejecer. Además, se realizó una curva de supervivencia en otro grupo de animales 3 xTgAD y NTg.

**Resultados:** En los 3 xTgAD, con respecto a los NTg, la quimiotaxis se encuentra disminuida en todas las edades, mientras que dicha disminución se observa a los 4 y 9 meses en la linfoproliferación y solo en los jóvenes en el caso de la actividad NK. Los 3 xTgAD mostraron una menor supervivencia que los NTg.

**Conclusiones:** Los ratones 3 xTgAD presentan una inmunosenescencia prematura, lo que podría explicar su temprana mortalidad. La valoración a nivel periférico de las funciones inmunológicas estudiadas podría ser un indicador del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

© 2013 SEGG. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Premature immunosenescence in triple-transgenic mice for Alzheimer's disease

### A B S T R A C T

**Introduction:** A deterioration of the neuroimmunoendocrine network has been observed in Alzheimer's disease (AD). However, the peripheral immune response has hardly been investigated in this pathology. Since some immune function parameters have been established as good markers of the rate of ageing, and can predict longevity, the aim of the present work was to study some of these functions in splenic leucocytes in transgenic mice for AD of different ages.

**Material and methods:** Young female ( $4 \pm 1$  months), adult ( $9 \pm 1$  months), and mature ( $12 \pm 1$  months) triple-transgenic mice for AD (3 xTgAD) and non-transgenic (NTg) control mice of the same ages were used. The chemotaxis, the anti-tumour activity of «natural killer» (NK) cells and the lymphoproliferative response in the presence of the mitogens concanavalin A and lipopolysaccharide, functions that decrease with age, were determined in splenic leucocytes. In addition, the differences in lifespan between 3 xTgAD and NTg were studied in parallel using other animals, until their death through natural causes.

**Results:** In 3 xTgAD, with respect to NTg, chemotaxis decreased at all ages studied, whereas in lymphoproliferative response this reduction was shown at 4 months and 9 months. NK activity was diminished only in young 3 xTgAD with respect to NTg. The 3 xTgAD showed a shorter lifespan than the NTg control group.

#### Keywords:

Alzheimer

Triple-transgenic mice for Alzheimer's disease

Immunosenescence

Splenic leucocytes

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [mondela@bio.ucm.es](mailto:mondela@bio.ucm.es) (M. De la Fuente).

**Conclusions:** The 3xTgAD mice show a premature immunosenescence, which could explain their early mortality. The determination of these immune functions at peripheral level could serve as a marker of the progression of the Alzheimer's disease.

© 2013 SEGG. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

La enfermedad del Alzheimer (EA), una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes asociadas al envejecimiento, es un trastorno progresivo y dependiente de la edad, por lo que su prevalencia en los últimos años está aumentando dramáticamente en paralelo con el aumento de la esperanza de vida y el envejecimiento de la población. Actualmente, más de 26 millones de personas en todo el mundo presentan EA y se calcula que este número se cuadruplicará para el año 2050<sup>1</sup>, a menos que se encuentre un tratamiento o una cura efectiva.

Durante las últimas 2 décadas ha supuesto un gran reto reproducir la enfermedad neuronal y la sintomatología comportamental de la EA en modelos animales<sup>2</sup>. Los avances en técnicas genéticas y en la identificación de los genes implicados en el Alzheimer familiar han hecho posible el desarrollo de una serie de modelos transgénicos<sup>3</sup>, sobre todo en ratones, con el objetivo de reproducir en ellos una o 2 características neuropatológicas principales de la EA: las placas betaamiloideas (A $\beta$ ) y los ovillos neurofibrilares. Así, el modelo murino triple transgénico para la EA (3xTgAD), que alberga los transgenes APP<sub>Swe</sub> y tau<sub>P301L</sub> en un mutante knock-in para PS1<sub>M146V</sub>, representa el primer y único modelo que mimetiza ambas manifestaciones neuropatológicas del cerebro humano con la EA<sup>4,5</sup>. En este modelo de ratones 3xTgAD, dichas manifestaciones aparecen y se establecen de manera dependiente a la edad: a los 2,5 meses comenzaría la alteración de la homeostasis neuronal; la inmunorreactividad frente a las placas A $\beta$  intracelulares se aprecian a los 3-4 meses y a los 6 meses se encuentran ya los primeros depósitos extracelulares; la alteración de la proteína tau comenzaría a los 12 meses, edad en la que la afeción A $\beta$  está bien instaurada; y finalmente a los 15 meses se observan los ovillos neurofibrilares<sup>2,4</sup>. Además, en este modelo se desarrolla, también de manera dependiente de la edad, una serie de características típicas de la EA, como la gliosis reactiva, la disfunción sináptica y el déficit en el sistema colinérgico, en el aprendizaje y la memoria, así como alteraciones del comportamiento asociadas a demencia<sup>4,6-9</sup>.

En la EA, al igual que ocurre con el envejecimiento, se ha comprobado que existe un deterioro en los sistemas fisiológicos reguladores, el nervioso y el inmunitario, y en la comunicación que existe entre ambos, la cual resulta necesaria para una adecuada homeostasis del organismo<sup>10,11</sup>. En esta afeción, así como en las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, son numerosos los estudios que abordan el papel del sistema inmunitario en el sistema nervioso central (SNC)<sup>12,13</sup>, donde se observa un aumento de mediadores inflamatorios y de oxidación asociados a la presencia de las placas A $\beta$  y los ovillos neurofibrilares<sup>14,15</sup>, así como una sobreactivación de la inmunidad innata frente a ellos<sup>16,17</sup>. Este hecho facilita la lisis neuronal<sup>18</sup> y el consecuente empeoramiento de la afeción<sup>13,16,19</sup>. No obstante, hay que tener en cuenta que la estrecha comunicación existente entre el sistema nervioso y el inmunitario se establece tanto a nivel del SNC como periférico<sup>20,21</sup>, pero muy pocos estudios se han llevado a cabo en esta enfermedad a nivel periférico.

Dado que en los últimos años se ha demostrado que ciertos parámetros de función inmunitaria pueden ser marcadores de la velocidad de envejecimiento de cada sujeto y predecir la longevidad de los mismos<sup>22-28</sup>, se llevó a cabo un estudio preliminar de esos parámetros inmunitarios a nivel periférico, en concreto en el bazo, en ratones triple-transgénicos para la EA de 15 meses,

es decir, cuando la enfermedad está bien instaurada<sup>29</sup>. Las alteraciones encontradas en dichos parámetros indican la necesidad de profundizar en estos estudios a nivel periférico para encontrar y acreditar marcadores que puedan reflejar la progresión de la enfermedad. Por todo ello, el propósito del presente trabajo fue valorar algunas de esas funciones inmunológicas en leucocitos esplénicos de ratones transgénicos para la EA (3xTgAD) en diversas edades desde la edad adulta hasta la madurez, es decir, desde la aparición hasta el desarrollo de la EA.

## Material y métodos

### Animales de experimentación

Se emplearon ratones (129/C57BL6) triple-transgénicos para la EA (3xTgAD) hembras, así como sus controles no transgénicos (NTg) de las siguientes edades: jóvenes ( $4 \pm 1$  meses;  $n = 10$ ), adultos ( $9 \pm 1$  meses;  $n = 8$ ) y maduros ( $12 \pm 1$  meses;  $n = 10$ ). Además, se utilizaron otros 2 grupos de ratones, 3xTgAD ( $n = 10$ ) y NTg ( $n = 12$ ), para analizar la supervivencia de los animales y, por tanto, su longevidad, y los cuales fueron mantenidos en condiciones estándar de alimentación, con comida y agua *ad libitum*, a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C y fotoperiodo invertido. Todos los ratones fueron manipulados según las directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609/EEC) y de la Comisión Ética de la Universidad Autónoma de Barcelona (CEEAH/00759).

### Separación de leucocitos esplénicos

Tras la obtención de los bazos de manera aséptica, se homogeneizaron en un tampón fosfato salino (PBS) estéril y se centrifugaron en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.), con una densidad de 1,070 g/ml. El halo de leucocitos mononucleares, principalmente linfocitos, fue extraído con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril y lavado con PBS. Posteriormente, se determinó el número de linfocitos presentes en cada muestra y se ajustaron a  $10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 enriquecido con L-glutamina (PAA, Piscataway, EE. UU.) para el análisis de la capacidad de quimiotaxis y de la actividad de las células NK, y en medio completo -RPMI 1640 enriquecido con L-glutamina y suplementado con suero fetal bovino (10%, Gibco, Burlington, Canadá) y gentamicina (10 mg/ml, Gibco) - para el estudio de la proliferación. Previamente a cada experimento, se comprobó la viabilidad celular mediante el test de exclusión del azul-tripán (Sigma-Aldrich), siendo en todos los casos mayor del 98%. Todas las incubaciones se realizaron a 37 °C en humedad saturante con CO<sub>2</sub> al 5%.

### Quimiotaxis

La capacidad de movilidad inducida (quimiotaxis) de los leucocitos esplénicos se evaluó utilizando la técnica desarrollada por Boyden<sup>30</sup>, con algunas modificaciones<sup>31</sup>. Se analizó la capacidad de estas células en un gradiente químico generado por un péptido formilado, sustancia quimioatrayente (formyl-Met-Leu-Phe,  $10^{-8}$  M, Sigma-Aldrich), para desplazarse atravesando un filtro de nitrocelulosa de 3  $\mu$ m de diámetro de poro (Millipore Ibérica, Madrid, España). Se contabilizaron al microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100 $\times$ ) el número de leucocitos observados en 4 barridos

de 5 mm cada uno. El valor obtenido de dicho recuento se denomina índice de quimiotaxis.

#### Actividad citotóxica «natural killer»

La valoración de la actividad NK de los leucocitos esplénicos se basa en la capacidad de estos para destruir *in vitro* y de forma espontánea células tumorales; concretamente, se utilizaron como células diana las células YAC-1, procedentes de un linfoma murino. Para determinar la actividad NK de los leucocitos, se utilizó un kit comercial colorimétrico (Cytotox 96, Promega, Madison, EE. UU.), que detecta y valora la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa liberada al sobrenadante por las células diana lisadas. El ensayo se realizó por triplicado, siguiendo la metodología descrita previamente<sup>32</sup>. Los resultados se expresan como porcentaje de lisis.

#### Capacidad de proliferación de los linfocitos esplénicos

La capacidad de proliferación se valoró mediante el test de transformación linfoblástica en respuesta a mitógenos, concanavalina A (ConA; Sigma-Aldrich) y lipopolisacárido (LPS; Sigma-Aldrich), siguiendo un protocolo estandarizado con anterioridad<sup>33</sup>. Este ensayo analiza *in vitro* la respuesta proliferativa frente a mitógenos que reproduce la que tiene lugar *in vivo* frente a antígenos. Su fundamento reside en la capacidad de los linfocitos maduros de transformarse, en condiciones adecuadas, en células con capacidad de división o linfoblastos. Estos sintetizan ADN, por lo que, añadiendo un precursor de la síntesis marcado (<sup>3</sup>H-timidina, Leti, Barcelona, España), el crecimiento puede cuantificarse en un contador β de centelleo líquido (LKB, Uppsala, Suecia), del que se obtuvieron las cuentas por minuto (cpm) de cada muestra. Cada ensayo se realizó por triplicado, expresándose los resultados como la media aritmética de cpm en cada triplicado.

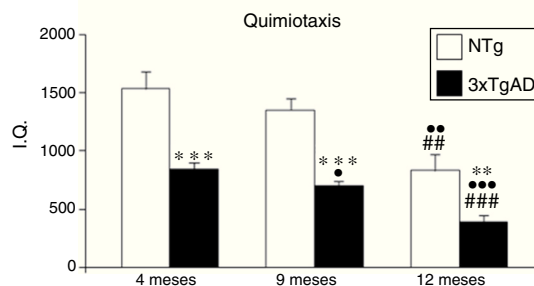
#### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 15.0. Los resultados se expresan como la media aritmética ± error medio estándar de los datos obtenidos en cada una de las diferentes mediciones realizadas por duplicado o triplicado. Para el análisis de los resultados se procedió a la determinación de la normalidad y la homocedasticidad de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene, respectivamente. Todos los grupos experimentales se ajustaron a una distribución normal, por lo que se realizó la prueba de la t de Student. Se estableció un valor de  $p < 0,05$  para considerar significativas las diferencias obtenidas. Para el estudio de la longevidad de los animales, se empleó el test de Kaplan-Meier, usando el mismo nivel de significación ( $p < 0,05$ ).

#### Resultados

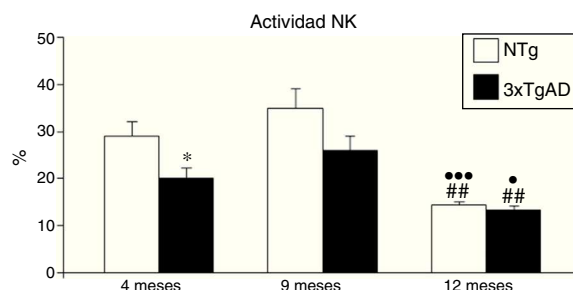
Los resultados correspondientes a los índices de quimiotaxis (fig. 1) muestran en los controles NTg una disminución de esta función a los 12 meses ( $p < 0,01$ ) en relación con los jóvenes de 4 meses y a los adultos de 9 meses. Sin embargo, en los 3 xTgAD esa disminución se observa a los 9 meses ( $p < 0,05$ ) y a los 12 meses ( $p < 0,001$ ) respecto a los de 4 meses. Comparando los valores obtenidos en los ratones transgénicos respecto a los NTg, los primeros presentan unos índices de quimiotaxis menores en todas las edades ( $p < 0,001$  en jóvenes y adultos;  $p < 0,01$  en maduros).

En cuanto a la actividad citotóxica NK (fig. 2), los controles NTg manifiestan una disminución de dicha actividad desde los 9 a los 12 meses ( $p < 0,01$ ), hecho que también ocurre en los 3 xTgAD. A los 4 meses, los 3 xTgAD ya presentan una actividad significativamente menor que los NTg ( $p < 0,05$ ), la cual desaparece en las otras edades.



**Figura 1.** Índice de quimiotaxis (IQ) de leucocitos esplénicos a los 4 (jóvenes), 9 (adultos) y 12 meses (maduros) en ratones triple transgénicos para la EA (3 xTgAD) y su respectivo control no transgénico (NTg). Cada columna representa la media ± EMS de los valores analizados en duplicado (n = 10, jóvenes y maduros; n = 8, adultos).

\*\*\*  $p < 0,001$  con respecto a los correspondientes valores en NTg.  
 \*\*  $p < 0,01$  con respecto a los correspondientes valores en NTg.  
 ●  $p < 0,05$  con respecto a los correspondientes valores en 4 meses.  
 ●●  $p < 0,01$  con respecto a los correspondientes valores en 4 meses.  
 ●●●  $p < 0,001$  con respecto a los correspondientes valores en 4 meses.  
 ##  $p < 0,01$  con respecto a los correspondientes valores en 9 meses.  
 ###  $p < 0,001$  con respecto a los correspondientes valores en 9 meses.



**Figura 2.** Actividad *natural killer* (NK) expresada en porcentaje de lisis de leucocitos esplénicos a los 4 (jóvenes), 9 (adultos) y 12 meses (maduros) en ratones triple transgénicos para la EA (3 xTgAD) y su respectivo control no transgénico (NTg). Cada columna representa la media ± EMS de los valores analizados en triplicado (n = 10, jóvenes y maduros; n = 8, adultos).

\*  $p < 0,05$  con respecto a los correspondientes valores en NTg.  
 ●  $p < 0,05$  con respecto a los correspondientes valores en 4 meses.  
 ●●  $p < 0,01$  con respecto a los correspondientes valores en 4 meses.  
 ●●●  $p < 0,001$  con respecto a los correspondientes valores en 4 meses.  
 ##  $p < 0,01$  con respecto a los correspondientes valores en 9 meses.

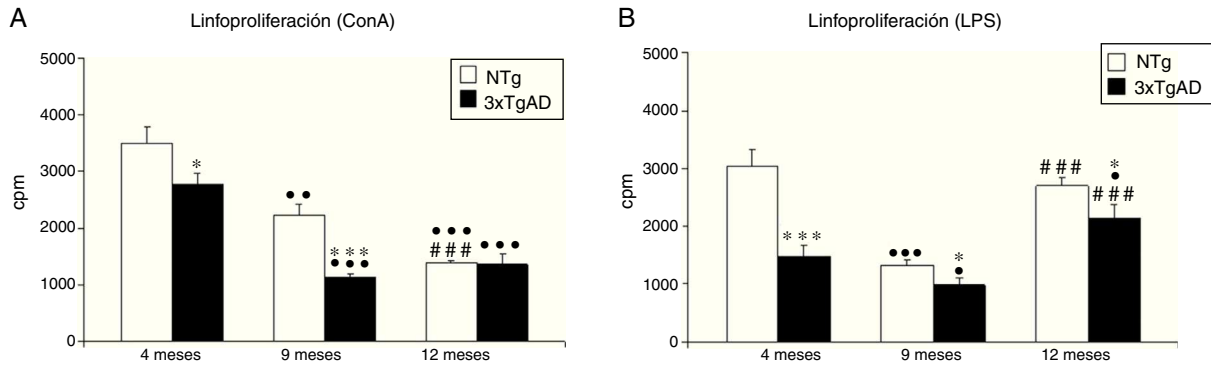
La respuesta linfoproliferativa en respuesta al mitógeno ConA (fig. 3A), específica de los linfocitos T, disminuye con la edad en los controles NTg ( $p < 0,01$ : 9 meses vs. 4 meses;  $p < 0,001$ : 12 meses vs. 9 meses). En los 3 xTgAD, esa disminución se aprecia a los 9 meses ( $p < 0,001$ ) con respecto a los 4 meses, y se mantiene a los 12 meses. Si comparamos los 3 xTgAD con los controles, la proliferación es menor en los 3 xTgAD a 4 ( $p < 0,05$ ) y 9 meses ( $p < 0,001$ ), mientras que a los 12 meses no se observan diferencias.

En lo que respecta a la respuesta linfoproliferativa frente al LPS (fig. 3B), mitógeno específico de los linfocitos B, los controles muestran una disminución de los 4 a los 9 meses ( $p < 0,001$ ), aunque se observa un aumento a los 12 meses. Los 3 xTgAD presentan una evolución similar, pero comparándolos con los controles siempre muestran valores menores ( $p < 0,001$  en 4 meses;  $p < 0,05$  en 9 y 12 meses).

Como se observa en la figura 4, los ratones 3 xTgAD vivieron significativamente menos ( $p < 0,001$ ) que los NTg.

#### Discusión

El presente trabajo muestra cómo en los ratones 3 xTgAD aparece un declive temprano de algunas funciones inmunológicas durante el desarrollo de la enfermedad. Esta inmunosenescencia prematura podría reflejar el deterioro temprano de la



**Figura 3.** Respuesta linfoproliferativa (cuentas por minuto, cpm) en respuesta a concanavalina A (ConA; A) y lipopolisacárido (LPS; B) de leucocitos esplénicos a los 4 (jóvenes), 9 (adultos) y 12 meses (maduros) en ratones triple-transgénicos para la EA (3xTgAD) y su respectivo control no transgénico (NTg). Cada columna representa la media ± EMS de los valores analizados en triplicado (n = 10, jóvenes y maduros; n = 8, adultos).

\*p < 0,05 con respecto a los correspondientes valores en NTg.  
 \*\*\*p < 0,001 con respecto a los correspondientes valores en NTg.  
 ● p < 0,05 con respecto a los correspondientes valores en 4 meses.  
 ●● p < 0,01 con respecto a los correspondientes valores en 4 meses.  
 ●●● p < 0,001 con respecto a los correspondientes valores en 4 meses.  
 ###p < 0,001 con respecto a los correspondientes valores en 9 meses.

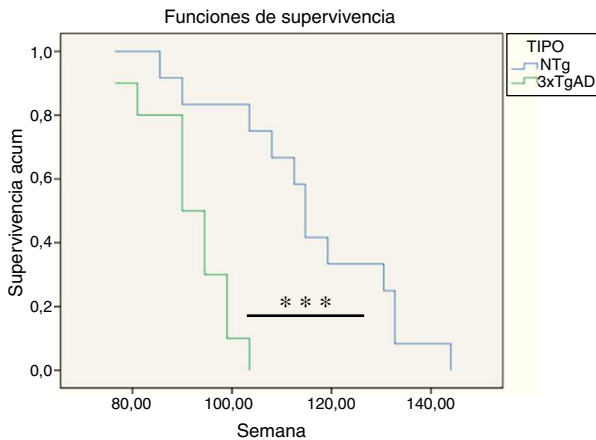
comunicación neuroinmunológica en los 3xTgAD y ser causa importante de su menor supervivencia.

Las 2 funciones estudiadas que forman parte de la respuesta inmunitaria innata, como lo son la capacidad de movilidad de las células inmunitarias hacia un foco infeccioso (quimiotaxis) y la actividad citotóxica antitumoral de las células NK, disminuyen progresivamente con el envejecimiento, como ha sido comprobado en toda una serie de estudios. Esta menor capacidad funcional al envejecer se ha observado en leucocitos de diversas localizaciones, como el bazo, el timo, los nódulos axilares y el peritoneo de distintas cepas de ratón<sup>26,34</sup> y en rata<sup>35</sup>, así como en leucocitos de sangre periférica humana<sup>22,36</sup>. En la cepa de ratones empleada en este estudio, 129/C57BL6, la cual no había sido previamente estudiada en este sentido, las 2 funciones que se están considerando también disminuyen al avanzar la edad de los animales NTg. Sin embargo, cuando comparamos los ratones 3xTgAD con los controles NTg, los primeros muestran una disminución de la quimiotaxis ya en la edad joven (4 meses), diferencia que se mantiene a lo largo de las otras edades estudiadas. Aunque los datos previamente publicados por nuestro grupo muestran un aumento de la quimiotaxis en los 3xTgAD a los 15 meses<sup>29</sup>, esto podría deberse a un mecanismo fisiológico de compensación frente a la completa instauración de la afección de la proteína tau (que comienza a los 12 meses), que a los 15 se encuentra totalmente instaurada en estos animales transgénicos. Por otro

lado, los ratones 3xTgAD muestran una disminución temprana de la actividad citotóxica de las células NK a los 4 meses, tendencia que se mantiene a los 9 meses; mientras que a los 12 meses tanto los controles NTg como los 3xTgAD poseen unos niveles similares de actividad NK, siendo muy bajo en ambos, posiblemente debido al envejecimiento fisiológico *per se* que ya se manifiesta en los controles NTg a esa edad.

En cuanto a las alteraciones que aparecen con el envejecimiento en la inmunidad adquirida, los linfocitos T han sido los más ampliamente estudiados y se consideran los más afectados en la inmunosenescencia<sup>37,38</sup>. Está demostrado que la respuesta proliferativa de estos linfocitos procedentes de sangre periférica<sup>36</sup>, así como de diversos órganos de roedores<sup>25,26,35,39</sup>, disminuye con la edad. El presente trabajo muestra que en los ratones controles NTg se cumple este hecho en la respuesta linfoproliferativa al estímulo con ConA. En los ratones 3xTgAD aparece, no obstante, una disminución acelerada de esta respuesta proliferativa, con unos niveles mínimos ya a los 9 meses. A su vez, la respuesta proliferativa de los linfocitos B, medida mediante la utilización del mitógeno LPS, y que se ha observado disminuye con la edad, tanto en humanos<sup>40</sup> como en ratones<sup>26,41</sup>, aparece también disminuida en los animales de nuestro estudio, pero dicha disminución se revierte a los 12 meses, tanto en los ratones controles NTg como en los 3xTgAD. Sin embargo, cabe destacar que en todas las edades estudiadas, los ratones 3xTgAD muestran una menor respuesta linfoproliferativa al LPS en relación con los controles NTg.

Todos estos resultados sobre los cambios con la edad en las funciones inmunitarias estudiadas demuestran que los ratones 3xTgAD se encuentran más envejecidos que sus respectivos controles NTg de igual edad cronológica. Además, el estudio de la supervivencia indica que los ratones 3xTgAD viven significativamente menos que sus respectivos controles NTg. Este hecho vuelve a confirmar que un deterioro temprano en la funcionalidad de las células inmunológicas se relaciona con una menor longevidad<sup>22,25</sup>. En este aspecto, autores como de la Rosa et al.<sup>42</sup> han comprobado que niveles bajos de la actividad citotóxica de las células NK en el anciano son un buen predictor de mortalidad. También estudios longitudinales en personas mayores han demostrado que una baja respuesta linfoproliferativa en respuesta a antígenos o mitógenos se correlaciona con una menor supervivencia<sup>43</sup>, hecho que se ha comprobado en ratones<sup>22</sup>. Por el contrario, individuos que llegan a edades avanzadas en buenas condiciones de salud son aquellos que han podido mantener sus células inmunitarias con una



**Figura 4.** Curvas de supervivencia de los ratones triple-transgénicos para la EA (3xTgAD) y su respectivo control no transgénico (NTg).  
 \*\*\*p < 0,001 con respecto al valor en los controles NTg.

capacidad funcional semejante a la de los adultos<sup>23,26,41</sup>. Todo ello hace destacar que el sistema inmunológico es un buen indicador de morbimortalidad, por lo que su valoración a nivel periférico podría servir como marcador de velocidad de envejecimiento, esto es, de edad biológica de cada individuo<sup>22,24</sup>.

Además, estas alteraciones inmunológicas podrían estar mostrando el deterioro temprano de la comunicación entre el sistema nervioso y el inmunitario<sup>20,44</sup>. Así, la valoración de la función inmunitaria podría servir como marcador periférico de la progresión de una enfermedad originada en el SNC como lo es la EA. Es esta una sugerencia importante en la EA, con escasos marcadores diagnósticos periféricos, siendo este un campo científico de enorme interés para futuras investigaciones.

## Financiación

Este estudio ha sido financiado por subvenciones BFU2011-30336 del Ministerio español de Ciencia e Innovación; 910379ENEROINN del Grupo de Investigación de la UCM; RD06/0013/1004; RD06/0013/1004; RD12/0043/0018 (RETI-CEF) del ISCIII-FEDER de la Unión Europea. El trabajo también fue apoyado por una beca de formación de personal investigador del Gobierno Vasco concedida a Ianire Mate Otaño (BFI09-52).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Este trabajo ha recibido el premio «Pañella Casas» 2012 a la mejor comunicación en forma oral del Área Biológica presentada durante el 54.º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Geriatria y Gerontología, celebrado en Santiago de Compostela, del 6 al 8 de junio del 2012.

## Bibliografía

- Götz J, Eckert A, Matamalas M, Ittner LM, Liu X. Models of A $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:3359–75.
- Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Johansson B, Oddo S, Tobeña A, et al. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007;31:125–47.
- Morrisette DA, Parachikova A, Green KN, LaFerla FM. Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2009;284:6033–7.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39:409–21.
- Mastrangelo MA, Bowers WJ. Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease related pathologies in male triple-transgenic mice. *BCM Neurosci*. 2008;9:81.
- Carter CJ. Alzheimer's disease plaques and tangles: Cemeteries of a pyrrhic victory of the immune defense network against herpes simplex infection at the exposure of complement and inflammation-mediated neuronal destruction. *Neurochem Int*. 2011;58:301–20.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangles formation in a triple model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24:1063–70.
- Oddo S, Caccamo A, Green KN, Liang K, Tran L, Chen Y, et al. Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:3046–51.
- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2005;25:8843–53.
- Gemma C. Neuroimmunomodulation and aging. *Aging Dis*. 2010;1:169–72.
- Pizza V, Agresta A, D'Acunto CW, Festa M, Capasso A. Neuroinflamm-aging and neurodegenerative diseases: An overview. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011;10:621–34.
- Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJ, van Gool WA, Hoozemans JJ. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2006;113:1685–95.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21:383–421.
- Matsuoka Y, Picciano M, Malester B, LaFrancois J, Zehr C, Daeschner JM, et al. Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2001;158:1345–54.
- Blurton-Jones M, LaFerla FM. Pathways by which A $\beta$  facilitates tau pathology. *Curr Alzheimer Res*. 2006;3:437–48.
- Maccioni RB, Rojo LE, Fernández JA, Kuljis RO. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1153:240–6.
- Eikelenboom P, Veerhuis R, van Exel E, Hoozemans JJ, Rozemuller AJ, van Gool WA. The early involvement of the innate immunity in the pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease: neuropathological, epidemiological and genetic evidence. *Curr Alzheimer Res*. 2011;8:142–50.
- Veerhuis R, Nielsen HM, Tenner AJ. Complement in the brain. *Mol Immunol*. 2011;48:1592–603.
- Solito E, Sastre M. Microglia function in Alzheimer's disease. *Front Pharmacol*. 2012;3:14.
- Besedovsky HO, del Rey A. Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem Res*. 2011;36:1–6.
- Besedovsky HO, Rey AD. Physiology of psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun*. 2007;21:34–44.
- De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: The involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des*. 2009;15:3003–26.
- Alonso-Fernández P, De la Fuente M. Role of the immune system in aging and longevity. *Curr Aging Sci*. 2011;4:78–100.
- Wayne SJ, Rhyme RL, Garry PJ, Goodwin JS. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol*. 1990;45:M45–8.
- Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol*. 2002;37:249–56.
- Arranz L, Caamaño JH, Lord JM, De la Fuente M. Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor-kappa  $\beta$ . *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010;65:941–50.
- Alonso-Fernández P, Puerto M, Mate I, Ribera JM, De la Fuente M. Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J Am Geriatr Soc*. 2008;56:2244–51.
- De la Fuente M, Cruces J, Hernández O, Ortega E. Strategies to improve the functions and redox state of the immune system in aged subjects. *Curr Pharm Dis*. 2011;17:3966–93.
- Giménez-Llort L, Arranz L, Mate I, De la Fuente M. Gender-specific neuroimmunoenocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. *Neuroimmunol*. 2008;15:331–43.
- Boyden SV. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*. 1962;115:453–6.
- De la Fuente M, Carrasco M, Hernanz A. Modulation of human neutrophil function in vitro by gastrin. *J Endocrinol*. 1997;153:475–83.
- Ferrández MD, Correa R, Del Río M, De la Fuente M. Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol*. 1999;34:675–85.
- Del Río M, Hernanz 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.
- De la Fuente M, Miquel J, Catalán MP, Víctor VM, Guayerbas N. The amount of thiolic antioxidant ingestion hended to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Radic Res*. 2002;36:119–26.
- De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, et al. Changes with ageing in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology*. 2004;5:389–400.
- Arranz L, Fernández C, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic Biol Med*. 2008;45:1252–62.
- Miller RA. The aging immune system: Primer and prospectus. *Science*. 1996;273:70–4.
- Pawełec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, et al. T-cells and aging. *Front Biosci*. 2002;7:d1056–183.
- Medina S, Del Río M, Hernanz A, De la Fuente M. Age-related changes in the neuropeptide Y effects on murine lymphoproliferation and interleukin-2 production. *Peptides*. 2000;21:1403–9.
- Frasca D, Nguyen D, Riley RL, Blomberg BB. Effects of ageing on proliferation and E47 transcription factor activity induced by different stimuli in murine splenic B cells. *Mech Ageing Dev*. 2003;124:361–9.
- Puerto M, Guayerbas N, Álvarez P, De la Fuente M. Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leukocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol*. 2005;165:33–40.
- De la Rosa O, Pawełec G, Peralbo E, Wikby A, Mariani E, Mocchegiani E, et al. Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology*. 2006;7:471–81.
- Wikby A, Ferguson F, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Löfgren S, et al. An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005;60:556–65.
- Giménez-Llort L, Mate I, Manassra R, Vida C, De la Fuente M. Peripheral immune system and neuroimmune communication impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1262:74–84.