



## ORIGINAL

## Inmunosenescencia prematura en ratones con una deficiencia en la síntesis de catecolaminas. Efecto del ambiente social



Antonio Garrido<sup>a,b</sup>, Julia Cruces<sup>a,b</sup>, Idoia Iriarte<sup>a</sup>, Catalina Hernández-Sánchez<sup>c,d</sup>, Flora de Pablo<sup>c,d</sup> y Mónica de la Fuente<sup>a,b,\*</sup>

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

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, España

<sup>c</sup> Departamento de Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, España

<sup>d</sup> CIBERDEM (Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 28 de septiembre de 2015

Aceptado el 7 de enero de 2016

On-line el 4 de marzo de 2016

#### Palabras clave:

Inmunosenescencia prematura  
Deficiencia en tirosina hidroxilasa  
Catecolaminas  
Ambiente social  
Ratones macho

### R E S U M E N

**Introducción:** La salud depende del buen funcionamiento de los sistemas homeostáticos (el nervioso, endocrino e inmunitario) y de la adecuada comunicación entre ellos. Se ha comprobado que el estado funcional y redox del sistema inmunitario es un excelente marcador de salud, y que una inmunosenescencia prematura supone una menor esperanza de vida. Dado que las catecolaminas modulan la funcionalidad de las células inmunitarias, la alteración en su síntesis podría contribuir a esa inmunosenescencia. Entre las estrategias que se pueden utilizar para controlarla está el ambiente social.

**Objetivo:** Comprobar si una haploinsuficiencia de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, generaría una inmunosenescencia prematura, y si es posible la modulación de esta por el ambiente social.

**Material y métodos:** Se usaron ratones machos ICR-CD1 adultos ( $9 \pm 1$  meses) hemizigotos (HZ) para la tirosina hidroxilasa (TH-HZ) y controles (WT), que fueron distribuidos en cuatro subgrupos: WT > 50% (en la jaula, la proporción de WT fue mayor al 50%), WT < 50%, TH-HZ < 50% y TH-HZ > 50%. En leucocitos peritoneales se valoró la fagocitosis, quimiotaxis y linfoproliferación en presencia de lipopolisacárido. También, la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión reductasa y glutatión peroxidasa, y el cociente glutatión oxidado/glutatión reducido.

**Resultados:** Los TH-HZ > 50% presentaron, en leucocitos, una funcionalidad y estado redox deteriorados respecto a WT > 50% y similar a ratones viejos. Sin embargo, los TH-HZ < 50% mostraron valores similares a los WT < 50%.

**Conclusión:** Una haploinsuficiencia de la enzima TH provoca una inmunosenescencia prematura, la cual puede ser compensada por la convivencia con un número apropiado de animales WT.

© 2016 SEGG. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### Premature immunosenescence in catecholamines synthesis deficient mice. Effect of social environment

#### A B S T R A C T

**Introduction:** Healthy state depends on the appropriate function of the homeostatic systems (nervous, endocrine and immune systems) and the correct communication between them. The functional and redox state of the immune system is an excellent marker of health, and animals with premature immunosenescence show a shorter lifespan. Since catecholamines modulate the function of immune cells, the alteration in their synthesis could provoke immunosenescence. The social environment could be a strategy for modulating this immunosenescence.

**Aim:** To determine if an haploinsufficiency of tyrosine hydroxylase (TH), the limiting enzyme of synthesis of catecholamines, may produce a premature immunosenescence and if this immunosenescence could be modulated by the social environment.

#### Keywords:

Premature immunosenescence  
Deficiency of tyrosine hydroxylase  
Catecholamines  
Social environment  
Male mice

\* Autor para correspondencia.

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

**Materials and methods:** Adult ( $9 \pm 1$  months) male ICR-CD1 mice with deletion of a single allele (hemizygotic: HZ) of the tyrosine hydroxylase enzyme (TH-HZ) and wild-type (WT) mice were used. Animals were housed in four subgroups: WT > 50% (in the cage, the proportion of WT mice was higher than 50% in relation to TH-HZ), WT < 50%, TH-HZ < 50% and TH-HZ > 50%. Peritoneal leukocytes were collected and phagocytosis, chemotaxis and proliferation of lymphocytes in the presence of lipopolysaccharide were analyzed. Glutathione reductase and glutathione peroxidase activities as well as oxidized/reduced glutathione ratio were studied.

**Results:** TH-HZ > 50% mice showed a deteriorated function and redox state in leukocytes respect to WT > 50% and similar to old mice. However, TH-HZ < 50% animals had similar values to those found in WT < 50% mice.

**Conclusion:** The haploinsufficiency of TH generates premature immunosenescence, which appears to be compensated by living together with an appropriate number of WT animals.

© 2016 SEGG. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

El mantenimiento de la salud depende del correcto funcionamiento de los sistemas homeostáticos (los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario), y de la adecuada comunicación entre ellos, esto es, de la denominada comunicación neuroinmunoendocrina<sup>1</sup>. Entre las vías más relevantes en esta comunicación se encuentra la de las catecolaminas (CA), productos finales del eje simpático-adreno-medular, involucrado en la respuesta ante un estrés agudo<sup>2,3</sup>. Estas neurohormonas son capaces de modular la funcionalidad del sistema inmunitario a través de receptores alfa y beta adrenérgicos presentes en las células inmunitarias, aumentando o disminuyendo tanto la respuesta de la inmunidad innata<sup>2,4</sup> como de la inmunidad adquirida<sup>5</sup>. También la presencia de esos receptores en el sistema nervioso podría generar una modulación indirecta de la inmunidad por los neurotransmisores cerebrales liberados por acción de las CA que afectan la funcionalidad de los leucocitos<sup>2</sup>. Por ello, una alteración en este eje podría provocar un deterioro de la respuesta inmunitaria, y, consecuentemente, una pérdida del equilibrio homeostático y con ello de la salud.

Durante el proceso de envejecimiento los sistemas homeostáticos se van deteriorando y también la comunicación entre ellos<sup>6,7</sup>, lo que conlleva la mayor morbimortalidad que acontece en la vejez. El sistema inmunitario, que por sus características ha sido considerado el mejor marcador del estado de salud y longevidad del individuo<sup>7,8</sup>, sufre una serie de cambios y reestructuraciones con el envejecimiento, proceso denominado inmunosenescencia<sup>7,9,10</sup>. En el marco de la teoría de la oxidación-inflamación del envejecimiento, se ha propuesto al estado funcional de las células inmunitarias como marcador de la velocidad a la que cada individuo lleva a cabo su proceso de envejecimiento, esto es, de su edad biológica<sup>7,11</sup>. De hecho, se ha comprobado que animales de experimentación, cronológicamente adultos, que muestran una inmunosenescencia prematura, tienen un proceso de envejecimiento acelerado y una menor esperanza de vida<sup>11–13</sup>.

En base a que el mantenimiento de una adecuada respuesta homeostática en cada individuo depende de la genética del mismo, pero también del ambiente y estilo de vida<sup>7</sup>, se están investigando una serie de estrategias de tipo ambiental que permitan hacer más lento el proceso de envejecimiento. En este sentido se han propuesto diferentes sistemas de enriquecimiento ambiental que ralenticen la inmunosenescencia<sup>14</sup>. El ambiente social, entendido como el ambiente en el que un individuo se desarrolla, puede inducir cambios que condicionen a dicho individuo durante el resto de su vida<sup>15</sup>. En este contexto, Hashimoto et al.<sup>16</sup> comprobaron que animales sanos que convivían con otros con dermatitis desarrollaban pautas conductuales similares a las de los enfermos. También, se ha demostrado que la convivencia de un individuo sano con un enfermo conllevaba una inmunosupresión

del sano<sup>17,18</sup>. Así, el ambiente social se ha relacionado con la salud y el envejecimiento<sup>15</sup> y se ha comprobado que ambientes competitivos y negativos se acompañan de alteraciones inmunitarias y con aumento de citoquinas proinflamatorias<sup>19</sup>. No obstante, los posibles efectos beneficiosos de un ambiente social positivo sobre el sistema inmunitario no han sido investigados.

Por todo ello, el objetivo del presente estudio fue determinar si en un modelo de ratones con una haploinsuficiencia para la enzima tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la síntesis de CA, tiene lugar una inmunosenescencia prematura y, de observarla, si el ambiente social en el que se encuentren estos animales podría revertir dicha inmunosenescencia.

## Material y métodos

### Animales

Se usaron 20 ratones de la cepa ICR-CD1 machos adultos ( $9 \pm 1$  meses), de los cuales 10 fueron silvestres (*wild-type* [WT]) y 10 con la delección de un alelo de *Th* (hemizigoto [HZ]). Ambos genotipos se obtuvieron del cruce de machos ICR-CD1 silvestres y hembras ICR-CD1 TH hemizigotas. La cepa ICR-CD1 TH hemizigota fue generada mediante retro-cruces de la cepa C57BL6/J hemizigota para *Th* y la cepa ICR-CD1 silvestre durante al menos 10 generaciones<sup>20</sup>. La cepa C57BL6/J hemizigota para *Th* fue amablemente donada por el Dr. Palmiter<sup>21</sup> (Universidad de Washington, Seattle, WA, EE. UU.). Los animales usados fueron hemizigotos debido a que la mutación en homocigosis tiene una alta tasa de letalidad (aproximadamente del 90%) en estado embrionario<sup>20,21</sup>. Los ratones TH-HZ estaban sanos y aparentemente normales, sin signos de ninguna lesión asociada a la mutación. Los rangos de crecimiento de estos animales fueron similares a los de los animales WT.

### Diseño experimental

Los animales fueron estabulados en jaulas con diferente proporción de los genotipos WT y TH-HZ, y se clasificaron en cuatro subgrupos experimentales: WT > 50% (la proporción de WT fue mayor al 50% en relación con los TH-HZ en la jaula: 6 WT/4TH-HZ), WT < 50% (WT menos del 50%: 4WT/6TH-HZ), TH-HZ < 50% (TH-HZ menos del 50% en relación con los WT: 4TH-HZ/6WT) y TH-HZ > 50% (TH-HZ más del 50%: 6TH-HZ/4WT). Todos los animales fueron mantenidos con acceso tanto a comida como agua *ad libitum*. La temperatura ( $22 \pm 2$  °C) y la luz (fotoperiodo invertido) estuvieron controladas. Todos los ratones fueron manipulados según las directrices del Consejo de la Unión Europea (2010/63/EU), del Real decreto de la legislación española (RD/53/2013) y con la aprobación del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

### Obtención de leucocitos peritoneales

Las suspensiones peritoneales se obtuvieron sin sacrificar ni anestesiar a los ratones. Para ello se inmovilizaron los animales, el abdomen se limpió con alcohol al 70% y se les inyectó en el peritoneo 3 mL de una solución de Hank estéril. Mediante masaje abdominal se recuperó aproximadamente el 80% del volumen inyectado. El tiempo empleado en todo el proceso de extracción de la suspensión peritoneal no superó los cinco min. La viabilidad celular se determinó mediante el test de exclusión azul-tripán, y siempre fue superior al 95%.

Todos los estudios inmunológicos y de estrés oxidativo se realizaron usando las suspensiones peritoneales sin fraccionar, para reproducir de la mejor forma la respuesta inmunológica y de estrés oxidativo que se produce *in vivo*. Las suspensiones fueron ajustadas a un número específico de macrófagos y linfocitos peritoneales dependiendo del parámetro a analizar, como se describe en la sección correspondiente. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C, con humedad a saturación y 5% de CO<sub>2</sub>.

### Parámetros inmunológicos

#### Capacidad fagocítica de macrófagos

Para valorar la capacidad fagocítica se utilizó una suspensión peritoneal ajustada a  $5 \times 10^5$  macrófagos/mL de solución de Hank, siguiendo el método previamente descrito<sup>22</sup>. Las alícuotas de 0,2 mL de la suspensión peritoneal se dispensaron en placas *migratory inhibition factor* (Sterilin, Teddington, Inglaterra) y se incubaron durante 40 min. Una vez generada la capa de células adherentes (en la que se encuentran los macrófagos), la placa se lavó con tampón salino (PBS), se le añadió 0,2 mL de solución de Hank, 0,02 mL de bolas de látex (1,09  $\mu\text{m}$  diluidas al 1% en PBS, Sigma, St. Louis, MO) y se incubó durante 30 min. Una vez transcurrido este tiempo, se lavó la placa, se fijó, se tiñó y se calculó el índice fagocítico (IF) contabilizando en el microscopio óptico (x100) el número de partículas ingeridas por 100 macrófagos.

#### Quimiotaxis de linfocitos

La capacidad de quimiotaxis (movilidad inducida hacia un foco infeccioso) de los linfocitos se evaluó utilizando la técnica desarrollada por Boyden<sup>23</sup>, con modificaciones<sup>24</sup>. La técnica consiste en el uso de unas cámaras con dos compartimentos separadas por un filtro de nitrocelulosa (Millipore, Cork, Irlanda) con un diámetro de poro de 3  $\mu\text{m}$ . En el compartimento superior se añadió una alícuota de 0,3 mL de la suspensión peritoneal, ajustada a  $5 \times 10^5$  linfocitos/mL de solución de Hank, mientras que en el compartimento inferior, para crear un gradiente químico, se incorporó una alícuota de 0,4 mL del quimioatrayente fMet-Leu-Phe (Sigma) a una concentración de  $10^{-8}$  M. Las cámaras se incubaron durante 3 h y posteriormente los filtros se fijaron y se tiñeron. Se contabilizó al microscopio (x100) el número de linfocitos presentes en la cara inferior del filtro mediante 4 barridos de 5 mm cada uno. El valor obtenido de dicho recuento constituye lo que se denomina índice de quimiotaxis (IQ).

#### Respuesta proliferativa de los linfocitos al mitógeno lipopolisacárido

La capacidad de proliferación se valoró mediante el test de transformación linfoblástica en respuesta a lipopolisacárido (LPS) (Sigma), siguiendo el protocolo descrito con anterioridad<sup>24</sup>, con pequeñas modificaciones. Se prepararon alícuotas de la suspensión peritoneal ajustadas a  $1 \times 10^6$  linfocitos/mL en medio completo conteniendo RPMI-1640 (PAA, Pasching, Austria), 10% de suero fetal bovino descomplementarizado (Thermo Scientific, Cramlington, Northumberland) y 1% de gentamicina (PAA). Se dispensaron 0,2 mL/pocillo de esa suspensión en una placa de 96 pocillos y se

añadió 0,02 mL/pocillo de LPS (0,1 mg/mL) resultando en una concentración final de 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS por pocillo. El ensayo se realizó por triplicado. Después de una incubación de 48 h, se reemplazaron 0,1 mL de medio de cultivo de cada pocillo, por 0,1 mL de medio completo conteniendo 0,005 mL de una solución de timidina triada (<sup>3</sup>H) a 0,1 mCi/mL en PBS estéril (MP Biomedicals; actividad específica de 35 Ci/mmol). Tras 24 h de incubación se recogieron las células y la radioactividad de cada pocillo se midió en un contador beta (LKB). Los resultados se expresaron como cuentas por minuto.

### Parámetros de estrés oxidativo

#### Actividad glutatión reductasa

La actividad glutatión reductasa (GR) se determinó mediante un método previamente descrito<sup>25</sup>, con pequeñas modificaciones. Las alícuotas de la suspensión peritoneal se ajustaron a  $1 \times 10^6$  leucocitos/mL de solución de Hank, se centrifugaron a 1.076 g durante 10 min a 4 °C y los precipitados se resuspendieron con tampón fosfato 50 mM conteniendo EDTA 6,3 mM (Sigma), pH 7,4. Posteriormente, las muestras se sonicaron (tres ciclos de 10 seg a una potencia del 75%, con intervalos de descanso de 20 seg), y se centrifugaron a 3.200 g durante 20 min a 4 °C. La actividad total se determinó siguiendo la oxidación de beta-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (beta-NADPH, Sigma) a 340 nm. Los resultados se expresaron como miliunidades (mU) de actividad enzimática/ $10^6$  leucocitos.

#### Actividad glutatión peroxidasa

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa se valoró siguiendo el protocolo original descrito por Lawrence et al.<sup>26</sup>, con pequeñas modificaciones. La suspensión peritoneal se ajustó a  $1 \times 10^6$  leucocitos/mL de solución de Hank. Posteriormente se centrifugó a 1.076 g durante 10 min a 4 °C y el precipitado se resuspendió en tampón fosfato 50 mM pH 7,4. Después, las muestras se sonicaron (siguiendo el protocolo anteriormente descrito) y se centrifugaron a 3.200 g durante 20 min a 4 °C. La actividad total se determinó usando hidróxido de cumeno (cumeno-OOH, Sigma), el cual se oxida por la adición de beta-NADPH, en presencia de glutatión reductasa (Sigma). La reacción se siguió espectrofotométricamente por el decremento de la absorbancia a 340 nm. Los resultados se expresaron como miliunidades (mU) de actividad enzimática/ $10^6$  leucocitos.

#### Cociente glutatión oxidado/glutatión reducido

El método que se siguió para la determinación de ambas formas del glutatión (oxidado y reducido) fue uno fluorimétrico previamente descrito<sup>27</sup>, con pequeñas modificaciones y adaptado a placa de 96 pocillos. El procedimiento se basa en la capacidad de reaccionar del glutatión oxidado (GSSG) a pH 12 y del glutatión reducido (GSH) a pH 8 en presencia de o-phtalaldehído (OPT, Sigma), dando lugar a un compuesto fluorescente en ambos casos. Alícuotas de 1 mL de leucocitos peritoneales, ajustadas a  $1 \times 10^6$  células/mL de solución de Hank, se centrifugaron a 1.200 g durante 10 min a 4 °C. Los precipitados fueron resuspendidos en tampón fosfato EDTA, 0,1 M, pH 8 (Sigma). Posteriormente, las muestras se sonicaron (como se describió en el apartado anterior), se adicionaron 0,05 mL de HClO<sub>4</sub> al 60% (Sigma), y se centrifugaron a 9.500 g durante 10 min a 4 °C. De los sobrenadantes, 0,01 mL, se dispensaron en dos placas negras de 96 pocillos (Nunc, Denmark), cada una para valorar una forma de glutatión. Para determinar los niveles de GSSG, se añadieron a cada pocillo 0,01 mL de N-etilmaleimida (NEM, 0,04 M) (Sigma) para prevenir la interferencia del GSH y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Después se adicionaron 0,184 mL de NaOH (0,1 N), pH 12,5 y 0,02 mL de OPT (1 mg/mL en metanol), y se incubó durante 15 min en las misma

condiciones anteriormente citadas. Por último, se determinó la fluorescencia emitida por cada pocillo a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión. El contenido de proteína de las muestras se determinó mediante el método del ácido bicinónico (Sigma). Para la medida del contenido de GSH, se añadieron 0,190 mL de tampón fosfato con EDTA y 0,02 mL de OPT a los 0,01 mL del sobrenadante dispensado en los pocillos de la placa. Esta se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min, y la fluorescencia emitida por cada pocillo se midió a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión. El cociente GSSG/GSH se expresó como el contenido de GSSG (pg/mg proteína) dividido entre el contenido de GSH (pg/mg proteína).

### Análisis estadístico

Los datos se han expresado como la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de cada grupo. El programa estadístico usado fue SPSS versión 21.0 (Chicago, IL, EE. UU.). La normalidad de las muestras fue valorada mediante el test de Kolmorov-Smirnov. Posteriormente, la homogeneidad de las muestras se evaluó mediante el test de Levene. Por último, las medias se compararon mediante el test t de Student de variables independientes. El nivel de significación mínimo fue  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Parámetros inmunológicos

Los resultados de las funciones estudiadas se muestran en la figura 1.

#### Capacidad fagocítica de macrófagos

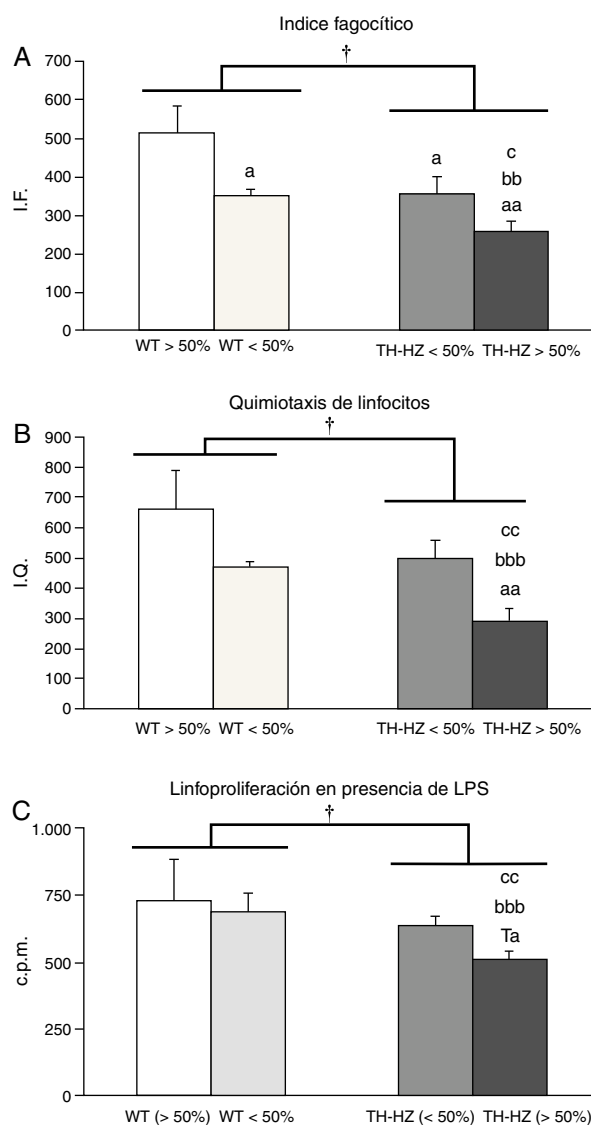
Los IF de los macrófagos (fig. 1 A) de ratones TH-HZ (TH-HZ > 50% + TH-HZ < 50%), fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que los de los animales WT (WT-HZ > 50% + WT < 50%). El análisis del IF por subgrupos mostró que estas diferencias eran más dramáticas en los animales del subgrupo TH-HZ > 50%, los cuales mostraron los menores niveles IF respecto al resto de los subgrupos (WT > 50%,  $p < 0,01$ ; WT < 50%,  $p < 0,01$ ; TH-HZ < 50%,  $p < 0,05$ ). Por el contrario los animales del subgrupo WT > 50% presentaron los niveles más altos de IF. Fue interesante comprobar que los animales de los subgrupos TH-HZ < 50% y WT < 50% tuvieron valores intermedios de IF y similares entre sí, pero significativamente diferentes a los de los subgrupos TH-HZ > 50% ( $p < 0,05$ ) y WT > 50% ( $p < 0,05$ ) (fig. 1 A).

#### Capacidad quimiotáctica de linfocitos

La capacidad de quimiotaxis de los linfocitos de los animales TH-HZ, fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que la de los animales WT (fig. 1 B). Al tener en cuenta los subgrupos, los TH-HZ > 50% mostraron los niveles más bajos de IQ con respecto al resto de los subgrupos (WT > 50%,  $p < 0,01$ ; WT < 50%,  $p < 0,001$ ; TH-HZ < 50%,  $p < 0,01$ ). Por el contrario, los subgrupos TH-HZ < 50% y WT < 50% mostraron valores de IQ semejantes entre sí y no significativamente diferentes a los del subgrupo WT > 50%, aunque con tendencia a ser menores (fig. 1 B).

#### Respuesta proliferativa de los linfocitos en respuesta al mitógeno lipopolisacárido

La respuesta proliferativa de los linfocitos a la estimulación con LPS (fig. 1 C) fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en los animales TH-HZ que en los animales WT. Estas diferencias fueron debidas al

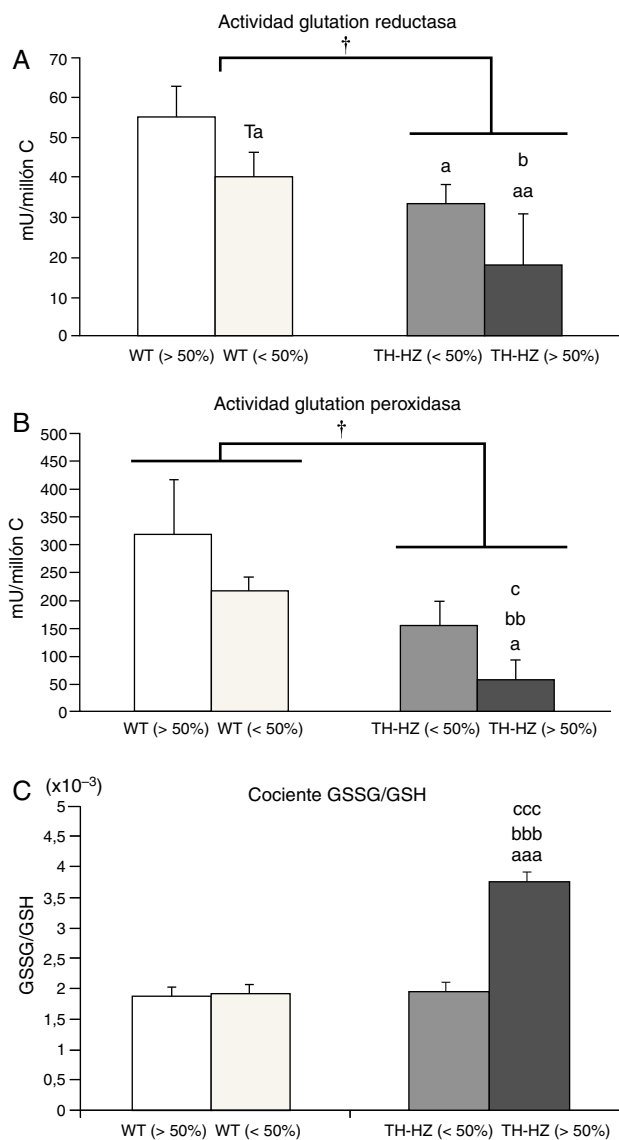


**Figura 1.** Funciones inmunitarias de los leucocitos peritoneales de ratones silvestres (WT) y con haploinsuficiencia para la enzima tirosina hidroxilasa (TH-HZ), clasificados según la proporción de cada genotipo en la jaula: WT > 50% (la proporción de controles fue superior al 50% respecto a los TH-HZ), WT < 50% (la proporción de WT fue menor al 50%), TH-HZ < 50% (la proporción de TH-HZ fue menor al 50% respecto a los WT) y TH-HZ > 50% (la proporción de TH-HZ fue mayor al 50%). Cada columna representa la media  $\pm$  desviación estándar de 5 valores correspondientes a ese número de animales. A) Capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales representada por el índice fagocítico (IF), siendo este el número de bolas de látex ingeridas/100 macrófagos. B) Capacidad quimiotáctica de linfocitos peritoneales representada por el índice de quimiotaxis (IQ). C) Capacidad proliferativa de los linfocitos peritoneales en presencia de LPS, representada por las cuentas por millón (cpm). †  $p < 0,05$ , con respecto a los animales WT; a  $p < 0,05$ , aa  $p < 0,05$ , con respecto a los animales WT > 50%; bb  $p < 0,01$ , bbb  $p < 0,001$ , con respecto a los animales WT < 50%; c  $p < 0,05$ , cc  $p < 0,01$ , con respecto a los animales TH-HZ < 50%. Ta  $p = 0,057$  con respecto a los animales WT > 50%.

subgrupo TH-HZ > 50%, el cual mostró la menor respuesta proliferativa con respecto al resto de los subgrupos (WT > 50%,  $p = 0,057$ ; WT < 50%,  $p < 0,01$ ; TH-HZ < 50%,  $p < 0,01$ ). Sin embargo, el subgrupo TH-HZ < 50% presentó valores de proliferación similares a los de los subgrupos WT < 50% y WT > 50%.

### Parámetros de estrés oxidativo

Los resultados de estos parámetros se muestran en la figura 2.



**Figura 2.** Parámetros de estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales de ratones control (WT) y con una haploinsuficiencia para la enzima tirosina hidroxilasa (TH-HZ), clasificados según la proporción de animales en la jaula: WT > 50% (la proporción de controles fue superior al 50%), WT < 50% (la proporción de WT fue menor al 50% respecto a los TH-HZ), TH-HZ < 50% (la proporción de TH-HZ fue menor al 50% respecto a los WT) y TH-HZ > 50% (la proporción de TH-HZ fue mayor al 50%). Cada columna representa la media  $\pm$  desviación estándar de 5 valores correspondientes a ese mismo número de animales. A) Actividad glutatión reductasa representada en miliunidades/millón de células leucocitarias (mU/millón C). B) Actividad glutatión peroxidasa representada en miliunidades/millón de células leucocitarias (mU/millón C). C) Cociente glutatión oxidado (GSSG)/glutatión reducido (GSH). †  $p < 0,05$  con respecto a los animales WT; a  $p < 0,05$ , aa  $p < 0,05$ , aaa  $p < 0,001$ , con respecto a los animales WT < 50%; b  $p < 0,05$ , bb  $p < 0,01$ , bbb  $p < 0,001$ , con respecto a los animales WT < 50%; c  $p < 0,05$ , ccc  $p < 0,001$ , con respecto a los animales TH-HZ < 50%. Ta  $p = 0,055$ , con respecto a los animales WT > 50%.

### Actividad glutatión reductasa

La actividad de la enzima GR (fig. 2 A) de los leucocitos de los animales TH-HZ fue menor que la de los WT ( $p < 0,05$ ). Estas diferencias se hicieron más marcadas al comparar el subgrupo TH-HZ > 50% respecto a los subgrupos WT > 50% ( $p < 0,01$ ) y WT < 50% ( $p < 0,05$ ). Los subgrupos TH-HZ < 50% y WT < 50% mostraron valores de actividad similares entre sí, pero significativamente menores que los del subgrupo WT > 50% ( $p = 0,055$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente).

### Actividad glutatión peroxidasa

En cuanto a la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (fig. 2 B), los ratones TH-HZ tuvieron menor actividad que los animales WT ( $p < 0,05$ ). Además, estas diferencias fueron más notables en el subgrupo TH-HZ > 50% respecto al resto de los subgrupos (WT > 50%,  $p < 0,05$ ; WT < 50%,  $p < 0,01$ ; TH-HZ < 50%,  $p < 0,05$ ). Los niveles de actividad de los subgrupos TH-HZ < 50% y WT < 50% no fueron significativamente diferentes a los del subgrupo WT < 50%, aunque presentaban tendencia a estar disminuidos.

### Cociente glutatión oxidado/glutatión reducido

Los resultados obtenidos del cociente GSSG/GSH están representados en la figura 2.C. No se observaron diferencias significativas entre los animales TH-HZ y los animales WT. Sin embargo, al tener en cuenta los cuatro subgrupos, los TH-HZ > 50% mostraron un aumento significativo del cociente con respecto al resto de los subgrupos (WT > 50%,  $p < 0,001$ ; WT < 50%,  $p < 0,001$ ; TH-HZ < 50%,  $p < 0,001$ ). Mientras que el subgrupo el TH-HZ < 50% presentó valores del cociente GSSG/GSH similares a los de los subgrupos WT < 50% y WT > 50%.

### Discusión

Aunque se han llevado a cabo algunos estudios sobre los efectos que pueden tener las alteraciones en la síntesis de CA en el sistema inmunitario<sup>4,5</sup>, el presente trabajo es el primero en abordar el efecto de una haploinsuficiencia de la enzima tirosina hidroxilasa, enzima limitante de la síntesis de CA, sobre varios parámetros de función y estado redox de las células inmunitarias.

Al envejecer se producen una serie de cambios en los sistemas fisiológicos, fundamentalmente en los homeostáticos, que conllevan la reestructuración de los mismos. En el caso del sistema inmunitario esta reestructuración se denomina inmunosenescencia<sup>9</sup>, la cual se caracteriza por un deterioro de la funcionalidad inmunitaria. Si bien son los linfocitos T y las funciones que llevan a cabo en el marco de la inmunidad adquirida los parámetros que parecen disminuir de forma más evidente al avanzar la edad<sup>9</sup>, también, la respuesta innata, con actividades como la capacidad fagocítica o la de migración hacia un foco infeccioso (quimiotaxis) se ven disminuidas<sup>7</sup>, aunque hay más controversia al respecto. Además, el estado de estrés oxidativo, el cual ha sido propuesto como base del proceso de envejecimiento<sup>28</sup>, y que parece subyacer en la inmunosenescencia<sup>7</sup>, aumenta con el paso del tiempo. Así, al envejecer se produce una disminución de las defensas antioxidantes y un aumento de los compuestos oxidantes, generándose un estrés oxidativo crónico. Precisamente en la teoría de la oxidación-inflamación del envejecimiento se ha propuesto que el sistema inmunitario, dado su necesidad de producir oxidantes para llevar a cabo sus funciones, podría, al avanzar la edad, y si está mal regulado, aumentar su estado de estrés oxidativo y consecuentemente el del organismo, pudiendo de este modo acelerar la velocidad de envejecimiento del mismo, aumentando, consecuentemente, la morbimortalidad<sup>7</sup>. De hecho, animales con una inmunosenescencia prematura, observada en parámetros funcionales similares a los analizados en el presente trabajo, y que se acompaña de un estrés oxidativo en sus células inmunitarias, tienen una menor esperanza de vida<sup>7,12,13</sup>.

Los leucocitos de los ratones TH-HZ, tanto en la fagocitosis y la quimiotaxis, como en la proliferación de los linfocitos en respuesta a LPS, mostraron valores significativamente menores que los correspondientes a los de los WT. Un deterioro de la función inmunitaria ha sido también encontrada por otros autores en animales con una depleción central, tanto física como química, de

catecolaminas<sup>29,30</sup>. En modelos de ratones con inmunosenescencia prematura y una menor esperanza de vida, se ha observado unos resultados similares en esas funciones cuando se comparan con los correspondientes controles de su misma edad<sup>7,12,31</sup>. También, al comprobar el estado de estrés oxidativo de las células inmunitarias de los ratones TH-HZ, se observó que enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa, ambas pertenecientes al ciclo del glutatión, presentaban una menor actividad en comparación con la mostrada por las células de los controles WT. El cociente GSSG/GSH, un indicador del estrés oxidativo<sup>32</sup>, aunque no mostró diferencias significativas entre ambos grupos experimentales, sí apareció muy elevado en las células del subgrupo TH-HZ > 50%. Estos resultados están indicando una situación de mayor oxidación en los leucocitos de los TH-HZ, lo cual ha sido también observado en las células inmunitarias peritoneales de ratones con inmunosenescencia prematura<sup>33,34</sup>, así como en animales deplecionados de neuronas dopaminérgicas nigroestriales mediante la inoculación con 6-OHDA<sup>35</sup>. Todo ello parece demostrar que una deficiencia de la enzima tirosina hidroxilasa genera una inmunosenescencia prematura.

El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo teniendo en cuenta el ambiente en el que convive cada subgrupo experimental, esto es, la proporción de ratones que existe en cada jaula atendiendo a su genotipo, muestra que el ambiente modula la función y estado redox del sistema inmunitario. Así, se observó que los ratones TH-HZ criados en un ambiente con dominancia del genotipo TH-HZ presentaban el fenotipo de inmunosenescencia más extremo. Por el contrario, ratones con el mismo fondo genético, TH-HZ, pero criados en un ambiente con dominancia del genotipo WT presentaban función inmunológica y estrés oxidativo similares a los de los animales WT que convivían con mayor proporción de TH-HZ (WT < 50%). Incluso, algunos de los parámetros analizados eran similares a los del subgrupo WT > 50% cuyo sistema inmunitario presenta el mejor estado funcional en todos los parámetros evaluados, tanto inmunológicos como de estrés oxidativo. Es evidente que las diferencias encontradas entre TH-HZ y WT se deben principalmente al subgrupo TH-HZ > 50%. Este hecho parece indicar que el ambiente en el que conviven los animales podría estar condicionando el diferente nivel de inmunosenescencia que muestran los ratones TH-HZ > 50% y TH-HZ < 50% generada por la haploinsuficiencia de *Th*, lo que apoyaría la relación que ya ha sido propuesta por algunos autores como Seeman y Crimmins entre el ambiente y el envejecimiento<sup>15</sup>.

Entre los posibles mecanismos que pueden subyacer a este efecto se podría encontrar diferencias en la respuesta comportamental debido a la deficiencia de la *Th*, mostrando ciertas facetas de conducta social alterada, como ocurre en animales con deficiencia en dopamina<sup>36</sup>, o la liberación de pistas odoríferas por parte de los animales TH, como ocurre en los experimentos de Palermo-Neto et al.<sup>18</sup>. Aún así, lo más probable es que sea un sumatorio de diferentes mecanismos, entre los que posiblemente se encuentren los sugeridos anteriormente.

Aunque previamente se ha demostrado que ratones de la cepa C57/BL6 con una haploinsuficiencia de *Th* no muestran alteración en los niveles de CA<sup>37</sup> en la cepa ICR-CD1 sí se han detectado (resultados en hembras en vías de publicación). Teniendo en cuenta que la plasticidad transcripcional del gen de la *Th* depende del tipo de cepa<sup>38</sup>, lo que genera una diferente expresión del gen<sup>39</sup>, es posible entender las diferencias en los niveles de CA en los ratones de esas dos cepas.

En conclusión, los ratones macho con haploinsuficiencia del gen *Th*, al tener alterada la síntesis de CA y posiblemente sus niveles en el organismo, presentarían una inmunosenescencia prematura, la cual podría verse modulada por el ambiente social en el que conviven dichos animales. Este mayor efecto del ambiente que de la alteración genética en la capacidad funcional de las células

inmunitarias, es un aspecto que debe ser objeto de investigaciones más extensas. Dado el comprobado papel que tienen los parámetros funcionales estudiados como marcadores de salud, de velocidad de envejecimiento y predictores de longevidad<sup>7</sup>, los resultados obtenidos sugieren que mejorar el ambiente social podría ser una excelente estrategia para ralentizar la inmunosenescencia y consecuentemente la velocidad de envejecimiento de cada individuo, consiguiendo así una longevidad más saludable.

## Financiación

Este estudio ha sido financiado por las subvenciones del Ministerio español de Ciencia e Innovación (MINECO) (BFU2011-30336); Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (PI15/01787); Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) (RD 12/0043/0018) del ISCIII-FEDER de la Unión Europea; Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) del ISCIII-FEDER de la Unión Europea, y Grupo de investigación UCM (GR3/14-910379).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Besedovsky HO, del Rey A. Physiology of psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun*. 2007;21:34–44.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve and integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*. 2000;52:595–638.
- Procaccini C, Pucino V, de la Rosa V, Marone G, Matarese G. Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. *Front Immunol*. 2014;5:143.
- Xiu F, Stanojic M, Jeschke MG. Norepinephrine inhibits macrophage migration by decreasing CCR2 expression. *PLoS One*. 2013;8:e69167.
- Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine and b2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol Rev*. 2001;53:487–525.
- Fabris N. Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to aging. *Arch Gerontol Geriatr*. 1991;12:219–30.
- 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.
- Wayne SJ, Rhune 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.
- Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, et al. T-cells and aging. *Front Biosci*. 2002;7:d1056–183.
- Bauer ME, Wieck A, Petersen LE, Baptista TS. Neuroendocrine and viral correlates of premature immunosenescence. *Ann NY Acad Sci*. 2015:1–11.
- De la Fuente M. The immune system, a marker and modulator of the rate of aging. En: Massoud A, Rezaei N, editores. *Immunology of Aging*. Berlin: Springer-Verlag; 2014. p. 3–23.
- 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.
- Vida C, González EM, de la Fuente M. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr Pharm Des*. 2014;20:4656–78.
- 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.
- Seeman TE, Crimmins E. Social environment effects on health and aging: integrating epidemiologic and demographic approaches and perspectives. *Ann NY Acad Sci*. 2001;954:88–117.
- 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. *Br J Dermatol*. 2006;154:28–33.
- Alves GJ, Vismari L, Florio JC, Palermo-Neto J. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. *Neurosci Res*. 2006;56:172–9.
- Palermo-Neto J, Alves GJ. Neuroimmune interactions and psychological stress induced by cohabitation with a sick partner: a review. *Curr Pharm Des*. 2014;20:4629–41.

19. Chiang JJ, Eisenberger NI, Seeman TE, Taylor SE. Negative and competitive social interactions are related to heightened proinflammatory cytokine activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:1878–82.
20. Vázquez P, Robles AM, de Pablo F, Hernández-Sánchez C. Non-neural tyrosine hydroxylase, via modulation of endocrine pancreatic precursors, is required for normal development of beta cells in the mouse pancreas. *Diabetologia*. 2014;57:2339–47.
21. Zhou QY, Quaife CJ, Palmiter RD. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature*. 1995;374:640–3.
22. De la Fuente M, del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology*. 1991;73:205–11.
23. Boyden SV. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*. 1962;115:453–6.
24. Puerto M, Guayerbas N, Álvarez P, de la Fuente M. Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol*. 2005;165:33–40.
25. Massey V, Williams C. On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. *J Biol Chem*. 1965;240:4470–81.
26. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976;71:952–8.
27. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976;74:214–26.
28. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;2:298–300.
29. Pacheco-López G, Niemi MB, Kou W, Bildhäuser A, Gross CM, Goebel MU, et al. Central catecholamine depletion inhibits peripheral lymphocyte responsiveness in spleen and blood. *J Neurochem*. 2003;86:1024–31.
30. Madden KS, Stevens SY, Felten DL, Bellinger DL. Alterations in T lymphocyte activity following chemical sympatectomy in young and old Fischer 344 rats. *J Neuroimmunol*. 2000;103:131–45.
31. Guayerbas N, Catalán M, Victor VM, Miquel J, de la Fuente M. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res*. 2002;134(1–2):41–8.
32. Kand'ár R. The ratio of oxidized and reduced forms of selected antioxidants as a possible marker of oxidative stress in humans. *Biomed Chromatogr*. 2015 [Publicación electrónica].
33. Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L, de la Fuente M. Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants. *Develop Comp Immunol*. 2006;30:1168–80.
34. Alvarado C, Álvarez P, Puerto M, Gausserés N, Jiménez L, de la Fuente M. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition*. 2006;22:767–77.
35. Liu X, Shao R, Li M, Yang G, Edaravone protects neurons in the rat substantia nigra against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress damage. *Cell Biochem Biophys*. 2014;70:1247–54.
36. Kabitzke PA, Simpson EH, Kandel ER, Balsam PD. Social behavior in a genetic model of dopamine at different neurodevelopmental time points. *Genes Brain Behav*. 2015;14:503–15.
37. Kobayashi K, Morita S, Sawada H, Mizuguchi T, Yamada K, Nagatsu I, et al. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase locus results in severe catecholamine depletion and perinatal lethality in mice. *J Biol Chem*. 1995;270:27235–43.
38. Marcel D, Raison S, Bezin L, Pujol JF, Weissmann D. Plasticity of tyrosine hydroxylase gene expression within BALB/C and C57black/6 mouse locus coeruleus. *Neurosci Lett*. 1998;242:77–80.
39. Cambon K, Dos-Santos Coura R, Groc L, Carbon A, Weissmann D, Changeux JP, et al. Aggressive behavior during social interaction in mice is controlled by the modulation of tyrosine hydroxylase expression in the prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2010;171:840–51.