



## ORIGINAL

# Mejoría de la inmunidad y la esperanza de vida en ratones maduros, genéticamente deficientes en la síntesis de catecolaminas, tras convivir con controles durante dos meses

Noemi Ceprian<sup>a,b</sup>, Antonio Garrido<sup>c</sup> y Mónica De la Fuente<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología (Unidad de Fisiología Animal), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, España

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

<sup>c</sup> Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

## Historia del artículo:

Recibido el 5 de septiembre de 2022

Aceptado el 20 de noviembre de 2022

On-line el 14 de diciembre de 2022

## Palabras clave:

Ambiente social

Deficiencia en tirosina hidroxilasa

Longevidad

Inmunosenescencia prematura

Ratones macho

## RESUMEN

**Introducción:** Los ratones hemicigotos en la tirosina hidroxilasa (TH-HZ), enzima limitante en la síntesis de catecolaminas, muestran una inmunosenescencia prematura, que en hembras se asocia con menor esperanza de vida que los correspondientes controles (WT). La convivencia de los TH-HZ con WT permite, en la edad adulta, una normalización de la función inmunitaria tanto en machos como en hembras.

**Objetivo:** Comprobar si la convivencia durante dos meses de machos maduros TH-HZ con WT produce una mejoría de la función inmunitaria de los primeros y si esto repercute en una mayor esperanza de vida media.

**Material y métodos:** Ratones macho ICR-CD1 maduros ( $13 \pm 1$  meses) TH-HZ convivieron con WT (proporción 2:4 por jaula) dos meses. Al inicio, al mes y a los dos meses de convivencia se extrajeron los leucocitos peritoneales de los animales y se valoró la capacidad fagocítica de macrófagos, la quimiotaxis de macrófagos y linfocitos, la actividad antitumoral *natural killer* (NK) y la capacidad linfoproliferativa en respuesta a los mitógenos concanavalina A y lipopolisacárido. Los animales se mantuvieron en esas condiciones hasta su muerte natural.

**Resultados:** Los TH-HZ parten, en general, con peor función inmunitaria y menor longevidad que los WT, observando una mejoría de esta tras la convivencia, alcanzándose valores similares a los controles. En la actividad NK esa mejoría se observó al mes de convivencia.

**Conclusión:** La convivencia de los ratones macho TH-HZ con los WT durante dos meses, en la edad madura, permite mejorar la respuesta inmunitaria y la longevidad de esos animales genéticamente modificados.

© 2022 SEGG. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Improved immunity and mean lifespan in mature mice genetically deficient in catecholamine synthesis after living with wild type for two months

## ABSTRACT

**Introduction:** Mice hemizygous in tyrosine hydroxylase (TH-HZ), the limiting enzyme in catecholamine synthesis, show premature immunosenescence, which in females is associated with a shorter lifespan than the corresponding controls (WT). The coexistence of TH-HZ with WT improves the immune function in both males and females in adulthood.

**Objective:** To test whether cohabitation for two months of mature male TH-HZ with WT improves the immune function of the former and whether this impacts the lifespan.

**Material and methods:** Mature male ICR-CD1 mice ( $13 \pm 1$  months) TH-HZ coexisted with WT (2:4 ratio in each cage) for two months. Peritoneal leukocytes were extracted from all animals at baseline, one month, and two months after cohabitation, and macrophage phagocytic capacity, macrophage and lymphocyte

## Keywords:

Social environment

Deficiency of tyrosine hydroxylase

Longevity

Premature immunosenescence

Male mice

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mondelaf@bio.ucm.es (M. De la Fuente).

chemotaxis, natural killer (NK) antitumor activity, and lymphoproliferative capacity in response to the mitogens concanavalin A and lipopolysaccharide (LPS) were assessed. The animals were maintained under these conditions until their natural death.

**Results:** The TH-HZ, which start, in general, with lower values than the WT in the immune functions studied, improved them after two months of cohabitation, becoming similar to those of the controls. This improvement was already observed in NK activity after one month of cohabitation.

The TH-HZ presented lower mean longevity than WT, but when they cohabited with WT, it was similar to the latter.

**Conclusion:** The coexistence of TH-HZ male mice with WT mice for two months at mature age improves these genetically modified animals' immune response and longevity.

© 2022 SEGG. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

El conseguir un envejecimiento exitoso que permita una mayor longevidad saludable se asocia con la capacidad de cada individuo de mantener la salud. Esta depende de tener una adecuada homeostasis, la cual se sustenta en la apropiada capacidad funcional de los sistemas homeostáticos, como el sistema nervioso, endocrino e inmunitario<sup>1,2</sup>. En este contexto, el sistema inmunitario, cuya funcionalidad ha sido descrita como un excelente marcador de salud, de velocidad de envejecimiento y de longevidad<sup>3</sup>, es especialmente sensible a los cambios tanto internos como externos que pueda sufrir un individuo. Un claro ejemplo son las alteraciones de las funciones inmunitarias que aparecen tras una inadecuada respuesta al estrés<sup>4,5</sup>. De hecho, las alteraciones inmunitarias que tienen lugar en individuos que responden mal a las situaciones de estrés, con las que continuamente se enfrenta cada organismo, son muy parecidas a las que aparecen en este sistema con el envejecimiento, lo que se denomina inmunosenescencia<sup>6</sup>. En este sentido, hemos comprobado que ratones que tienen una inadecuada respuesta a las situaciones de estrés en la edad adulta, presentan una inmunosenescencia prematura y una menor esperanza de vida, por lo que se les ha denominado «*prematurely aging mice*» (PAM)<sup>3,7</sup>.

En la respuesta al estrés, uno de los ejes fisiológicos más importantes es el eje simpático-adreno-medular (SAM) y, por ende, sus productos finales, las catecolaminas (CA), ya que desempeñan un papel esencial en la generación de la respuesta adaptativa frente a estímulos estresantes. Además, estos neurotransmisores y sustancias neuroendocrinas también son fundamentales para el mantenimiento de las funciones de los sistemas homeostáticos<sup>8,9</sup>. De hecho, estas CA, a través de la unión a sus receptores específicos, regulan la mayoría de las funciones inmunitarias, como la fagocitosis de macrófagos<sup>10</sup>, la respuesta de los linfocitos a mitógenos<sup>11</sup> mediante la producción de la interleucina 2 (IL-2)<sup>12</sup>, o el control de la respuesta inflamatoria a través de la IL-10<sup>13</sup>, las cuales son esenciales para el mantenimiento de la salud<sup>14,15</sup>. En un modelo de ratón con una deficiencia genética en la tirosina hidroxilasa (TH), la primera enzima de la síntesis de las CA<sup>16</sup>, hemos comprobado que estos animales hemicigotos para esa enzima (TH-HZ) presentan en la edad adulta una inmunosenescencia prematura, hecho que ha sido comprobado fundamentalmente en hembras<sup>17,18</sup>, pero también en machos<sup>19</sup>. Una inmunosenescencia prematura o acelerada se asocia con una mayor velocidad de envejecimiento y, consecuentemente, una menor esperanza de vida<sup>8</sup>. Este hecho se ha observado en hembras TH-HZ, las cuales muestran una menor longevidad que los correspondientes controles silvestres (*wild type* [WT])<sup>17</sup>. No obstante, se desconoce si lo mismo sucede en los machos.

Por otra parte, entre las estrategias utilizadas para hacer un envejecimiento más saludable, nuestro grupo ha estudiado en los últimos años los efectos que puede tener un ambiente social positivo, focalizándonos en sus efectos sobre la función inmunitaria y la longevidad. Conociendo las similitudes en la evolución de ciertas funciones de las células inmunitarias a lo largo del envejecimiento

en humanos y ratones<sup>3</sup>, y pudiendo en estos últimos analizar la relación de las mismas con la longevidad de cada animal (hecho no posible en humanos dada su elevada esperanza de vida), hemos llevado a cabo los experimentos del ambiente social en ratones. Comprobamos que la convivencia de ratones hembra cronológicamente viejas durante dos meses con adultas produce una mejoría de la función inmunitaria y la longevidad de las primeras<sup>20</sup>, y lo mismo sucede en hembras PAM cuando conviven con los controles no prematuramente envejecidos (NPAM)<sup>21</sup>. En el caso de los ratones TH-HZ, se ha comprobado que convivir desde el destete en una proporción < 50% con WT, mejora la funcionalidad inmunitaria tanto en hembras<sup>22</sup> como en machos adultos<sup>19</sup>. En un trabajo reciente hemos comprobado que las hembras TH-HZ que han llegado a adultas sin contacto con las WT y que a esa edad conviven durante dos meses con WT mejoran algunos aspectos de la respuesta inmunitaria como la linfoproliferación y la red de citoquinas pro y antiinflamatorias<sup>23</sup>. Sin embargo, dadas las diferencias entre machos y hembras, especialmente en los sistemas homeostáticos y concretamente en el inmunitario<sup>24</sup>, y desconociendo qué sucede en machos TH-HZ que han estado sin contacto con los WT cuando conviven con ellos dos meses en la edad madura, el objetivo del presente trabajo ha sido comprobar si a esa edad madura la convivencia durante dos meses con los WT permitirá mejorar la inmunidad y si esto repercutirá en la longevidad de los mismos.

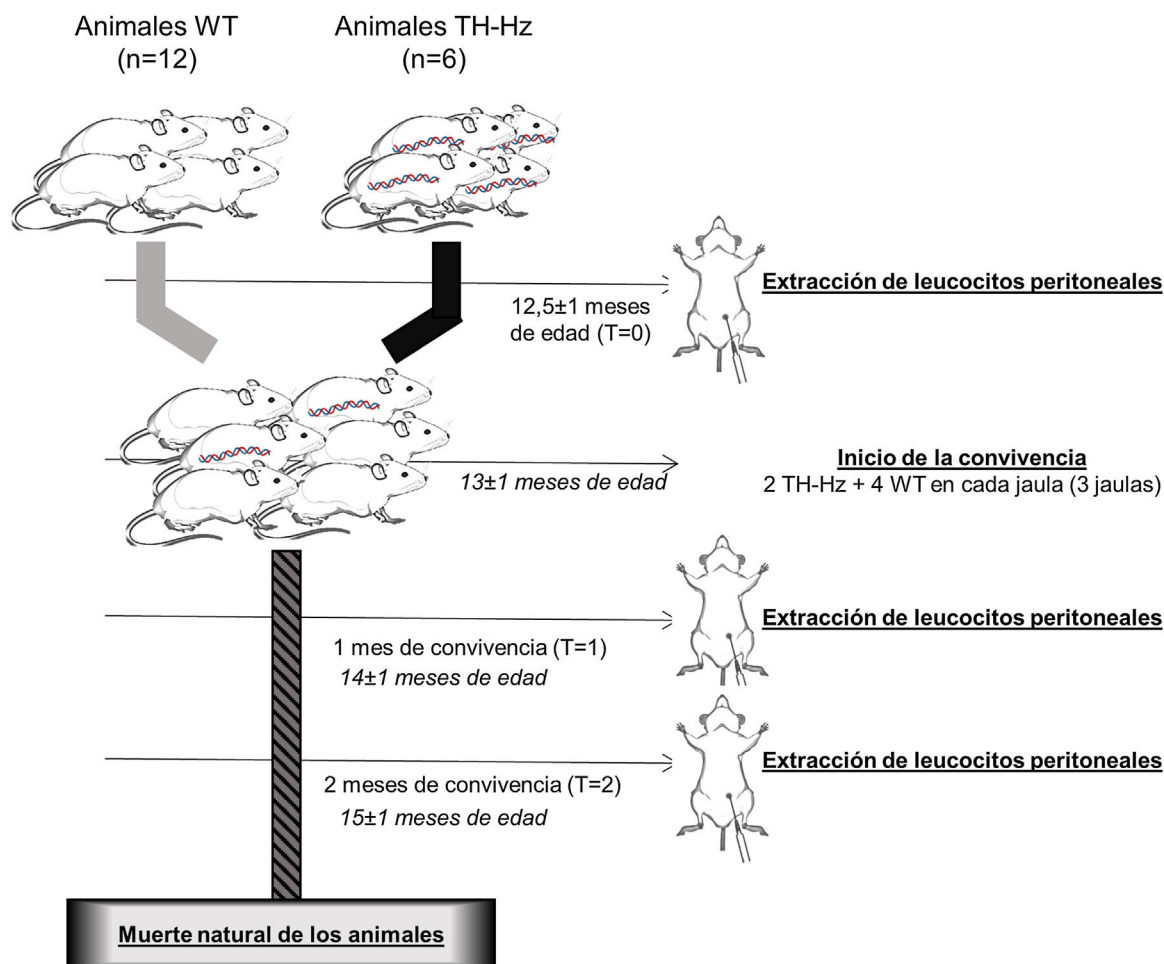
## Material y métodos

### Animales

Se utilizaron 36 ratones macho ICR-CD1 maduros ( $12 \pm 1$  meses de edad), de los cuales 14 tenían una depleción de uno de los alelos para la enzima TH (hemicigotos TH-HZ), y 22 tenían fenotipo silvestre (WT). Los ratones fueron amablemente cedidos por las Dras. Flora de Pablo y Catalina Hernández (Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España). Los ratones se obtuvieron a partir de retro-cruces como se ha descrito previamente<sup>19</sup>.

### Diseño

El diseño experimental utilizado se describe en la [figura 1](#). A los  $12,5 \pm 1$  meses de edad (edad madura), se extrajeron los leucocitos peritoneales de los ratones para la valoración de la funcionalidad inmunitaria de estos. Posteriormente, a los  $13 \pm 1$  meses de edad se inició la convivencia de ratones TH-HZ ( $n = 6$ ) y WT ( $n = 12$ ) con una proporción 2:4 (< 50%) por jaula. Al mes y a los dos meses de iniciar la convivencia se extrajeron de nuevo los leucocitos peritoneales para observar los cambios en la funcionalidad inmunitaria por efecto de la convivencia. Los ratones se mantuvieron en las mismas condiciones hasta la muerte natural para establecer la esperanza de vida media de los grupos experimentales. Se utilizaron también un grupo de TH-HZ ( $n = 8$ ) y otro de WT ( $n = 10$ ), que no fueron



**Figura 1.** Descripción del diseño experimental. TH-HZ: ratones hemicigotos para la tirosina hidroxilasa; WT: ratones silvestres control o wild type.

manipulados, para control de longevidad. El protocolo fue aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid (PROEX. 224.0/21) y se realizó siguiendo las directrices del Consejo de la Unión Europea (2010/63/EU) y del Real decreto de la legislación española (RD/53/2013).

#### Obtención de leucocitos peritoneales

Los leucocitos peritoneales se obtuvieron siguiendo un método previamente descrito<sup>19</sup>. Brevemente, se inyectó en la cavidad peritoneal solución de Hank's, que se recuperó por el orificio de entrada de la aguja tras un masaje abdominal. Todos los ensayos se realizaron con la solución de leucocitos peritoneales sin fragmentar para reproducir *ex vivo* la funcionalidad inmunitaria *in vivo*. Todas las incubaciones se realizaron a 37 °C con saturación de humedad y un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Capacidad fagocítica de macrófagos

La capacidad fagocítica de macrófagos se realizó siguiendo un protocolo previamente descrito<sup>19</sup>. Se calculó el índice fagocítico, contabilizando el número de partículas de látex fagocitadas por 100 macrófagos en microscopio óptico (100x).

#### Capacidad quimiotáctica de macrófagos y linfocitos

La capacidad quimiotáctica de macrófagos y linfocitos se determinó utilizando un método previamente descrito<sup>20</sup>. Se calculó el

índice de quimiotaxis (I.Q.) de macrófagos y linfocitos, contabilizando el número de células en un tercio de la cara inferior del filtro mediante microscopía óptica (100x).

#### Actividad natural killer (NK) antitumoral de leucocitos

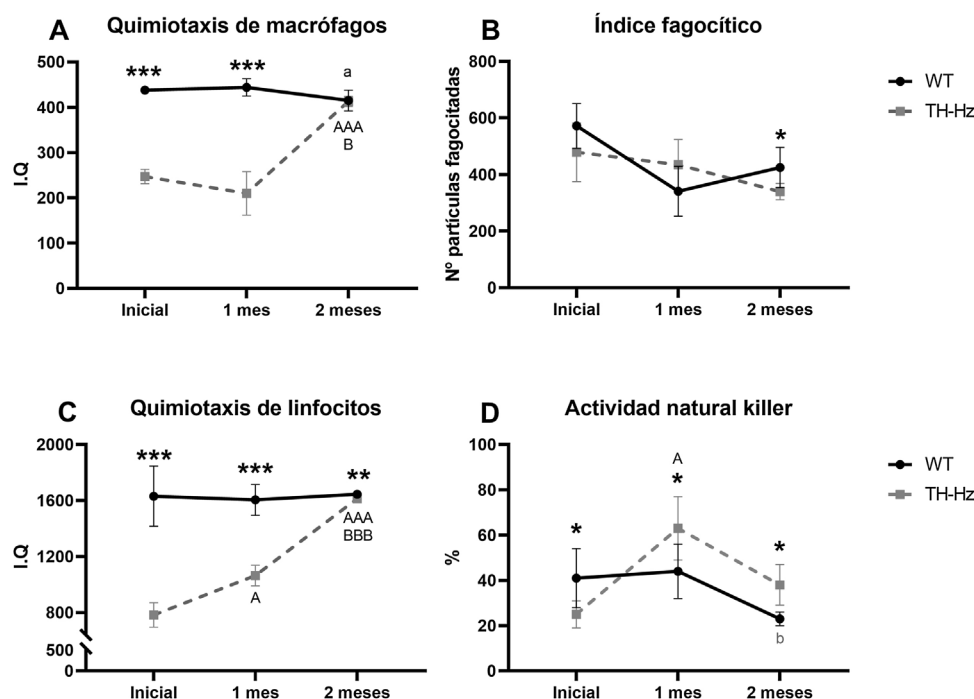
La actividad NK de los leucocitos se determinó de forma indirecta valorando la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) por lisis de células diana (línea tumoral Yac-1), como se ha descrito previamente<sup>20</sup>. Los resultados se expresaron como porcentaje de lisis de las células tumorales.

#### Capacidad proliferativa de linfocitos

La capacidad proliferativa de los linfocitos se realizó utilizando un método previamente descrito<sup>17</sup>. Se valoró la capacidad proliferativa tanto en ausencia de estímulo, proliferación espontánea, como en presencia de los mitógenos concanavalina A (ConA; Sigma-Aldrich) y lipopolisacárido (LPS; *Escherichia coli*, 055: B5 M Sigma-Aldrich). Los resultados se expresaron como cuentas por minuto (cpm) para la proliferación basal y como porcentaje de estimulación en el caso de la respuesta a mitógenos.

#### Supervivencia

Los animales se mantuvieron en las mismas condiciones hasta su muerte natural para poder determinar la esperanza de vida media.



**Figura 2.** Funciones de la inmunidad innata de los leucocitos peritoneales de ratones silvestres (WT) o hemicigotos para la tirosina hidroxilasa (TH-HZ). Se muestra la quimiotaxis (A) y fagocitosis (B) de macrófagos, la quimiotaxis de linfocitos (C) y la actividad citotóxica *natural killer* de los leucocitos peritoneales (D). Diferencias entre WT y TH-HZ representadas por \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,01$ . Diferencias dentro del grupo WT con respecto al punto inicial representadas por <sup>a</sup> $p \leq 0,05$ ; y respecto al mes de convivencia como <sup>b</sup> $p \leq 0,05$ . Diferencias dentro del grupo TH-HZ con respecto al punto inicial representadas por <sup>A</sup> $p \leq 0,05$ , <sup>AAA</sup> $p \leq 0,01$ ; y respecto al mes de convivencia como <sup>B</sup> $p \leq 0,05$ , <sup>BBB</sup> $p \leq 0,01$ .

### Estadística

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS 28.0 (Chicago, IL, EE. UU.). Se determina la normalidad y la homocedasticidad de las muestras mediante los test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias entre grupos en los distintos tiempos se analizaron mediante la *t* de Student de muestras independientes, mientras que las diferencias dentro de cada grupo en los distintos tiempos se analizaron mediante una *t* de Student de muestras dependientes. Por último, la esperanza de vida media estimada se analizó mediante el test de Kaplan Meier. Todos los resultados se muestran como la media aritmética  $\pm$  la desviación estándar. Se consideró un nivel de significación mínimo de  $p \leq 0,05$ .

### Resultados

Los resultados obtenidos para las funciones de la inmunidad innata se muestran en la figura 2. La quimiotaxis de macrófagos (fig. 2A) fue menor en el grupo TH-HZ antes de iniciar la convivencia ( $p < 0,001$ ) y al mes de iniciarla ( $p < 0,001$ ) comparada con los ratones WT. Tras los dos meses, los valores del grupo TH-HZ aumentaron hasta alcanzar a los de WT. La capacidad fagocítica de los macrófagos (fig. 2B) de los ratones TH-HZ no mejoraron con la convivencia, presentando un índice fagocítico menor ( $p < 0,05$ ) que los ratones WT. La quimiotaxis de linfocitos (fig. 2C) fue menor en los ratones TH-HZ en comparación con los WT inicialmente ( $p < 0,001$ ), pero la convivencia aumentó esa capacidad en los TH-HZ, sin llegar a alcanzar los valores de los WT ( $p < 0,001$  al mes,  $p < 0,01$  a los dos meses). Aunque inicialmente los ratones TH-HZ tenían una menor actividad antitumoral NK (fig. 2D) respecto a los ratones WT ( $p < 0,05$ ), esta mejora tras la convivencia, llegando a superar los valores de los WT al mes y dos meses ( $p < 0,05$ ). Respecto a la capacidad de proliferación linfocitaria en ausencia de estímulo, proliferación espontánea, no hubo diferencias significativas entre WT y TH-HZ antes de iniciar la convivencia (WT:  $97 \pm 13$ ; TH-HZ:  $104 \pm$

17) o tras dos meses de esta (WT:  $109 \pm 13$ ; TH-HZ:  $107 \pm 13$ ). No obstante, se dio una mayor proliferación en el grupo WT ( $121 \pm 3$ ) respecto a TH ( $94 \pm 15$ ;  $p < 0,05$ ) al mes de la convivencia.

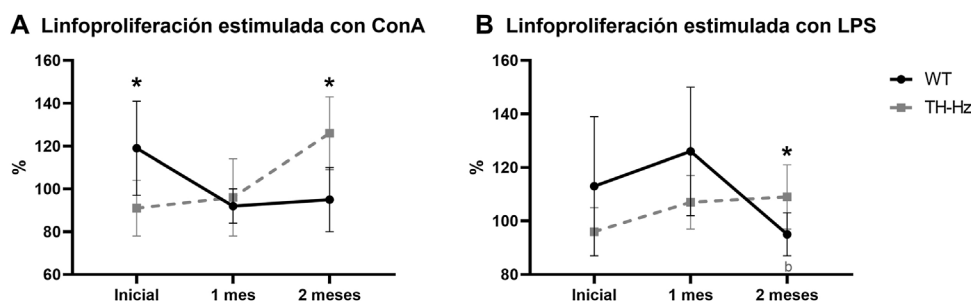
En cuanto a la linfoproliferación en presencia de mitógenos (fig. 3), antes de iniciar la convivencia, los linfocitos de los ratones WT presentaron mayor porcentaje de estimulación en presencia de ConA que los ratones TH-HZ ( $p < 0,05$ ) y, tras los dos meses de convivencia, los ratones TH-HZ mejoraron su capacidad proliferativa superando los valores de los ratones WT ( $p < 0,05$ ), tanto en presencia de Con A (fig. 3A) como de LPS (fig. 3B).

Por último, los resultados de longevidad (tabla 1) muestran que los ratones TH-HZ controles vivieron menos que los WT controles ( $p < 0,05$ ), pero los que convivieron con WT presentaron una mayor longevidad, no observándose diferencia significativa con los WT.

### Discusión

Aunque investigaciones previas han demostrado que una convivencia continua entre ratones TH-HZ y silvestres (WT) iniciada tras el destete y mantenida hasta la edad adulta es capaz de mejorar a esa edad una serie de funciones inmunitarias de los primeros, tanto en machos<sup>19</sup> como en hembras<sup>22</sup>, el presente trabajo es el primero en abordar los efectos sobre la funcionalidad inmunitaria y la longevidad media de ratones macho TH-HZ en la edad madura tras uno y dos meses de convivencia con ratones WT. Los resultados muestran que esta corta convivencia es suficiente para observar una mejoría en varias funciones inmunitarias de los ratones TH-HZ, revirtiendo los deterioros inmunitarios que tienen estos animales, asociados a la deficiencia en la síntesis de catecolaminas por la menor carga alélica del gen *Th*<sup>17</sup>. Consecuentemente, se aumenta su esperanza de vida.

En el presente trabajo se constata, por primera vez, que en la edad madura los machos TH-HZ tienen una inmunidad, en general, más deteriorada que los WT. Así, funciones de la inmunidad innata, como la quimiotaxis de macrófagos y de linfocitos junto



**Figura 3.** Funciones de la inmunidad adaptativa de los leucocitos peritoneales de ratones silvestres (WT) o hemigotos para la tirosina hidroxilasa (TH-HZ). Se muestra la capacidad proliferativa en respuesta al mitógeno concanavalina A (ConA) (A) y lipopolisacárido (LPS) (B). Diferencias entre WT y TH-HZ representadas por \* $p \leq 0,05$ .

**Tabla 1**

Efecto de la convivencia sobre la longevidad media de ratones WT y TH-HZ

Grupo	Longevidad media estimada (semanas)
WT control	107 ± 5
WT	94 ± 7
TH-HZ	97 ± 9
TH-HZ control	84 ± 6 #

TH-HZ: ratones hemigotos para la tirosina hidroxilasa; WT: ratones silvestres o *wild type*. #  $p \leq 0,05$  respecto a WT control. WT control y TH-HZ control: ratones que permanecieron sin convivencia ni manipulación.

con la actividad antitumoral NK muestran valores más bajos que los observados en el grupo control. Este declive inmunitario también se observa en algunas de las funciones de la inmunidad adquirida, como la capacidad proliferativa de los linfocitos en presencia del mitógeno ConA. Este hecho se había observado ya en la edad adulta tanto en machos<sup>19</sup>, como en hembras<sup>17</sup>.

Un resultado inesperado obtenido en este estudio es la ausencia de alteraciones en el índice fagocítico de los macrófagos, ya que, como previamente se ha comentado, las CA regulan esta función inmunitaria<sup>9,10</sup>. Una posible explicación podría ser que los animales WT no están en su edad adulta (momento en el que se inicia el proceso de envejecimiento) sino en la madura, edad en la que comienzan a aparecer las primeras alteraciones inmunitarias asociadas a este proceso. De hecho, un estudio longitudinal previo que analizó los cambios inmunológicos debidos a la menor concentración de CA en ratones hembra TH-HZ y WT observó que en la edad madura no existían diferencias significativas entre ambos grupos experimentales en esta función inmunitaria<sup>17</sup>. Este mismo hecho podría estar ocurriendo en el caso de la proliferación espontánea de los linfocitos, la cual se ha relacionado con un mayor estado inflamatorio<sup>25,26</sup>, y pese a observar valores más altos en el grupo TH-HZ, estos no llegaron a ser estadísticamente significativos.

En conjunto, los resultados obtenidos en el grupo TH-HZ antes de comenzar la convivencia parecen indicar que, en estos ratones macho, tiene lugar, en la edad madura, un deterioro generalizado de la funcionalidad inmunitaria, como sucede en las hembras TH-HZ<sup>17</sup>.

Sin embargo, cuando los ratones TH-HZ convivieron con ratones silvestres (WT) en una proporción 2:4 (dos TH-HZ vs. cuatro WT, por jaula), los primeros presentaron una mejoría de la mayoría de las funciones inmunitarias analizadas. Esta mejoría fue claramente patente en algunas de las pertenecientes a la inmunidad innata, como la quimiotaxis de macrófagos y de linfocitos, las cuales mostraron valores más altos en el grupo TH-HZ tras dos meses de convivencia en comparación con el valor inicial (antes del inicio de la estrategia) y alcanzando valores similares a los obtenidos en el grupo WT. También la actividad NK fue mayor en estos animales (los TH-HZ) tras la convivencia. De hecho, en esta última función la mejoría se observó ya al mes de convivencia.

En este sentido, se ha demostrado que el mantenimiento de la salud depende, en parte, del contexto en el cual un individuo vive,

ya que, en las especies sociales, como los humanos y los roedores, las respuestas fisiológicas están profundamente influenciadas por su contexto social<sup>27</sup>. Un buen ejemplo de sistema fisiológico influenciado por el ambiente social es el sistema inmunitario<sup>28</sup>. De hecho, se ha descrito que personas mayores con contextos sociales positivos exhiben una mayor actividad NK evaluada en sangre periférica<sup>29,30</sup>. Por su parte, se ha comprobado que cuando ratones y ratas viven en un contexto social positivo presentan una mayor rapidez en la curación de heridas<sup>31,32</sup>, proceso íntimamente relacionado con una buena funcionalidad inmunitaria innata. Además, estudios preliminares obtenidos en ratones macho TH-HZ adultos tras convivir con WT desde el destete muestran una mayor quimiotaxis de linfocitos<sup>19</sup>. Un resultado similar también ha sido descrito en hembras ICR-CD1 TH-HZ adultas, las cuales, tras convivir durante nueve meses con ratones silvestres muestran una mejoría de la inmunidad innata en sus leucocitos peritoneales<sup>22</sup>. También, ratones viejos ICR-CD1 cuando viven con adultos durante dos meses presentan una mayor actividad NK, así como quimiotaxis de macrófagos y linfocitos en comparación con sus compañeros viejos no expuestos a dicha convivencia<sup>20</sup>. De forma similar, ratones ICR-CD1 cronológicamente adultos, pero prematuramente envejecidos (PAM), tras convivir con adultos no envejecidos (NPAM) exhiben mejorías en sus funciones inmunitarias innatas<sup>21</sup>.

En cuanto a la inmunidad adquirida, representada en este trabajo por la respuesta proliferativa de los linfocitos en presencia de los estímulos mitogénicos ConA y LPS, los ratones TH-HZ maduros que convivieron con WT mostraron un mayor porcentaje de estimulación a ambos mitógenos a los dos meses de convivencia, exhibiendo valores mayores a los observados en el grupo WT. Mejorías similares en la proliferación en respuesta a LPS han sido observadas en ratones adultos ICR-CD1 TH-HZ tras convivir desde el destete con WT<sup>19</sup> y en hembras adultas tras el mismo tiempo de convivencia (nueve meses) con compañeros silvestres<sup>22</sup>. El efecto positivo del ambiente social en esas funciones inmunitarias también ha sido comprobado en ratones ICR-CD1 cronológicamente viejos tras convivir durante dos meses con adultos<sup>20</sup>, y en los PAM adultos, tras convivir con los NPAM<sup>21</sup>.

Otras estrategias de tipo ambiental, como el enriquecimiento, tienen efectos beneficiosos similares, los cuales han sido descritos en ratones cronológicamente viejos<sup>33,34</sup>, demostrando su efectividad para aumentar la esperanza de vida cuando ese enriquecimiento comienza en la edad adulta<sup>35</sup>. Esas funciones inmunitarias que mejoran con la convivencia son las que, como se ha comprobado en ratones, reflejan la velocidad de envejecimiento<sup>3</sup> y permiten predecir la esperanza de vida<sup>36</sup>. De hecho, en el presente trabajo se comprueba, por primera vez, que esa convivencia de los TH-HZ con los WT permite a los TH-HZ una mayor longevidad.

Llamativamente, los ratones WT tras convivir con TH-HZ durante dos meses exhibieron valores más bajos en algunas funciones analizadas en este estudio, como la actividad NK y la capacidad linfoproliferativa en respuesta a LPS y ConA. Además, tras un mes



de convivencia los leucocitos peritoneales de los ratones WT mostraron una mayor proliferación basal espontánea, indicativa del establecimiento de un estrés inflamatorio<sup>25,26</sup>. Por tanto, esta convivencia parece afectar negativamente a los ratones WT. Aunque no se conoce el origen específico de estos deterioros inmunitarios, una posibilidad podría ser el establecimiento de un estrés psicológico generado en estos ratones tras convivir con los TH-HZ. En este sentido, estudios previos han descrito que la cohabitación entre ratones sanos y compañeros enfermos produce en los sanos inmunosupresión<sup>37,38</sup>. Además, resultados similares se han observado en ratones hembra ICR-CD1 WT adultos tras convivir con TH-HZ<sup>17</sup>, así como en los NPAM adultos tras vivir con los PAM<sup>21</sup>, y en los cronológicamente adultos tras convivir con ratones cronológicamente viejos<sup>20</sup>.

Por lo comentado anteriormente, ese deterioro de los WT en las funciones inmunitarias estudiadas, que permiten predecir la esperanza de vida<sup>3</sup>, nos posibilita comprender la menor longevidad media en los WT que convivieron con TH-HZ, en comparación con los WT que no lo hicieron, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Si bien la mejora en la longevidad de los TH-HZ que vivieron durante dos meses con los WT, no fue estadísticamente significativa al compararla con los TH-HZ que no convivieron, sí se pierde la diferencia significativa con los WT que tienen esos animales en cuanto a su menor esperanza de vida. Estos resultados parecen estar en controversia con los previos, ya que cuando esta estrategia ambiental es aplicada en los PAM, estos sí muestran una mayor longevidad media con diferencias estadísticamente significativas<sup>21</sup>. Una posible explicación que podría subyacer a esta diferencia es la edad en la que los individuos son expuestos a la convivencia. Mientras que en los PAM esta estrategia fue aplicada en la edad adulta, en el presente estudio la estrategia fue iniciada cuando los ratones alcanzaron la edad madura. Un hecho comprobado es que los efectos positivos de algunas intervenciones, como por ejemplo el enriquecimiento ambiental, pierden su efecto positivo sobre el aumento de la esperanza de vida cuando son aplicadas en un momento algo avanzado del envejecimiento<sup>35</sup>.

Varios mecanismos podrían estar involucrados en los efectos observados tras esta convivencia, todos ellos relacionados con la comunicación social. Es importante considerar que, aunque los TH-HZ de este estudio se encuentran en la edad madura, esta alteración genética produce el desarrollo de un envejecimiento prematuro como previamente ha sido descrito en hembras<sup>17</sup> y soportan los resultados observados en este estudio. En este sentido, este envejecimiento debido a la deficiencia de la enzima TH podría estar asociado con alteraciones en la comunicación social. De hecho, deterioros en la conducta, el olor y las vocalizaciones, todos ellos procesos importantes en el procesamiento de la comunicación social, muestran un deterioro asociado a la edad<sup>39,40</sup>. Por tanto, los ratones macho TH-HZ maduros de este estudio podrían presentar deterioros en su comunicación social, y tras vivir con ratones silvestres desarrollarían mecanismos compensatorios a través de sus percepciones visuales, olfatorias, auditivas y táctiles por la presencia de los animales WT, mejorando, por tanto, su respuesta social y, por ende, desencadenando los efectos beneficiosos previamente comentados. De hecho, se ha comprobado recientemente que el contacto piel-con piel en los ratones es uno de los mecanismos más implicados en los efectos positivos de esta convivencia entre ratones cronológicamente viejos y adultos (datos en vías de publicación). No obstante, deberían realizarse más estudios para intentar dilucidar estos mecanismos que subyacen a los efectos beneficiosos encontrados.

En conclusión, este estudio indica que la convivencia de ratones macho TH-HZ maduros con silvestres durante dos meses es capaz de revertir los deterioros inmunitarios que presentan estos animales con la haploinsuficiencia de la enzima TH, repercutiendo positivamente en su longevidad. En la continua cuestión de qué es

más determinante para el mantenimiento de la salud y para alcanzar una buena longevidad por parte de cada individuo, si sus genes o el ambiente, los resultados del presente estudio parecen indicar la gran relevancia que tiene este último, especialmente el ambiente social que se tenga, lo que supone un apoyo a la denominada «Social Safety Theory»<sup>27</sup>.

## Financiación

Este estudio ha sido financiado por la ayuda a Grupos de investigación de la Universidad Complutense de Madrid. Grupo de Investigación de «Envejecimiento, Neuroinmunología y Nutrición» (910379).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Nos gustaría agradecer a Guillermo Gutiérrez López su ayuda en la determinación de la capacidad fagocítica.

## Bibliografía

- 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. <http://dx.doi.org/10.2174/138161209789058110>.
- López-Otín C, Kroemer G. Hallmarks of Health. *Cell.* 2021;184:33–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.034>.
- Martínez de Toda I, Maté I, Vida C, Cruces J, De la Fuente M. Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity. *Aging (Albany NY).* 2016;8:3110–9. <http://dx.doi.org/10.18632/aging.101116>.
- Dhabhar FS. Effects of stress on immune function: the good, the bad and the beautiful. *Immunol Res.* 2014;58(2–3):193–210. <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-014-8517-0>.
- Ray A, Gulati K, Rai N. Stress, anxiety and immunomodulation: a pharmacological analysis. *Vitam Horm.* 2017;103:1–25. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2016.09.007>.
- De la Fuente M. Oxidation and Inflammation in the Immune and Nervous Systems, a Link Between Aging and Anxiety. En: Fulop T, Franceschi C, Hirokawa K, Pawelec G, editores. *Handbook of Immunosenescence*. Cham: Springer; 2018. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-64597-1\\_115-1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-64597-1_115-1).
- Guayervas N, Puerto N, Ferrández MD, De la Fuente M. A diet supplemented with thiolic antioxidants improves leucocyte function in two strains of prematurely ageing mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;29:1009–14. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03758.x>.
- Marino F, Cosentino M. Adrenergic modulation of immune cells: an update. *Amino Acids.* 2013;45:55–71. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-1186-6>.
- Scanzano A, Cosentino M. Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Front Pharmacol.* 2015;6:171. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2015.00171>.
- Borda ES, Tenenbaum A, Sales ME, Rumi L, Sterin-Borda L. Role of arachidonic acid metabolites in the action of a beta adrenergic agonist on human monocyte phagocytosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1998;58:85–90. [http://dx.doi.org/10.1016/S0952-3278\(98\)90145-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0952-3278(98)90145-4).
- Elliott L, Brooks W, Roszman T. Inhibition of anti-CD3 monoclonal antibody-induced T-cell proliferation by dexamethasone, isoproterenol, or prostaglandin E2 either alone or in combination. *Cell Mol Neurobiol.* 1992;12:411–27. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00711542>.
- Bartik MM, Brooks WH, Roszman TL. Modulation of T cell proliferation by stimulation of the beta-adrenergic receptor: lack of correlation between inhibition of T cell proliferation and cAMP accumulation. *Cell Immunol.* 1993;148:408–21. <http://dx.doi.org/10.1006/cimm.1993.1122>.
- Agac D, Estrada LD, Maples R, Hooper LV, Farrar JD. The b2-adrenergic receptor controls inflammation by driving rapid IL-10 secretion. *Brain Behav Immun.* 2018;74:176–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2018.09.004>.
- Padro CJ, Sanders VM. Neuroendocrine regulation of inflammation. *Semin Immunol.* 2014;26:357–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.003>.
- Sharma D, Farrar JD. Adrenergic regulation of immune cell function and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2020;42:709–17. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-020-00829-6>.
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase, the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem.* 1964;239:2910–7.
- Garrido A, Cruces J, Ceprián N, Hernández-Sánchez C, De la Fuente M. Premature aging in behavior and immune functions in tyrosine hydroxylase haploinsufficient female mice. A longitudinal study. *Brain Behav Immun.* 2018;69:440–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2018.01.003>.

18. Garrido A, Cruces J, Ceprián N, Vara E, de la Fuente M. Oxidative-Inflammatory Stress in Immune Cells from Adult Mice with Premature Aging. *Int J Mol Sci*. 2019;20:769, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20030769>.
19. Garrido A, Cruces J, Iriarte I, Hernández-Sánchez C, De Pablo F, De la Fuente M. Premature immunosenescence in catecholamine synthesis deficient mice. Effect of social environment. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2017;52:20–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.regg.2016.01.002>.
20. Garrido A, Cruces J, Ceprián N, De la Fuente M. Improvements in behavior and immune function and increased life span of old mice cohabiting with adult animals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018;73:873–81, <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/gly043>.
21. Garrido A, Cruces J, Ceprián N, Díaz-Del Cerro E, Félix J, De la Fuente M. The ratio of prematurely aging to non-prematurely aging mice cohabiting, conditions their behavior, immunity and lifespan. *J Neuroimmunol*. 2020;343:577240, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577240>.
22. Garrido A, Cruces J, Ceprián N, Hernández-Sánchez C, De Pablo F, De la Fuente M. Social environment ameliorates Behavioral and immune impairments in tyrosine hydroxylase haploinsufficient female mice. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2021;16:548–66, <http://dx.doi.org/10.1007/s11481-020-09947-2>.
23. Garrido A, de la Fuente M. Social environment improves the cytokine profile and lymphoproliferative response in chronologically old and prematurely aging mice. *Mech Ageing Dev*. 2022;206:111692, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2022.111692>.
24. Shepherd R, Cheung AS, Pang K, Saffery R, Novakovic B. Sexual Dimorphism in Innate Immunity: The Role of Sex Hormones and Epigenetics. *Front Immunol*. 2021;11:604000, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.604000>.
25. De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol*. 2006;80:219–27, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.11.004>.
26. Bauer ME, De la Fuente M. The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mech Ageing Dev*. 2016;158:27–37, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2016.01.001>.
27. Slavich GM. Social Safety Theory: Understanding social stress, disease risk, resilience, and behavior during the COVID-19 pandemic and beyond. *Curr Opin Psychol*. 2022;45:101299, <http://dx.doi.org/10.1016/j.copsyc.2022.101299>.
28. Garrido A, Martínez de Toda I, Díaz del Cerro E, Félix J, Ceprián N, González-Sánchez M, et al. Social environment as a modulator of immunosenescence. *Expert Rev Mol Med*. 2022;1:1–75, <http://dx.doi.org/10.1017/erm.2022.24>.
29. Lutgendorf SK, Sood AK, Anderson B, McGinn S, Maiseri H, Dao M, et al. Social support, psychological distress, and natural killer cell activity in ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:7105–13, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.10.015>.
30. Lamkin DM, Lutgendorf SK, McGinn S, Dao M, Miseri H, DeGeest K, et al. Positive psychosocial factors and NKT cells in ovarian cancer patients. *Brain Behav Immun*. 2008;22:65–73, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2007.06.005>.
31. Detillion CE, Craft TKS, Glasper ER, Prendergast BJ, DeVries AC. Social facilitation of wound healing. *Psychoneuroendocrinology*. 2004;29:1004–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2003.10.003>.
32. Glasper ER, Devries AC. Social structure influences effects of pair housing on wound healing. *Brain Behav Immun*. 2005;19:61–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2004.03.002>.
33. Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Baune BT. Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:97, <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2014.00097>.
34. Brod S, Gobetti T, Gittens B, Ono M, Perretti M, D'Acquisto F. The impact of environmental enrichment on the murine inflammatory immune response. *JCI Insight*. 2017;2:e90723, <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.90723>.
35. Arranz L, De Castro NM, Baeza I, Mate I, Viveros MP, De la Fuente M. Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: long term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Res*. 2010;13:415–28, <http://dx.doi.org/10.1089/rej.2009.0989>.
36. Martínez de Toda I, Vida C, Sanz San Miguel L, De la Fuente M. Function, oxidative, and inflammatory stress parameters in immune cells as predictive markers of lifespan throughout aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;4574276, <http://dx.doi.org/10.1155/2019/4574276>.
37. Morgulis MSFA, Stankevicius D, Sá-Rocha LC, Palermo-Neto J. Cohabitation with a sick cage mate: consequences on behavior and on Ehrlich tumor growth. *Neuroimmunomodulation*. 2004;11:49–57, <http://dx.doi.org/10.1159/000072969>.
38. 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, <http://dx.doi.org/10.2174/1381612820666140130204657>.
39. Salchner P, Lubec G, Singerwald N. Decreased social interaction in aged rats may not reflect changes in anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res*. 2004;151:1–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2003.07.002>.
40. Finkel JC, Besch VG, Hergen A, Kakarena J, Pohida T. Effects of aging on current vocalization threshold in mice measured by a novel nociception assay. *Anesthesiology*. 2006;105:360–9, <http://dx.doi.org/10.1097/0000542-200608000-00020>.