

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Marcadores de envejecimiento cronológico y patológico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Hikaru Kobayashi García

Directoras

Mónica de la Fuente Rey
Mónica González Sánchez

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología



**MARCADORES DE ENVEJECIMIENTO
CRONOLÓGICO Y PATOLÓGICO**

TESIS DOCTORAL

HIKARU KOBAYASHI GARCÍA

Directoras

Prof.^a Dra. Mónica De la Fuente del Rey

Prof.^a Dra. Mónica González Sánchez

Madrid, 2021

La realización de la presente tesis doctoral se ha llevado a cabo durante los años 2016-2021 con la concesión a Hikaru Kobayashi García de una beca para la formación de personal investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) (BES-2014-070669).

千里の道も一歩から

“Un viaje de 1000 millas comienza con un primer paso”

Lao-Tse

A mi familia

Agradecimientos

Esta tesis ha sido posible gracias al apoyo de muchas personas y a todas ellas quiero expresar mi agradecimiento por todas sus aportaciones.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras, la Dra. Mónica De la Fuente y la Dra. Mónica González, por su inestimable apoyo y supervisión durante todos estos años, por ayudarme a ordenar mis pensamientos, mis palabras y mis acciones, por haberme ayudado a madurar como persona y como científico.

Al Dr. Gustavo Plaza y Blanca González de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos, por expandir mi conocimiento del comportamiento biofísico de materiales celulares.

Al Dr. Luis Sanz San Miguel, por su colaboración y guía en la realización de los modelos matemáticos desarrollados en esta tesis.

Al personal técnico del Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología, Teresa Peláez y Teresa Rodríguez, por animarme a cada paso hasta en las horas más intempestivas.

También, a mis compañeros de laboratorio, Garrido, Mariano, Carmen, Caroline, Julia, Noemí, Irene, Estefanía, Judith, Lara y Yulia, por su apoyo en todo lo académico referente a los ratones, y también por esa parte emocional y social tan importante que hemos compartido en esta etapa.

A mis antiguos compañeros del laboratorio del *Centre de Regulació Genòmica* (CRG) de Barcelona: Mari, Birgit, Alba, Dan, Valeria, Elena y, en especial, al Dr. Bill Keyes, por la confianza y oportunidad de poder trabajar en su grupo, ayudándome a iniciar mi carrera científica. Y si pienso en Barcelona, debo recordar a mis amigos Javi y Álvaro, fuisteis esenciales para equilibrar mi balanza laboral/social.

A mis compañeros del Máster Interuniversitario en Genética y Biología Molecular: Patricia, Estela, Miguel Ángel, Marta y Sergio, una etapa sin duda inspiradora, compartiendo inquietudes investigadoras y vitales.

A las amistades que se generaron en la universidad: Alejandra, Javi, Aaron, Lex, Eduardo, Carmen, Miguel, Isra y Pablo, nuestros caminos divergen, pero nuestras reuniones de patatas bravas convergen.

A mis amigos del instituto Julio y Edu y del colegio Garçon y Serch, no dejo de asombrarme de hace cuánto que nos conocemos, y de lo mucho que seguimos compartiendo. Gracias por todos estos años de ininterrumpida amistad.

A Álvaro Tascón, mi profesor de piano, y a Antonio Contreras, mi profesor de física y química del colegio, a quienes debo agradecer el haber llegado hasta este punto, ya que fuisteis de las primeras personas que me despertaron motivación científica.

Y por supuesto gracias a mi familia por todos sus ánimos durante este proyecto y el cariño que me transmiten siempre, y en especial a mis padres, Itaru y Anabel, quienes me criaron y educaron para ser todas las facetas de la persona que escribe estas líneas.

A mi familia política, José Luis, Maite, María Elena, Fernando y especialmente a Marga, por todo el ánimo transmitido y por su afecto durante todos estos años.

Y finalmente, a Patricia, mi compañera de viaje vital. ¡Qué bien que seamos de campos parecidos y hayamos podido ayudarnos y compartir además nuestra etapa doctoral! Gracias por tu estímulo, por motivarme cada día y por construir juntos un proyecto de vida.

Gracias a todos por hacer posible este sueño.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN	19
1. El envejecimiento.....	21
1.1. Definición	22
1.2. Edad biológica	24
1.3. Marcadores de envejecimiento	26
1.3.1. Genéticos.....	26
1.3.2. Epigenéticos	27
1.3.3. Bioquímicos y Fisiológicos.....	28
1.3.4. Sistemas homeostáticos.....	28
1.4. Teorías del envejecimiento	31
1.4.1. Deterministas.....	31
1.4.2. Estocásticas	33
1.4.3. Evolutivas.....	40
1.4.4. Respuesta al cómo, dónde y por qué del envejecimiento.....	41
1.5. El estrés oxidativo en el envejecimiento.....	41
1.5.1. Oxidantes no enzimáticos.....	43
1.5.2. Oxidantes enzimáticos.....	45

1.5.3. Antioxidantes no enzimáticos	47
1.5.4. Antioxidantes enzimáticos	50
1.5.5. Oxidantes y antioxidantes en el sistema inmunitario	51
2. Cambios en los sistemas homeostáticos durante el envejecimiento.....	54
2.1. Sistema Endocrino	54
2.2. Sistema Nervioso	54
2.3. Sistema Inmunitario. Inmunosenescencia.....	56
2.3.1. La inmunidad innata y adquirida.....	57
2.3.2. La inmunosenescencia.....	61
2.4. Comunicación neuroinmunoendocrina	70
2.4.1. La comunicación neuroinmunoendocrina en la respuesta al estrés y el envejecimiento	72
3. Diferencias entre machos y hembras	76
3.1. Diferencias en modelos de predicción de longevidad.....	77
4. Nuevos marcadores de envejecimiento.....	79
4.1. Inserción de fragmentos de ADNmt en el genoma nuclear: la NUMTogénesis....	79
4.2. Inestabilidad genómica: los micronúcleos (MNs)	84
4.2.1. CBMN assay	87
4.2.2. Apoptosis.....	89
5. Enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento: enfermedad de Parkinson	92
5.1. α -Sinucleína y cuerpos de Lewy	93

5.2. Disfunción mitocondrial y ROS.....	94
5.3. Disfunción del Sistema Inmunitario	95
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	97
MATERIALES Y MÉTODOS.....	103
1. Material biológico.....	105
1.1. Humanos	105
1.2. Animales de experimentación.....	105
1.3. Líneas celulares.....	106
2. Reactivos y kits comerciales	107
3. Medios y soluciones	110
3.1. Medios comerciales	110
3.2. Medios preparados	110
4. Material de laboratorio y aparataje	112
4.1. Material de laboratorio.....	112
4.2. Aparataje	113
5. Diseños experimentales.....	115
5.1. Diseños experimentales en humanos	115
5.1.1. Participantes	115
5.1.2. Parámetros analizados	116
5.2. Diseños experimentales en ratones	116
5.2.1. Características de los ratones y condiciones de estabulación	116
5.2.2. Estudio conductual comparativo entre machos y hembras adultas	118

5.2.3. Parámetros analizados	118
5.2.4. Generación de nuevos modelos matemáticos de predicción de longevidad en machos.....	119
5.2.5. Estudio de nuevos marcadores de envejecimiento en hembras.....	119
6. Métodos	121
6.1. Colección de células sanguíneas periféricas y aislamiento de neutrófilos y linfocitos sanguíneos en muestras humanas.....	121
6.2. Obtención de leucocitos peritoneales en ratones	122
6.3. Pruebas conductuales en ratones.....	123
6.3.1. Laberinto en T	123
6.3.2. Laberinto en cruz elevado (EPM)	124
6.3.3. Tablero con agujeros (HB).....	126
6.4. Funcionalidad Inmunitaria	127
6.4.1. Capacidad de adherencia de neutrófilos y linfocitos de sangre periférica humana	128
6.4.2. Capacidad de quimiotaxis de fagocitos y linfocitos humanos y de ratón	129
6.4.3. Capacidad fagocítica de neutrófilos humanos y macrófagos de ratón	130
6.4.4. Capacidad proliferativa de linfocitos humanos y de ratón.....	131
6.4.5. Capacidad citotóxica NK	132
6.5. Estrés oxidativo.....	134
6.5.1. Actividad de glutatión reductasa (GR).....	134
6.5.2. Actividad de glutatión peroxidasa (GPx).....	136

6.5.3. Concentración de glutatión	138
6.5.4. Concentración de Malondialdehído (MDA)	139
6.6. Pruebas bioquímicas	140
6.7. Análisis y cuantificación de inserciones de fragmentos de ADNmt en el genoma nuclear.....	141
6.7.1. Obtención de suspensiones celulares enriquecidas en linfocitos T.....	141
6.7.2. Obtención de células en metafase mitótica.	141
6.7.3. Fijación.....	142
6.7.4. Obtención de la sonda para detectar secuencias mitocondriales.....	142
6.7.5. Obtención de las sondas para detectar secuencias (peri)centroméricas MaSat y MiSat.....	143
6.7.6. Secuenciación de los productos de amplificación.....	145
6.7.7. Marcaje con fluorescencia de las sondas.....	145
6.7.8. Hibridación in situ con fluorescencia (FISH)	145
6.7.9. Observación de las preparaciones y cuantificación de la fluorescencia.....	147
6.8. Test de micronúcleos (CBMN assay)	147
6.8.1. Cultivos celulares	148
6.8.2. Montaje de preparaciones de células binucleadas.....	148
6.8.3. Tinción de las preparaciones	148
6.8.4. Observación de las preparaciones	149
6.8.5. FISH en células BN con MN	151
7. Análisis estadísticos.....	153

RESULTADOS.....	155
1. Cambios en una serie de parámetros bioquímicos, de función inmunitaria, y estrés oxidativo, en un estudio longitudinal a lo largo del envejecimiento, en ratones macho de la cepa ICR-CD1.	157
1.1. Parámetros bioquímicos.....	157
1.1.1. Parámetros bioquímicos analizados en grupos de ratones, a cada edad, en función de la supervivencia de los animales a medio y largo plazo	159
1.2. Sistema Inmunitario	161
1.2.1. Función inmunitaria	161
1.2.2. Estado oxidativo.....	174
2. Desarrollo de modelos matemáticos predictivos de la longevidad para ratones adultos de la cepa ICR-CD1.....	187
2.1. Capacidad predictiva de parámetros bioquímicos, inmunitarios y oxidativos a lo largo de la edad en ratones macho	187
2.1.1. Bioquímica sanguínea	187
2.1.2. Función inmunitaria	188
2.1.3. Estado oxidativo	193
2.2. Construcción de modelos matemáticos de predicción de la longevidad en función de parámetros bioquímicos, inmunitarios y redox.....	194
2.2.1. Modelo de bioquímica sanguínea.....	195
2.2.2. Modelo de Función Inmunitaria	197
2.2.3. Modelo de estado Redox	199

2.2.4. Modelo combinado.....	201
2.3. Respuesta conductual en machos y hembras	203
2.3.1. Longevidad de hembras y machos	204
2.3.2. Conducta exploratoria en machos y hembras.....	205
2.3.3. Conducta de ansiedad en machos y hembras	207
2.3.4. Capacidad predictiva de parámetros conductuales en ratones macho y hembra a la edad adulta.....	210
2.3.5. Construcción de un modelo matemático de predicción de la longevidad en función de parámetros conductuales en ratones macho	215
3. Estudio de los parámetros genéticos “inserciones de ADNmt en el núcleo” y “frecuencia de MNs/NPBs” en linfocitos T peritoneales de ratones hembra de la cepa ICR-CD1 como posibles nuevos marcadores de edad biológica	222
3.1. Estudio de las inserciones de fragmentos de ADNmt en el genoma nuclear.....	222
3.1.1. Análisis de las secuencias amplificadas	222
3.1.2. Detección en el genoma nuclear y localización cromosómica de la secuencia mitocondrial 1841MT	223
3.1.3. Cuantificación la secuencia de ADNmt en el núcleo de linfocitos T en las distintas edades.....	225
3.2. Análisis de la frecuencia de MNs y NPBs	227
3.2.1. Frecuencia de MNs y NPBs	227
3.2.2. Células en apoptosis	230
3.2.3. Frecuencia de MNs con secuencias centroméricas	232

4. Función inmunitaria y estado oxidativo de células de sangre periférica humana en pacientes ancianos con enfermedad de Parkinson en fase temprana (fase II) y su comparación con individuos sanos de equivalente edad cronológica y con adultos sanos	234
4.1. Función Inmunitaria.....	234
4.2. Estrés Oxidativo.....	239
DISCUSIÓN	241
1. Cambios en una serie de parámetros bioquímicos, de función inmunitaria, y estrés oxidativo en un estudio longitudinal a lo largo del envejecimiento, en ratones macho de la cepa ICR-CD1.	243
1.1. Bioquímica sanguínea.....	243
1.2. Función inmunitaria	246
1.2.1. Capacidad quimiotáctica	247
1.2.2. Capacidad fagocítica	250
1.2.3. Capacidad linfoproliferativa.....	252
1.3. Estado oxidativo.....	256
1.3.1. Actividad glutatión peroxidasa y reductasa (GPx y GR)	256
1.3.2. Contenido de glutatión (GSH y GSSG)	258
1.3.3. Peroxidación lipídica (Malondialdehído, MDA)	261
2. Desarrollo de modelos matemáticos predictivos de longevidad para ratones macho adultos de la cepa ICR-CD1.....	264
2.1. Capacidad predictiva de parámetros bioquímicos, inmunitarios y oxidativos a lo largo del envejecimiento en ratones macho	264

2.2. Capacidad de predicción de parámetros bioquímicos, inmunitarios y redox	265
2.3. Construcción de modelos matemáticos de predicción	271
2.3.1. Modelo bioquímico	271
2.3.2. Modelo Inmunitario.....	272
2.3.3. Modelo Redox	274
2.3.4. Modelo Combinado.....	276
2.4. Diferencias conductuales entre machos y hembras	279
2.4.1. Conductas exploratorias	280
2.4.2. Conductas de ansiedad	281
2.5. Estudio de la capacidad predictiva basada en variables conductuales en ratones macho y comparación con datos equivalentes obtenidos en hembras.	284
2.5.1. Construcción del modelo matemático conductual	288
3. Estudio de parámetros citogenéticos “inserciones de ADNmt en el núcleo” y “frecuencia de MNs/NPBs” en linfocitos T peritoneales de ratones hembra de la cepa ICR-CD1 como posibles nuevos marcadores de edad biológica	292
3.1. Inserción de fragmentos de ADNmt en el ADNn (NUMTs).....	293
3.2. Frecuencia de micronúcleos (MNs)	297
4. Función inmunitaria y estado oxidativo de células de sangre periférica humana en pacientes mayores con enfermedad de Parkinson en fase temprana (fase II)	300
4.1. Inmunidad innata	300
4.2. Inmunidad adquirida	302
4.3. Estrés oxidativo.....	305

5. Resumen General de la Discusión	309
CONCLUSIONES.....	313
BIBLIOGRAFÍA.....	319
ANEXO.....	355

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNn/ADNmt	ADN nuclear/ADN mitocondrial
APC	Célula presentadora de antígeno
APC	Complejo promotor de la anafase
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
BA	Brazos abiertos
BC	Brazos cerrados
BCR	Receptor de células B
BHT	Hidroxitolueno butilado
BN	Célula binucleada
BSA	Albúmina de suero bovino
c.p.m.	Cuentas por minuto
CA	Catecolaminas
CAT	Enzima catalasa
CENP	Proteína centromérica
CBMN	Test de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (del inglés “ <i>Cytokinesis-Block MN Assay</i> ”)
CLS	Esperanza de vida cronológica (del inglés “ <i>Chronological life span</i> ”)
ConA	Concanavalina A
COX	Enzima ciclooxygenasa
Cyt-B	Citocalasina B
DA	Dopamina
DAMP	Patrón molecular asociado a daño (del inglés “ <i>damage-associated molecular pattern</i> ”)
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetil sulfóxido

EF	Eficacia fagocítica
ENPAM	Ratones no prematuramente envejecidos excepcionales (del inglés “ <i>exceptional non-prematurely ageing mice</i> ”)
EP/EPII	Enfermedad de Parkinson/Enfermedad de Parkinson en fase II
EPM	Laberinto en cruz elevado (del inglés “ <i>elevated plus maze</i> ”)
FISH	Hibridación <i>in-situ</i> con fluorescencia
fMLP	Péptido formilado (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina)
FrMT	Fluorescencia relativa del fragmento de ADNmt 1841MT sobre la fluorescencia de MiSat
GC	Glucocorticoides
GPx	Enzima glutatión peroxidasa
GR	Enzima glutatión reductasa
GSH	Glutatión reducido
GSSG	Glutatión oxidado
HB	Tablero con agujeros (del inglés “ <i>hole board</i> ”)
HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
HP1	Proteína de heterocromatina 1 alpha
IA	Índice de adherencia
IF	Índice fagocítico
IL	Interleukina
ILC	Células linfocíticas innatas (del inglés “ <i>innate lifocitic cells</i> ”)
IQ	Índice de quimiotaxis
LDH	Enzima lactato deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MaSat	Secuencia de ADN satélite mayor (del inglés “ <i>major satellite</i> ”)
MDA	Malondialdehído
MiSat	Secuencia de ADN satélite menor (del inglés “ <i>minor satellite</i> ”)
MN	Micronúcleo
MLR	Regresión lineal múltiple
NADP ⁺	Nicotina adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotina adenina dinucleótido fosfato reducido

NB	Protrusión nuclear (del inglés “ <i>Nuclear Bud</i> ”)
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés “ <i>nuclear factor kappa-light - chain-enhancer of activated B cells</i> ”)
NHEJ	Unión de extremos no homólogos (del inglés “ <i>Non-Homologous End Joining</i> ”)
NK	Células asesinas naturales (del inglés “ <i>natural killer</i> ”)
NO	Óxido nítrico
Nox	Enzima NADPH oxidasa
NPAM	Ratón no prematuramente envejecido (del inglés “ <i>non-prematurely ageing mice</i> ”)
NPB	Puente nucleoplásmico
NUMT	ADN mitocondrial nuclear (del inglés “ <i>NUclear MiTochondrial DNAs</i> ”)
OIS	Senescencia inducida por oncogenes (del inglés “ <i>oncogene induced senescence</i> ”)
OPT	o-ftalaldehído
PAM	Ratones prematuramente envejecidos (del inglés “ <i>prematurely ageing mice</i> ”)
PC	Plataforma central
PCD	Muerte celular programada (del inglés “ <i>programmed cell death</i> ”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHA	Fitohemaglutinina
Placas MIF	Placa de factor de inhibición migratorio de macrófagos (del inglés “ <i>macrophage migration inhibitor factor</i> ”)
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados (del inglés “ <i>poly-unsaturated fatty acids</i> ”)
RNS	Especies reactivas de nitrógeno (del inglés “ <i>reactive nitrogen species</i> ”)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés “ <i>reactive oxygen species</i> ”)
SAC	Complejo de ensamblaje del huso (del inglés “ <i>Spindle Assembly Complex</i> ”)
SAM	Eje simpático-adreno-medular
SNC	Sistema nervioso central

SNP	Polimorfismo de nucleótido único
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SOD	Enzima superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCR	Receptor de células T
TE	Elemento transponible
TGF	Factor de crecimiento transformante (del inglés “ <i>transforming growth factor</i> ”)
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés “ <i>tumor necrosis factor</i> ”)
TrR	Enzima tiorredoxina reductasa
TrX	Tiorredoxina
XO	Enzima xantina oxidasa

RESUMEN

Marcadores de envejecimiento cronológico y patológico

El envejecimiento es un proceso universal, intrínseco, progresivo y deletéreo caracterizado por la pérdida general de la función del organismo y la menor capacidad de adaptación a los cambios, esto es, por una peor homeostasis lo que se acompaña de mayor morbilidad y mortalidad. El envejecimiento presenta una alta heterogeneidad interindividual, por la que los individuos de un mismo grupo, con igual edad cronológica, no estarán envejeciendo a la misma velocidad, es decir, tendrán diferente “edad biológica”, siendo ésta mejor estimador que la edad cronológica de cómo está envejeciendo cada individuo y de su esperanza de vida.

La teoría de la oxidación-inflamación postula que el envejecimiento sería resultado de un estrés oxidativo e inflamatorio crónicos que afectaría a todas las células del organismo, pero que sus consecuencias serían mayores en los sistemas homeostáticos (nervioso, endocrino e inmunitario). Además, el sistema inmunitario, por su característica de liberar compuestos oxidativos e inflamatorios para llevar a cabo su función, podría modular el estrés oxidativo-inflamatorio del organismo y consecuentemente la velocidad a la que se produce el envejecimiento.

El estado funcional de las células inmunitarias, considerado el mejor marcador de salud de un individuo, cambia a lo largo del envejecimiento. Esta inmunosenescencia, ha sido analizada por nuestro grupo tanto en humanos como en animales de experimentación, y los resultados han permitido, tras estudios longitudinales en ratones hembra de la cepa ICR-CD1, obtener modelos matemáticos de predicción de esperanza de vida, en los que se considera una serie de funciones de los leucocitos peritoneales. También, parámetros de estrés oxidativo en esas células inmunitarias, así como los conductuales, han permitido obtener otros modelos de predicción en hembras. No obstante, debido a su agresividad,

no se ha abordado ese tipo de estudios en este sexo, y es conocido el dimorfismo sexual en los sistemas fisiológicos, especialmente en los homeostáticos.

En la búsqueda de nuevos marcadores que permitan estimar la edad biológica, dos candidatos genéticos prometedores son las inserciones de ADN mitocondrial en el ADN nuclear y la frecuencia de alteraciones debidas a la inestabilidad cromosómica, como son la aparición de micronúcleos y puentes nucleoplásmicos durante la mitosis.

La segunda enfermedad neurodegenerativa asociada al envejecimiento más prevalente, después del Alzheimer, es la enfermedad de Parkinson. Debido a la dificultad de su diagnóstico temprano, se han realizado pocos estudios en pacientes en los primeros estadios (fase II) de la enfermedad, y en particular analizando el deterioro que se produce en su sistema inmunitario. El estudio de marcadores tempranos del desarrollo de esta patología puede ayudar en la comprensión y prevención del deterioro funcional de estos pacientes.

Por todo lo expuesto, los objetivos propuestos en la presente tesis fueron:

1^{er} objetivo: Analizar los cambios en una serie de parámetros bioquímicos, de función inmunitaria, y estrés oxidativo, en un estudio longitudinal a lo largo del envejecimiento, en ratones macho ICR-CD1.

2º objetivo: Generar modelos matemáticos de predicción de esperanza de vida a partir de datos obtenidos en los parámetros bioquímicos, de función inmunitaria, estado redox, y combinación de estos, en la edad adulta de ratones macho ICR-CD1, y comprobar su capacidad predictiva de la longevidad.

3^{er} objetivo: Estudiar las diferencias, en la edad adulta, entre ratones macho y hembra en parámetros conductuales, y determinar la capacidad predictiva del correspondiente modelo matemático generado, estableciendo comparaciones con lo obtenido en hembras.

4° objetivo: Estudiar los parámetros citogenéticos: “inserciones de ADNmt en el núcleo” y “frecuencia de MNs y NPBs” en linfocitos T peritoneales de ratones hembra de la cepa ICR-CD1 como posibles nuevos marcadores de edad biológica.

5° objetivo: Analizar la función inmunitaria y estado oxidativo de células de sangre periférica de pacientes mayores en fase temprana (fase II) de la enfermedad de Parkinson y establecer comparaciones con individuos sanos de equivalente edad cronológica, así como con adultos sanos.

Con los resultados obtenidos en los diferentes objetivos se generaron una serie de conclusiones que se pueden resumir en las siguientes:

1. A lo largo del envejecimiento, los ratones macho de la cepa ICR-CD1 experimentan algunos cambios en su bioquímica sanguínea, así como en la función inmunitaria y estado redox de sus leucocitos peritoneales. Tales cambios muestran grandes desviaciones interindividuales y pocas diferencias estadísticamente significativas, a diferencia de lo comprobado en hembras.
2. Se han desarrollado modelos matemáticos para estimar la longevidad de ratones macho mediante los datos de bioquímica sanguínea, función inmunitaria y estrés oxidativo, así como un modelo que combina parámetros anteriores. Estos modelos aportan una explicación de la varianza del 14,5%; 22,7%; 41,0% y 48,6%, respectivamente. Los parámetros que seleccionan los modelos no son idénticos a los de hembras, y la capacidad de predicción de los modelos obtenidos es muy inferior a la previamente conseguida para las hembras.
3. Los ratones de la cepa ICR-CD1 se diferencian significativamente en función de su sexo en las pruebas conductuales del laberinto en T, el laberinto en cruz elevado y el tablero con agujeros, tendiendo los machos a mostrar un mayor número de conductas relacionadas con la ansiedad. El modelo matemático previamente

publicado para la predicción de la longevidad a partir de datos conductuales de hembras de esta cepa no resultó óptimo para aplicarlo en machos. Se ha generado un nuevo modelo empleando datos conductuales de machos que fue capaz de explicar un 63,6% de la varianza observada.

4. Al avanzar el envejecimiento, en linfocitos T peritoneales de hembras ICR-CD1, se aprecia una creciente abundancia relativa de inserciones de fragmentos de ADN mitocondrial en el ADN nuclear y un aumento de la frecuencia de alteraciones cromosómicas, como es la presencia de micronúcleos y puentes nucleoplásmicos en células binucleadas. Además, la correlación positiva entre ambos fenómenos sugiere una posible relación entre ellos. Se proponen estas determinaciones como nuevos posibles marcadores de edad biológica.
5. En pacientes de Parkinson en fase II se observa, en comparación con controles sanos de edad similar, mayores concentraciones de oxidantes (glutación oxidado y peróxidos lipídicos) y menor actividad de enzimas antioxidantes, además de una inmunosenescencia acelerada en funciones de la inmunidad adaptativa, como la proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos.

ABSTRACT

Ageing is a universal, intrinsic, progressive and deleterious process characterized by the general loss of organismal function and by a reduced ability of adaptation to changes, *i.e.* a worse homeostasis maintenance, which is accompanied by increased morbidity and mortality. Ageing is characterized by a high individual heterogeneity, by which members of the same group, with the same chronological age, don't necessarily display the same rate of ageing, also termed "biological age", which proves to be a better estimator of how the individual is ageing and of its life expectancy, than the chronological age.

The theory of oxidation-inflammation postulates that ageing would be the result of chronic oxidative and inflammatory stress that would affect all cells in the body, but that its consequences would be greater in homeostatic systems (nervous, endocrine and immune). In addition, the immune system, due to its characteristic releasing of oxidative and inflammatory compounds to perform its function, could modulate the oxidative-inflammatory stress of the body and consequently the rate at which ageing occurs.

The functional state of immune cells, considered the best health marker of an individual, changes throughout ageing. This immunosenescence has been analyzed by our group in both humans and experimental animals, and the results have allowed, after longitudinal studies in female mice of the ICR-CD1 strain, to obtain mathematical models of life expectancy prediction, in which a series of functions of peritoneal leukocytes are considered. Also, oxidative stress parameters in those immune cells, as well as behavioral ones, have allowed to obtain other prediction models in females. However, given their aggressiveness, such studies in this sex have not been addressed, and sexual dimorphism is known in physiological systems, especially in homeostatic ones.

In the search for new markers to estimate biological age, two promising genetic candidates are mitochondrial DNA insertions into nuclear DNA and the frequency of

alterations due to chromosomal instability, such as the appearance of micronuclei and nucleoplasmic bridges during mitosis.

The second most prevalent neurodegenerative disease associated with ageing, after Alzheimer's, is Parkinson's disease. Due to the difficulty of early diagnosis, few studies have been conducted in patients at early stages (phase II) of the disease, and in particular by analyzing the deterioration that occurs in their immune system. The study of early markers of the development of this pathology can help in understanding and preventing the functional deterioration of these patients.

For all the above, the objectives proposed in this thesis were:

1st objective: To analyze changes in several biochemical, immune function, and oxidative stress parameters, in a longitudinal study throughout ageing, in male ICR-CD1 mice.

2nd objective: To generate mathematical models of life expectancy prediction from data obtained in biochemical, immune function, redox state parameters, and combination of these, in the adulthood of male ICR-CD1 mice, and check their predictive capacity on longevity.

3rd objective: To study the differences, in adulthood, between male and female mice in behavioral parameters, and determine the predictive capacity of the corresponding mathematical model generated, establishing comparisons with the results obtained in females.

4th objective: To study cytogenetic parameters: "insertions of mtDNA into the nucleus" and "frequency of MNs and NPBs" in peritoneal T cells of female mice of the ICR-CD1 strain as possible new markers of biological age.

5th objective: Analyze the immune function and oxidative status of peripheral blood cells of early-stage (phase II) elderly patients of Parkinson's disease and establish

comparisons with healthy individuals of equivalent chronological age, as well as with healthy adults.

With the obtained results in the different objectives a series of conclusions were drawn which can be summarized in the following:

- During ageing, ICR-CD1 strain male mice develop some changes in blood biochemistry, immune function and oxidative stress parameters. These changes show great interindividual variability and few statistically significant differences, compared to the ones previously observed in females.
- Mathematical models have been developed to estimate the longevity of male mice using data from blood biochemistry, immune function and oxidative stress, as well as a model that combines those previous parameters. These models provide an explanation of the variance of 14.5%; 22.7%; 41.0% and 48.6%, respectively. The parameters selected by the models are not identical to those of females, and the predictability of the obtained models is much lower than previously achieved for females.
- Mice of the ICR-CD1 strain differ significantly based on their sex in T-maze behavioral tests, elevated plus maze and hole board, tending males to exhibit a greater number of anxiety-related behaviors. The mathematical model previously published for predicting longevity from behavioral data of females of this strain was not optimal for application in males. A new model has been generated using male behavioral data that was able to explain 63.6% of the observed variance.
- As aging progresses, in peritoneal T cells of ICR-CD1 females, there is a growing relative abundance of mitochondrial DNA fragment insertions into

nuclear DNA and an increase in the frequency of chromosomal alterations, such as the presence of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated cells. In addition, the positive correlation between the two phenomena suggests a possible relationship between them. These determinations are proposed as new possible markers of biological age.

- In Parkinson's patients in phase II, compared to age-matched healthy controls, higher concentrations of oxidizers (oxidized glutathione and lipid peroxides) and lower antioxidant enzyme activities are found, as well as an accelerated immunosenescence in adaptive immunity functions, such as the proliferation of lymphocytes in response to mitogens.

INTRODUCCIÓN

1. El envejecimiento

La esperanza de vida (“*lifespan*”), o longevidad media, es definida como la media de tiempo de vida de los miembros de una población que han nacido en la misma fecha. En el ser humano, esa longevidad ha aumentado desde mediados del siglo pasado, debido a las mejoras higiénicas, nutricionales y sanitarias, particularmente en los países industrializados.

Se estima que la población mayor de 80 años se triplicará para el año 2050 (Troen, 2003; Belsky *et al.*, 2015). Esto, unido a un descenso de la natalidad, está causando el aumento de la población anciana y una inversión en la pirámide poblacional (United Nations, Department of Economic and Social Affairs & United Nations, 2020).

Concretamente, España alcanza ya los 83 años de esperanza de vida en su población total (80 en hombres y 86 en mujeres) y se estima que la población mayor de 65 años, que en la actualidad es del 19,6%, para 2050 se encontrará en torno al 40% de la población total (INE, 2020; United Nations, 2020).

Este aumento de la longevidad media, no se acompaña de un aumento de la longevidad máxima, definida como la esperanza de vida máxima que pueden alcanzar los individuos por pertenecer a una determinada especie. Esta longevidad tiene un valor fijo e invariable para cada especie, y es, por ejemplo, de unos 120 años en el ser humano y de unos 3 años en los ratones.

La longevidad media estaría influida por determinantes ambientales y genéticos en una proporción 75:25, respectivamente (Kirkwood, 2008, 2017; De la Fuente & Miquel, 2009) y, aunque estos determinantes se pudieran controlar, se estima que sólo se aumentaría la longevidad media en aproximadamente 10 años, pero no afectaría a la longevidad máxima (Roush, 1996).

Teniendo en cuenta que el envejecimiento es un importante factor de riesgo para la mayoría de las enfermedades (WHO, 2018), existe un gran interés por conocer los mecanismos que subyacen a este proceso y desarrollar estrategias que ayuden a aumentar la longevidad y la calidad de vida y, así, permanecer el mayor tiempo posible en condiciones de salud (“*healthspan*”) (Seals *et al.*, 2016; Palliyaguru *et al.*, 2019).

1.1. Definición

Aunque intuitivamente se pueda entender envejecer como una consecuencia del paso del tiempo, dar una definición concreta resulta bastante más complejo y se conoce poco acerca de sus causas. Esto se debe, en parte, a la dificultad de disociar los cambios fisiológicos que se dan asociados a la edad, del envejecimiento *per se*.

En 1977, el gerontólogo Bernard Louis Strehler estableció 4 características básicas del envejecimiento: 1) es un proceso **universal** (ocurre en todos los organismos pluricelulares y con reproducción sexual); 2) sus causas son **intrínsecas** al individuo (ocurre hasta en las mejores condiciones); 3) se da de manera **progresiva** (el deterioro de las funciones biológicas se produce a lo largo de este proceso) y 4) es **deletéreo** (se asocia con aumento de la morbilidad y lleva a la mortalidad del individuo) (Strehler, 1977).

En general, el envejecimiento conlleva “*cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales, que ocurren de manera progresiva y generalizada en nuestras células y tejidos, que conducen a una menor capacidad de adaptación y propician la pérdida progresiva de la homeostasis del organismo*”, aumentando así la morbilidad y mortalidad, hasta ocasionar su muerte (De la Fuente & Miquel, 2009).

Aunque clásicamente se ha llamado homeostasis a la capacidad fisiológica del organismo a reaccionar a los cambios que suceden en el ambiente externo e interno, “*equilibrio homeodinámico*” u “*homeocinesis*” serían términos más correctos, puesto que un equilibrio estático, como indica el sufijo “-stasis”, es incompatible con la vida. Lo que

existe es un equilibrio dinámico que se auto-regula constantemente (Yates, 1994; Rattan, 2019).

El envejecimiento es por tanto un proceso natural y fisiológico que afecta a todos los niveles del organismo y se manifiesta principalmente por una pérdida de la capacidad reguladora, lo que caracteriza a la mayoría de los llamados “*Hallmarks*” del envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2013; Franceschi *et al.*, 2018a). Este proceso se inicia en la edad adulta, en la década de los 20 años en el ser humano (Bae *et al.*, 2008). Aunque dada su característica de disminuir el mantenimiento de la homeostasis y por tanto asociarse con una mayor morbilidad, no debe considerarse un proceso patológico, pues ocurre en la totalidad de la población.

Una característica importante del envejecimiento es su **heterogeneidad**. En este contexto se puede distinguir la heterogeneidad intraindividual, ya que no todos los tejidos, órganos y sistemas de un mismo individuo se afectan al mismo ritmo, y la heterogeneidad interindividual, pues no todos los individuos de una población, aunque tengan la misma edad cronológica, tienen la misma velocidad de envejecimiento. Estas diferencias estarían causadas por los factores genéticos y epigenéticos, pero también por factores ambientales y de estilo de vida, por lo que la longevidad quedaría disociada de la edad cronológica (Finkel *et al.*, 1995).

Debido a esta heterogeneidad, la edad cronológica no parece ser buen indicador de la tasa de envejecimiento puesto que la velocidad a la que se produce no sería constante para todos los individuos ni en todos los momentos de nuestra vida. Por este motivo, se propone el concepto de “**Edad biológica**”.

1.2. Edad biológica

En 1969 Comfort propuso el concepto de “edad biológica” (Comfort, 1969), que estima el estado general de salud y la velocidad de envejecimiento de un individuo en comparación con aquellos de su misma edad cronológica. En otras palabras, si se comparan dos individuos con la misma edad cronológica, aquel que presente mejor estado de salud tendrá una menor edad biológica, estimándose diferente esperanza de vida para cada uno (Borkan & Norris, 1980).

Sin embargo, al contrario que la edad cronológica, no es sencillo medir la edad biológica. A pesar de las numerosas propuestas que ha habido, todavía no se ha alcanzado un consenso en los marcadores que permitan medirla de forma precisa y correcta (Borkan & Norris, 1980; Bae *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2010; Belsky *et al.*, 2015).

Por ello, uno de los objetivos de la gerontología es determinar parámetros que permitan evaluar esa edad biológica. Para lo que es necesario:

- El uso de biomarcadores genéticos, bioquímicos, fisiológicos y psicológicos que sufran alteraciones en función de la edad.
- Que los individuos longevos tengan valores de estos marcadores similares a los de adultos sanos.
- Que estos marcadores sirvan como pronóstico de longevidad del individuo y que no indiquen únicamente el avance de la edad

En este sentido, el estudio más completo hasta la fecha ha sido el realizado por Borkan y Norris, en el que analizaban los cambios en 24 parámetros fisiológicos medidos a lo largo de 20 años en más de 1000 participantes de edades comprendidas entre los 17 y los 102 años. De entre los parámetros que observaron, seleccionaron aquellos que mostraban valores mayores o menores que la media de los individuos con la misma edad cronológica, y que correlacionaban con una mayor o menor longevidad. Además, los

examinadores también hicieron evaluaciones subjetivas de la edad que aparentaban los participantes y tendían a coincidir con los valores objetivos observados en estos marcadores (Borkan & Norris, 1980).

Tradicionalmente, los cambios que tienen lugar en el organismo se han estudiado transversalmente, comparando grupos de individuos de distintas edades. En contraposición, existen los acercamientos longitudinales, en los que se sigue a los mismos individuos en diferentes etapas de su vida y se puede analizar de manera más detallada si las variaciones que se observan son debidas al envejecimiento en sí mismo. Debido a la heterogeneidad interindividual, existe una necesidad de realizar estudios de manera longitudinal y así observar la deriva de las funciones analizadas de manera individualizada (Derhovanessian *et al.*, 2009).

Una de estas investigaciones longitudinales más ambiciosas fue la realizada por Belsky y colaboradores. En este trabajo se midieron parámetros cardiovasculares, metabólicos, inmunitarios, renales, hepáticos, respiratorios y de salud dental de 954 sujetos a los 26, 32 y 38 años. Aunque la mayoría de los estudios gerontológicos longitudinales se suelen realizar en sujetos de edades avanzadas, con esta investigación se demostró que importantes diferencias en la edad biológica podían ser detectadas en momentos tempranos del envejecimiento. Esto permitía poder diseñar estrategias y tratamientos para adultos jóvenes que pudieran tener un mayor y más duradero impacto sobre su tasa de envejecimiento, así como prevenir y tratar enfermedades crónicas (Belsky *et al.*, 2015).

Sin embargo, los estudios longitudinales en humanos son difíciles y costosos debido a la elevada longevidad de nuestra especie, por lo que para validar marcadores de edad biológica son más comunes y asequibles los experimentos en animales de menor esperanza de vida, como ratas o ratones.

1.3. Marcadores de envejecimiento

1.3.1. Genéticos

La existencia de genes que afectan a la longevidad es conocida desde hace décadas, bien sea por mutación, o por tratamiento farmacológico (Kenyon *et al.*, 1993; Blagosklonny, 2007; Kanfi *et al.*, 2012; López-Otín *et al.*, 2013), estos genes, denominados “gerontogenes” (Rattan, 1995), afectarían al envejecimiento alterando la velocidad de éste (De la Fuente, 2009, 2019a).

Se han empleado diferentes variables genéticas como marcadores de envejecimiento. Entre los más conocidos se encuentra la longitud telomérica. Los telómeros están constituidos por secuencias genéticas repetidas en los extremos de los cromosomas que se ven acortados en las sucesivas divisiones celulares (Blasco, 2007). Si bien se ha observado una tasa constante de acortamiento de los telómeros con la edad en cultivos *in vitro*, no ocurre así *in vivo*, donde es frecuente encontrar variabilidad por el tipo de tejido. Además, la velocidad a la que se acortan los telómeros no es constante a lo largo del tiempo y pueden verse implicados factores patológicos o psicológicos, lo que dificulta su uso para la correcta determinación de la edad biológica del individuo (Wright *et al.*, 1996; Saeed *et al.*, 2012; Srettabunjong *et al.*, 2014; Zhang, 2017).

Otro método genético de determinación de la edad se basa en la exposición a estímulos inmunogénicos que ha tenido el organismo. Los linfocitos *naive* del sistema inmunitario adaptativo, al verse expuestos a antígenos sufren una reorganización genética de sus receptores, que genera fragmentos circulares del ADN escindido (Breit *et al.*, 1997). Zubakov y colaboradores analizaron muestras de sangre de 195 sujetos de edades comprendidas entre los 0 y los 80 años, y mediante la cuantificación de estos fragmentos, se observó una correlación lineal, robusta y reproducible entre la abundancia de estas secuencias y la edad de los participantes (Zubakov *et al.*, 2010).

Por otra parte, los microARNs (tránscritos cortos no codificantes que regulan la expresión de otros genes) se han descrito como medio de diagnóstico poco invasivo, principalmente en estudios de cáncer, y se está empezando a valorar su utilidad como marcadores de edad biológica. Hooten y colaboradores en 2013 describieron que los niveles de algunos microARNs disminuyen con la edad. La relevancia de estos microARNs estaría en su papel regulador de numerosas citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α , y antiinflamatorias como TGF- β e IL-10 (Hooten *et al.*, 2013). Recientemente, se ha descubierto la regulación de genes implicados en la biogénesis de microARNs cuya expresión disminuye con la edad. Se ha visto que individuos centenarios con buena salud mantienen niveles similares a los de los adultos, y diferentes de los de octogenarios (Serna *et al.*, 2012; Borrás *et al.*, 2017). Todo esto sugeriría la importancia del mantenimiento de la biosíntesis de microARNs como mecanismo para el envejecimiento saludable.

1.3.2. Epigenéticos

La epigenética es el estudio de modificaciones reversibles en la expresión génica que no están causadas por la variación de la secuencia del ADN. Uno de los marcadores epigenéticos más relevante es la metilación del ADN, que induce silenciamiento de genes. Esta metilación se ve alterada durante el envejecimiento con hipometilaciones generalizadas e hipermetilaciones puntuales (Fraga & Esteller, 2007). Horvath realizó en 2013 un metaanálisis de datos de secuenciación de metilación de ADN de distintos tejidos y edades, del que obtuvo 353 marcadores de metilación que llamó “*epigenetic clock*” y que permitía la estimación de la edad biológica del sujeto donante (Horvath, 2013; Horvath & Raj, 2018).

1.3.3. Bioquímicos y Fisiológicos

Se han propuesto, también, una serie de marcadores bioquímicos y fisiológicos como posibles marcadores de envejecimiento y edad biológica. Entre los más clásicos y asequibles se encuentran los de la capacidad respiratoria (la capacidad vital y la capacidad espiratoria forzada), la presión arterial, el hematocrito (Comfort, 1969), la fuerza de agarre, la tasa metabólica basal y la concentración de moléculas como albúmina o colesterol (Nakamura & Miyao, 2007), todos ellos correlacionados fuertemente con la edad (Borkan & Norris, 1980; Belsky *et al.*, 2015). Si bien estos marcadores reflejarían el avance del envejecimiento, no se ha podido demostrar si son causa o consecuencia del mismo.

1.3.4. Sistemas homeostáticos

Los sistemas homeostáticos (sistema nervioso, endocrino e inmunitario) sufren un deterioro durante el envejecimiento, el cual puede ser relacionado directamente con el aumento de la morbilidad y mortalidad al envejecer (Chahal & Drake, 2007; De la Fuente, 2019a).

Algunos autores han propuesto parámetros del sistema endocrino como marcadores de velocidad de envejecimiento en ratones y en humanos, tales como niveles de diversas hormonas en sangre (Bae *et al.*, 2008). Respecto al sistema nervioso, otras investigaciones relacionan su capacidad funcional con la esperanza de vida. Por ejemplo, ratas con aversión a espacios nuevos (neofobia), tienen longevidades significativamente menores que las de los animales que no presentan esa aversión (Cavigelli & McClintock, 2003). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha desarrollado un modelo de envejecimiento prematuro que diferencia ratones en “lentos” o PAM (del inglés, *Prematurely Aging Mice*) y “rápidos” o ENPAM (del inglés, *Excepcionaly Non Prematurely Aging Mice*) por el tiempo empleado en recorrer el brazo largo de un

“laberinto en T”. En los PAM adultos, se aprecia un fenotipo de fragilidad y deterioros prematuros en variables neurológicas y conductuales (neuroquímica cerebral envejecida, neuroinflamación, menos capacidad exploratoria, y muestran ansiedad). También tiene características endocrinas, inmunitarias (inmunosenescencia), de estrés oxidativo e inflamatorio (en las células inmunitarias y en otros tejidos como cerebro, corazón o hígado), propias de ratones cronológicamente más viejos. Y los PAM tienen menor esperanza de vida que los ENPAM de idéntica edad cronológica (Guayerbas *et al.*, 2002; Alvarado *et al.*, 2006; Viveros *et al.*, 2007; De la Fuente, 2008, 2010, 2014a; Vida *et al.*, 2014; Martínez de Toda *et al.*, 2016; De la Fuente, 2018a; Martínez de Toda *et al.*, 2018; De la Fuente, 2020; Garrido *et al.*, 2021).

Durante el envejecimiento tiene lugar una remodelación de la funcionalidad del sistema inmunitario, observándose en general una inmunosupresión, que conlleva un aumento de la susceptibilidad a infecciones y mayor predisposición a padecer enfermedades autoinmunes y neoplásicas (Fulop *et al.*, 2011; De la Fuente, 2020). La capacidad funcional del sistema inmunitario se plantea como un excelente marcador de salud, y algunas de las actividades de las células inmunitarias (como la quimiotaxis, la fagocitosis, la citotoxicidad NK y la respuesta proliferativa de los linfocitos) se han propuesto como marcadores de edad biológica y predictores de longevidad. Esto queda demostrado con la correlación positiva que se observa entre esas funciones inmunitarias bien conservadas y una alta longevidad, hecho que se ha comprobado en personas centenarias y ratones de gran longevidad, en los que los valores de tales funciones son muy similares a los que presentan los adultos. También puede demostrarse por el hecho de que los PAM adultos, antes comentados, con valores de esas funciones similares a los de ratones cronológicamente viejos presenten una esperanza de vida muy inferior a la de

los ENPAM de la misma edad (Arranz *et al.*, 2010b; Martínez de Toda *et al.*, 2016; De la Fuente, 2018a; Martínez de Toda *et al.*, 2020).

A lo largo de la vida se acumulan exposiciones a agentes patógenos, por lo que es esperable observar aumento de linfocitos de memoria en detrimento de linfocitos vírgenes o *naive*, que todavía no han sido expuestos a antígenos. Esto, junto con un alto cociente de células T CD8/CD4, una deficiente presentación antigénica o el descenso generalizado del número de linfocitos, se ha propuesto también como marcadores de envejecimiento en algunas cepas de ratones (Miller *et al.*, 1997; Pawelec *et al.*, 2002; DelaRosa *et al.*, 2006).

En lo referente a otro aspecto importante del sistema inmunitario, las citoquinas, muchos autores han observado que con el envejecimiento hay un aumento de las proinflamatorias y una disminución de las antiinflamatorias, habiéndose establecido una relación entre este balance y la fragilidad, e incluso mortalidad, de los individuos (Bagnara *et al.*, 2000; Brüünsgaard & Pedersen, 2003).

De esta manera, el sistema inmunológico tanto innato como adquirido, así como la red de citoquinas y parámetros oxidativos o inflamatorios, al hacer frente a un gran número de retos inmunológicos a lo largo del proceso vital, son candidatos ideales para la búsqueda de marcadores de edad biológica y predictores de longevidad (De la Fuente, 2014a).

Por todo lo indicado, se puede concluir que existen marcadores que permiten estimar la edad biológica, especialmente en el marco de la respuesta inmunológica. Con ellos se pueden desarrollar modelos matemáticos de predicción de la esperanza de vida de un sujeto (longevidad estimada). Estos modelos predictivos deben ser apropiados a cada fase del proceso de envejecimiento, ya que los predictores de longevidad sufren alteraciones a lo largo de la edad del individuo. Además, si consideramos que las

diferentes áreas del sistema inmunitario se complementan para hacer frente a infinidad de estímulos inmunogénicos, ningún modelo matemático predictivo de longevidad podrá ser generado teniendo en cuenta únicamente un marcador, sino que deberá combinar diferentes parámetros para alcanzar una fuerza predictiva suficiente (Pignolo, 2019).

1.4. Teorías del envejecimiento

El envejecimiento se manifiesta como el deterioro de múltiples factores, y por tanto las teorías que lo tratan están enfocadas a dar respuesta a cómo sucede, dónde comienza y por qué envejecemos. A lo largo de los años, han surgido más de 300 teorías inicialmente recogidas por Medvedev (Medvedev, 1990) y revisadas por otros autores (Mishara & Riedel, 2000; Barja, 2004; Miquel, 2006; De la Fuente, 2009, 2019a).

Las teorías que dan respuesta a “**Cómo sucede el envejecimiento**” se pueden clasificar en dos grandes grupos: las teorías deterministas y las teorías estocásticas.

1.4.1. Deterministas

Las teorías deterministas proponen que el envejecimiento forma parte de una programación genética, como la que controla el desarrollo, la maduración y la senescencia (Kanungo, 1975). Estas teorías están basadas en la observación de que los individuos longevos suelen tener descendencia igualmente longeva y en que la defunción de gemelos homocigóticos suele ocurrir en fechas cercanas (Kallman *et al.*, 1959).

Estas teorías recibieron un importante respaldo con el descubrimiento en 1965 del “límite de *Hayflick*” observado en fibroblastos *in vitro*. Éstos presentaban un número limitado de pases o duplicaciones, antes de entrar en senescencia replicativa, por lo que Leonard Hayflick propuso un “reloj endógeno” que imponía un número limitado de divisiones celulares en su “teoría del límite mitótico” (Hayflick, 1965).

Posteriormente se descubrió la existencia de los telómeros, y su acortamiento en sucesivas divisiones que lleva a la entrada de las células en senescencia replicativa. Según la “teoría del acortamiento de los telómeros” éstos constituirían ese “reloj mitótico” formulado por Hayflick (Olovnikov, 1973; Vaziri & Benchimol, 1996), viéndose una relación entre la longitud telomérica y la longevidad (Blasco, 2007; Boonekamp *et al.*, 2013).

Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, diversos factores podrían estar afectando a los telómeros de manera independiente a la edad (el estrés psicológico, y el estrés oxidativo e inflamatorio, entre otros) e incluso existen células cuyos telómeros pueden extenderse, mediante la sobreexpresión de la enzima telomerasa, que las capacita a ignorar el “límite de Hayflick” pudiendo dividirse de manera indefinida, hecho que sucede en las células cancerosas (Blasco, 2005; Zglinicki & Martin-Ruiz, 2005; Zhang *et al.*, 2018).

Algunos autores argumentarían además que, aunque todos los órganos y sistemas del organismo sufrirían los efectos del envejecimiento, ciertas células de tejidos postmitóticos no sufren ninguna división, y conservarían su longitud telomérica a lo largo de la vida del individuo. Además, las células con gran actividad telomerasa, como las células madre o las germinales no llegarían a envejecer y, como consecuencia, el límite telomérico no puede ser considerado el único causante del envejecimiento del organismo (Strehler, 1977; Goyns, 2002). Así, esta teoría únicamente explicaría la causa de la senescencia replicativa, ignorando los otros factores que pueden causar senescencia celular, como la radiación ionizante o la senescencia inducida por oncogenes (OIS, por sus siglas en inglés, *Oncogene Induced Senescence*), y en general no dan una explicación al envejecimiento propiamente dicho (Oliva *et al.*, 1997; De la Fuente, 2019a). Por todo ello, en 2007 el mismo Hayflick se retractó de esta teoría, basada únicamente en la

genética, afirmando que el envejecimiento sería consecuencia de acumulación de daño molecular de origen estocástico (Hayflick, 2007).

1.4.2. Estocásticas

En contraposición a las teorías deterministas surgen las teorías estocásticas o epigenéticas, que afirman que el envejecimiento es consecuencia de un proceso aleatorio de acúmulo paulatino, y a la larga irreversible, de daños moleculares, por motivos tanto endógenos como exógenos, en todos los niveles de organización biológica (macromoléculas, células, tejidos, órganos, sistemas...), independiente de una programación genética, si bien la genética afectaría a la hora de heredar medios más eficientes de mantenimiento de las funciones del organismo. Estas acumulaciones de desechos moleculares producirían una menor eficacia en los sistemas de reparación y una menor funcionalidad de los sistemas fisiológicos, que son condiciones características en el envejecimiento.

Entre ellas se encuentran la “teoría de acumulación de productos de desecho” (Sohal & Allen, 1990), la “teoría de los entrecruzamientos” (Björkstén, 1968) o la “teoría de las mutaciones somáticas” (Szilard, 1959).

1.4.2.1. Sistemas homeostáticos

Otras teorías estocásticas consideran la importancia de la acumulación de desechos específicamente en los sistemas homeostáticos y el efecto que esto tendría sobre el mantenimiento de la funcionalidad fisiológica y, por tanto, enfatizan el deterioro y la desregulación de estos sistemas con el envejecimiento como causa del mismo. Entre ellas se encuentran la teoría neuroendocrina y la inmunológica (Walford, 1969; Fabris, 1991; Strehler, 2000).

La “**teoría neuroendocrina**” se basa en el deterioro progresivo de los sistemas nervioso y endocrino con la edad (Fabris, 1991). Esta pérdida de funcionalidad celular se

hace patente por ejemplo en el deterioro cognitivo o en los cambios hormonales que se dan con el envejecimiento (Dilman, 1986; Mizoguchi *et al.*, 2009). Estos sistemas controlan importantes etapas de la vida, como el desarrollo temprano, el desarrollo reproductor y el metabolismo, y se ha observado que esta desregulación produce longevidades menores en animales de experimentación (Meites *et al.*, 1987; Troen, 2003).

La “**teoría inmunológica**” en cambio postula que el envejecimiento estaría causado por desregulación en las defensas del organismo, disminuyendo su resistencia a enfermedades (Walford, 1969). Por ejemplo, se puede observar una disminución de la respuesta de linfocitos T, así como una alteración de los cocientes de subpoblaciones a favor de los linfocitos de memoria, frente a los *naive* (Miller, 1996). También se produce una disminución generalizada de la respuesta inmunitaria humoral de los linfocitos B, mientras que aumenta la prevalencia de enfermedades autoinmunitarias con el envejecimiento (Troen, 2003; Ray & Yung, 2018).

Sin embargo, no todos los organismos cuentan con sistemas endocrino, inmunitario o nervioso definido, por lo que las teorías homeostáticas incumplirían el principio de universalidad propuesto por Strehler.

1.4.2.2. Radicales libres

Una de las teorías estocásticas más aceptadas por la cantidad de pruebas que se han aportado es la “teoría de la oxidación o de los radicales libres” propuesta inicialmente por Harman en 1956 y revisada posteriormente por otros autores (Harman, 1956; Miquel, 1992; Barja, 2013).

Químicamente, un “radical libre” es un compuesto inestable de corta vida media, que cuenta con al menos un electrón desapareado en su orbital más externo (Fridovich, 1978). Debido a que los electrones tienden a permanecer en parejas, estas especies presentan una alta capacidad de captar electrones de otros compuestos, oxidándolos en el

proceso. Según esta definición se considerarían radicales libres al radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) o el hidroxilo ($OH^{\cdot}$), mientras que otras especies oxidantes comunes como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no lo sería, por tener todos sus electrones apareados. Por esta razón, se les llama en su conjunto “especies reactivas de oxígeno” o ROS (del inglés “*Reactive Oxygen Species*”) (Larson, 1977).

Según esta teoría, los organismos aerobios, por su necesidad vital de uso de oxígeno producirían radicales libres altamente tóxicos y reactivos. De forma que el envejecimiento ocurriría por el inevitable uso de oxígeno y producción de ROS, que causarían daño oxidativo y acumulación progresiva de biomoléculas defectuosas, con la consiguiente pérdida funcional en células y tejidos (**Figura 1**). Así, esta teoría explica la acumulación, al avanzar la edad, de productos oxidados en la célula, como los gránulos de lipofuscina (Miquel *et al.*, 1978; Vida *et al.*, 2017). Toda una serie de observaciones apoyan esta teoría, como la correlación negativa entre el metabolismo basal, la producción mitocondrial de ROS o el estado de oxidación, con la longevidad de los organismos (De la Fuente & Miquel, 2009; Barja, 2013), así como el efecto beneficioso de la restricción calórica sobre el envejecimiento (Minor *et al.*, 2010) y la asociación de mayores cantidades de radicales libres con enfermedades propias de la edad (Brüünsgaard & Pedersen, 2003; Kattoor *et al.*, 2017).

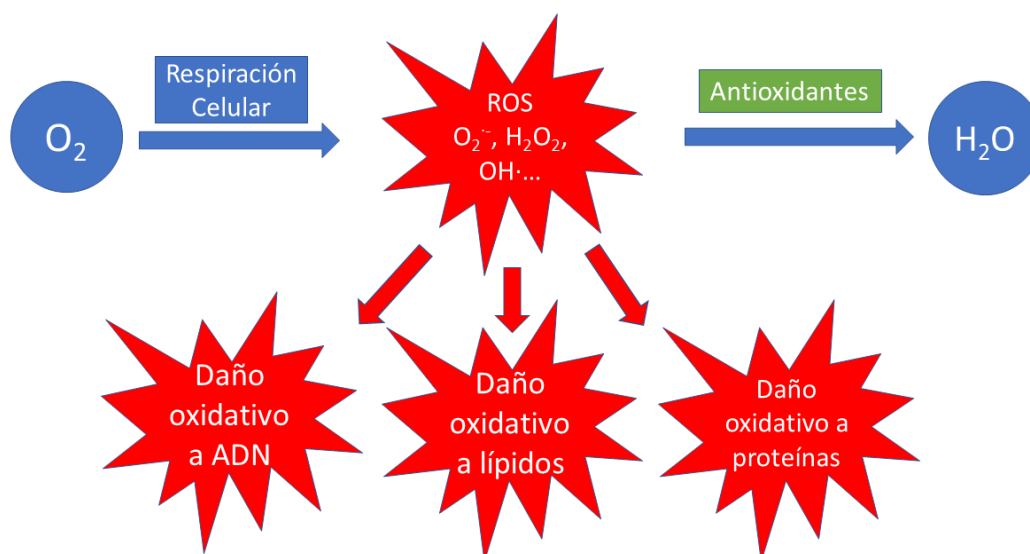


Figura 1. El oxígeno molecular se transforma en agua mediante la respiración celular. Esto produce ROS de manera colateral, provocando daño oxidativo a las macromoléculas del organismo (ADN, lípidos y proteínas)

Además, en las especies de mayor longevidad se ha visto una menor proporción de ácidos grasos insaturados, y por tanto una menor capacidad de oxidación de sus membranas, indicando una correlación entre la velocidad de envejecimiento y la resistencia a la oxidación en diversas especies animales (Pamplona & Barja, 2003).

1.4.2.3. Teoría mitocondrial

La teoría mitocondrial del envejecimiento, que se confirmaría y perfilaría desde principios de los años 80, surge a raíz de las evidencias sobre la implicación de la producción mitocondrial de ROS en el envejecimiento, completando la teoría de los radicales libres de Harman, y respondiendo a la pregunta de “**dónde comienza el envejecimiento**” (Harman, 1972; Miquel, 1998; Sanz *et al.*, 2005).

Se basa en los cambios que ocurren en este orgánulo subcelular con el envejecimiento, como el menor número de mitocondrias por célula, las alteraciones anatómicas de esas mitocondrias y la disminución de la eficiencia energética en favor de

una mayor producción de compuestos oxidantes en la respiración celular, siendo las mitocondrias las que más sufren los efectos de las ROS (Cino & Del Maestro, 1989).

Asimismo, la acumulación de daño oxidativo es más relevante en tejidos postmitóticos, ya que no pueden reponer las células, ni sus mitocondrias dañadas, ni “diluir” ese daño mediante las divisiones celulares. Así, las mitocondrias dañadas verán afectada su capacidad energética y, finalmente, las células y tejidos sufrirían una deficiencia energética con la edad, siendo esto el principal causante del envejecimiento de los organismos (Miquel, 1991; Terman *et al.*, 2010).

Otros factores mitocondriales que influyen en el envejecimiento son la composición de sus membranas en cuanto a la saturación de los enlaces lipídicos y la pérdida de electrones en la cadena respiratoria, que aumentaría el número de radicales generados (Barja, 2019). Esta pérdida de eficiencia en la cadena respiratoria mitocondrial aumentaría la producción de radical superóxido en un sistema que de manera basal genera un 1-2% de ROS del oxígeno consumido (McCord, 1993).

Entre las dianas más accesibles de las ROS se encuentra el ADN mitocondrial (ADNmt), que puede sufrir mutaciones o roturas de hebra simples o dobles, contribuyendo aún más a la pérdida de eficiencia energética y acelerando la generación de otras ROS (Crott *et al.*, 2005). Las mutaciones que se producen en el genoma mitocondrial, debido a su vulnerabilidad a los daños deletéreos de las ROS y a su menor eficiencia en los mecanismos de reparación, estarían implicadas por tanto en el peor funcionamiento mitocondrial que se observa durante el envejecimiento (Schon *et al.*, 2012; Sevini *et al.*, 2014).

Así, según esta teoría, las mitocondrias serían la causa, pero también la diana de las ROS y se justifica la relación inversa que existe entre la longevidad y la cantidad de daño oxidativo a su ADNmt en numerosas especies de mamíferos (Barja & Herrero, 2000).

Además, la restricción calórica, una intervención efectiva para aumentar la esperanza de vida en animales de experimentación, reduce también de manera significativa la producción de ROS y el daño oxidativo al ADNmt (Barja, 2004; Gredilla & Barja, 2005; Martínez-Cisuelo *et al.*, 2016).

Sin embargo, la conexión entre el envejecimiento y las mutaciones mitocondriales somáticas presenta algún inconveniente, como es el hecho de la presencia de varias mitocondrias y copias redundantes de ADNmt por célula, de modo que sólo la mutación de la mayoría de sus copias podría causar una deficiencia energética como la que se propone. Además, las mitocondrias no son la única fuente de ROS, sino que también se producen en los lisosomas y los peroxisomas (Boveris *et al.*, 1972), y en las membranas de las células inmunitarias (De la Fuente *et al.*, 2011).

1.4.2.4. Oxi-Inflamm-aging

Otra teoría propone el establecimiento de un estado de inflamación crónico como causante del envejecimiento, acuñado como “*inflammaging*” por Francheschi y colaboradores (Franceschi *et al.*, 2000a, 2018b).

Si bien la inflamación no es negativa *per se*, el desequilibrio inflamatorio crónico (exceso de compuestos inflamatorios frente a los antiinflamatorios), denominado estrés inflamatorio, es también un hecho asociado al envejecimiento y a las patologías típicas de la edad, como la disfunción endotelial (De la Fuente *et al.*, 2005; El Assar *et al.*, 2013), la aterosclerosis (Libby, 2012) y las enfermedades neurodegenerativas (McGeer & McGeer, 2004; Lee *et al.*, 2010).

Además, el estrés oxidativo y el inflamatorio muestran inter-dependencia, siendo el factor de transcripción ubicuo NF- κ B (del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), uno de los componentes de tal relación, ya que responde al exceso de estrés oxidativo regulando la transcripción de mediadores de inflamación

crónica y viceversa, dando lugar a un círculo vicioso (Tobon-Velasco *et al.*, 2014; De la Fuente, 2018a).

En base a ello, nuestro grupo de investigación ha propuesto una teoría que integra ambos procesos denominada “teoría de la oxidación-inflamación” (De la Fuente & Miquel, 2009). Esta teoría postula que el envejecimiento es el resultado del estrés oxidativo e inflamatorio crónicos, que afectaría a todas las células del organismo por igual, pero tendría mayor repercusión en las células de los sistemas homeostáticos (nervioso, endocrino e inmunitario), lo que explicaría la pérdida de mantenimiento de la homeostasis y la consecuente mayor morbilidad y mortalidad que aparece al envejecer (**Figura 2**). Esta teoría propone también que el sistema inmunitario, debido a su necesidad de producir oxidantes e inflamación para llevar a cabo su función defensiva, si no se encuentra bien regulado, podría aumentar ese estrés oxidativo e inflamatorio, participando en la “oxi-inflamm-aging”. De esta forma, jugaría un papel principal, no como responsable del proceso de envejecimiento en sí mismo, sino como modulador de la velocidad a la que se produce este proceso en cada individuo. Esta teoría ha sido confirmada al demostrar, por una parte, que aquellos individuos que, por el ambiente y el estilo de vida tienen un sistema inmunitario con más estrés oxidativo e inflamatorio, éste les funciona inadecuadamente y en animales de experimentación esto se acompaña de menor longevidad, sucediendo lo contrario en los que llegan a gran longevidad. Por otra parte, intervenciones (nutricionales, adecuadas relaciones sociales, entre otras) que mejoran la capacidad funcional del sistema inmunitario y su estado redox e inflamatorio, permiten una mayor longevidad del individuo (De la Fuente & Miquel, 2009; Arranz *et al.*, 2010a, b; De la Fuente *et al.*, 2011; Alonso-Fernandez & De la Fuente, 2012; De la Fuente, 2014b, 2018b).

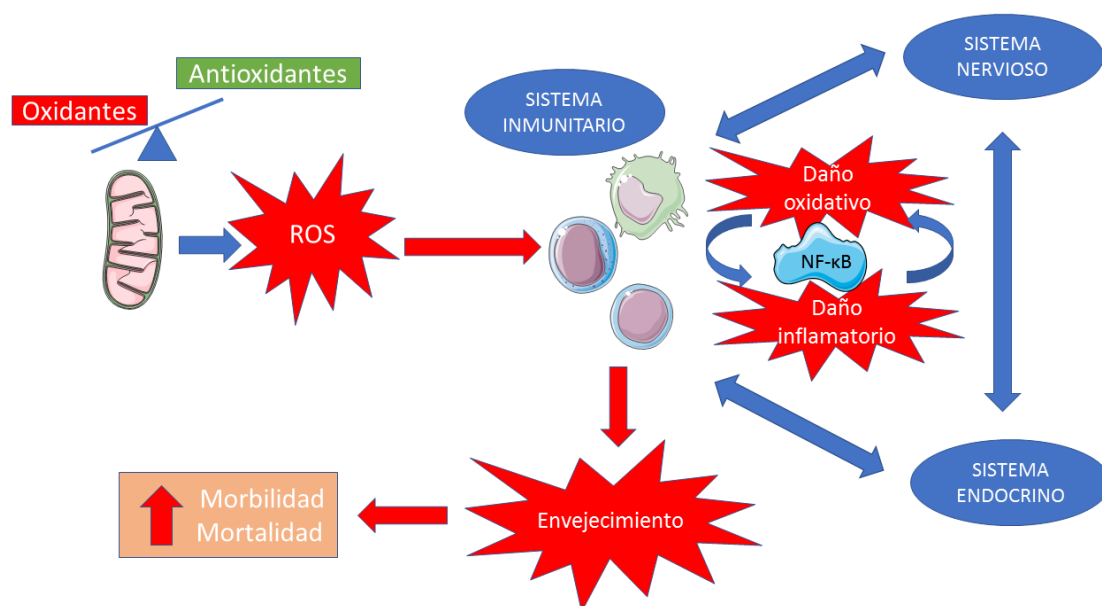


Figura 2. Representación esquemática de la teoría de la Oxidación-Inflamación. El envejecimiento comenzaría en las mitocondrias, donde la producción estocástica de ROS y disminución de antioxidantes causaría un daño oxidativo de manera crónica. Las células y tejidos más afectados serían las células de los sistemas homeostáticos, alterándose su comunicación neuroinmunoendocrina. Las células del sistema inmunitario podrían modular la velocidad de envejecimiento por su capacidad de síntesis de compuestos oxidativos e inflamatorios, en lo que se encuentra implicado el factor de transcripción *NF-κB*.

1.4.3. Evolutivas

Las teorías evolutivas intentan responder a “**por qué sucede el envejecimiento**”, proceso no sometido a la presión de la selección natural (Kirkwood & Rose, 1991). Una de estas teorías tiene en cuenta la competición por los recursos que se daría entre progenitores y descendientes en especies demasiado longevas y propone que el envejecimiento es la solución para evitar dicha competencia y poder dedicar más recursos a la reproducción para el mantenimiento de la especie (Weismann, 1891). Otra teoría evolutiva es la propuesta por Williams en 1957, que postula el envejecimiento como el efecto secundario de genes necesarios para asegurar la máxima funcionalidad a la edad reproductiva (“vitagenes”), que presentarían efectos deletéreos a largo plazo, ya que primaría el mantenimiento de la especie frente al individuo, estableciéndose un antagonismo pleiotrópico (Williams, 1957). De esta manera, actuarían como lo que más

tarde se denominó “gerontogenes virtuales”, ya que estos genes acabarían contribuyendo al envejecimiento del organismo (Rattan, 1995).

1.4.4. Respuesta al cómo, dónde y por qué del envejecimiento

Con lo indicado hasta ahora se puede dar respuesta a las tres preguntas claves de la gerontología. El imprescindible consumo de oxígeno por parte de la mitocondria (**dónde**) produce como subproductos las ROS, que son altamente reactivas y oxidantes. Éstas causan el deterioro progresivo y generalizado de macromoléculas (**cómo**), afectando a todo el organismo, pero tendría una mayor repercusión sobre células postmitóticas, y especialmente las de los sistemas homeostáticos, el nervioso, endocrino e inmunitario (estando este último implicado en la velocidad de envejecimiento). Y la razón de que suceda el envejecimiento (**por qué**) radicaría en la consecuencia de los efectos secundarios de genes beneficiosos para obtener el máximo rendimiento funcional en la edad reproductora, y así perpetuar la especie, pero desventajosos después (De la Fuente, 2009, 2019a; De la Fuente & Miquel, 2009).

1.5. El estrés oxidativo en el envejecimiento

El oxígeno molecular (O_2), gracias a su facilidad para captar hasta cuatro electrones de otras especies químicas para transformarse en agua (H_2O), ha permitido el desarrollo de las formas de vida eucariota al poder acceder a grandes cantidades de energía (Halliwell & Gutteridge, 1984). Esto convierte al oxígeno en un compuesto irremplazable para la vida aerobia, no sólo para la respiración, sino también para otras funciones esenciales de productos derivados, como las ROS (función microbiciada, transducción de señales, regulación del estado de oxidación...). La generación de estos compuestos oxidantes sería por tanto inevitable, pero a la vez imprescindible; sin embargo producidos en exceso, ocasionan un efecto perjudicial no sólo para las propias

células productoras, sino para el organismo en su conjunto, hecho que sucede en el envejecimiento (Harman, 1992; De la Fuente & Miquel, 2009; De la Fuente, 2014b, 2018b). Esa gran cantidad de compuestos oxidantes debe ser neutralizada por las defensas antioxidantes que tiene el organismo, pero si no es posible, por exceso de los oxidantes o defectos de los antioxidantes se establece un estrés oxidativo, que es el causante del deterioro de todo tipo de macromoléculas. Entre éstas se encuentran proteínas, que contienen grupos funcionales especialmente sensibles al estado redox, como grupos hidroxilo o sulfhidrilo. Esta oxidación proteica da lugar a entrecruzamientos y fragmentación de las proteínas, y a su pérdida de funcionalidad, pudiendo desembocar en su acumulación, agregación y finalmente la muerte celular (De Graff *et al.*, 2016; Tanase *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2017). Otras biomoléculas fácilmente oxidables son los ácidos grasos de las membranas celulares generando peróxidos de lípidos (Morrow *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2017), los cuales aumentan con el envejecimiento, favoreciendo la rigidez de las membranas (Richter, 1987; Vida *et al.*, 2014; Ademowo *et al.*, 2017).

Asimismo, de manera relevante, los oxidantes también causan daño a los ácidos nucleicos, originando mutaciones y roturas que afectan tanto al ADN nuclear como al mitocondrial y que pueden perpetuarse con las sucesivas divisiones mitóticas (Cooke *et al.*, 2003). Uno de los marcadores de daño oxidativo al ADN más empleado es la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), ya que esa base es la más sensible a la oxidación, y en su forma oxidada, puede ocasionar mutaciones por cambios de base (Valavanidis *et al.*, 2009). Este marcador se ha visto incrementado con el envejecimiento en diferentes tejidos de multitud de especies (Vida *et al.*, 2014).

Seguidamente se comentarán, de forma breve e incidiendo fundamentalmente en su relación con el sistema inmunitario, los principales oxidantes y antioxidantes que tiene el organismo.

1.5.1. Oxidantes no enzimáticos

Las ROS pueden generarse por causas exógenas, por fármacos como la adriamicina (Berthiaume & Wallace, 2007), por la dieta, condiciones ambientales (tabaco, metales pesados o disolventes orgánicos aromáticos) (Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009) o por radiación electromagnética e ionizante (radiación ultravioleta, X, α , β o γ) (Marrot *et al.*, 2008). También pueden generarse de manera endógena, además de en las mencionadas mitocondrias, en otros orgánulos subcelulares (Cino & Del Maestro, 1989), como resultado de diversas reacciones enzimáticas, como la NADPH oxidasa (Nox), la ciclooxigenasa (Cox) o la xantina oxidasa (XO) en lisosomas o peroxisomas (Pham-Huy *et al.*, 2008). También, por reacciones de oxidación no enzimática de cationes metálicos como el hierro (Fe^{+2}) o cobre (Cu^{+}) con peróxido de hidrógeno, liberándose radical hidroxilo, el más reactivo y dañino de las ROS (Jomova *et al.*, 2012).

La reducción incompleta del oxígeno molecular da lugar a productos altamente reactivos, como el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\text{OH}^{\cdot}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas ROS, especialmente las primeras, tendrían efectos mayoritariamente locales, pero los subproductos de la oxidación que ocasionan son más estables y pueden ejercer efectos a mayor distancia.

Entre los subproductos que originan las ROS, se pueden dar oxidantes a partir de especies nitrogenadas denominadas en su conjunto RNS (del inglés, *Reactive Nitrogen Species*). Uno de los mensajeros más usados en el organismo en muchos procesos fisiológicos como regulador de la vasodilatación, antiagregante, antiinflamatorio y modulador de la función inmunitaria y neurológica, es el óxido nítrico (NO) (Coleman, 2001). Éste es sintetizado mediante la enzima óxido nítrico sintasa, que puede a su vez producir otros oxidantes nitrogenados derivados de la catálisis de NO, como por ejemplo, el peroxinitrito (ONOO^-), que tiene alta capacidad para reaccionar con lípidos,

carbohidratos y ácidos nucleicos, así como interferir con la señalización celular (Bartasaghi & Radi, 2018; De la Fuente, 2018b). Además de sus funciones fisiológicas, el NO actúa como inhibidor competitivo de la respiración mitocondrial, incrementando la producción de superóxido, lo que presenta importantes consecuencias a nivel fisiológico y patológico (Richter, 1997).

1.5.1.1. Anión superóxido

El primer radical libre que se genera por reducción del O_2 con un electrón es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que se origina en la cadena respiratoria mitocondrial o mediante las enzimas Xantina Oxidasa y NADPH-oxidasa (durante el estallido respiratorio de los fagocitos para llevar a cabo la función microbicida, fundamental en la defensa frente a infecciones). Su acción tiene lugar principalmente a nivel local, ya que su carga electrostática le dificulta en gran medida atravesar membranas celulares. El radical superóxido se detoxifica mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD) produciendo peróxido de hidrógeno, considerado como ROS, pero mucho más estable y menos lesivo para las biomoléculas.

No existe un consenso acerca de los cambios en la producción del anión superóxido en el envejecimiento, probablemente debido a diferencias metodológicas de los experimentos realizados. Así, se han descrito tanto aumentos en la cantidad de anión superóxido (Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Vida *et al.*, 2017) como disminuciones, y como ausencia de cambios (Izgüt-Uysal *et al.*, 2003; Butcher *et al.*, 2004) al envejecer.

1.5.1.2. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), comúnmente llamado agua oxigenada, se genera por la reducción del oxígeno con 2 electrones o por descomposición del $O_2^{\cdot-}$ mediante la enzima superóxido dismutasa. Es más estable que otras formas de ROS, pero puede sufrir reacciones de autooxidación para formar oxígeno y agua, o rupturas homolíticas en

presencia de metales como hierro (Fe^{+2}) o cobre (Cu^{+}), dando lugar al radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (Haber & Weiss, 1934).

Al no tener carga, ni ser un radical, tiene mayor facilidad para atravesar membranas biológicas sin sufrir alteraciones químicas (Chance *et al.*, 1979), por lo que su efecto puede notarse en lugares alejados de su sitio de producción y generar radicales más dañinos en nuevas ubicaciones (Halliwell, 1992).

Se ha observado un aumento de la producción, una acumulación de esta ROS, así como una menor actividad de las enzimas antioxidantes asociadas en cultivos de células envejecidas (Sohal & Sohal, 1991; Shin *et al.*, 2005).

1.5.1.3. Hidroxilo

El radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) es el más reactivo de todos los radicales libres de oxígeno, y es generado como producto de la reducción del oxígeno con un tercer electrón, pero también puede producirse a partir de otras ROS, como superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al oxidar metales. Es una especie de muy corta vida media, por lo que su presencia sólo puede ser detectada mediante los productos que genera su oxidación, como la peroxidación de lípidos en forma de malondialdehído (MDA), considerado como un buen marcador de daño peroxidativo de las membranas biológicas (Tsikas, 2017).

Con el envejecimiento se han descrito aumentos en los subproductos de oxidación, producidos por la acción del radical hidroxilo en diversos tejidos (Zhang *et al.*, 1993; Leeuwenburgh *et al.*, 1998).

1.5.2. Oxidantes enzimáticos

No todas las ROS son resultado de la reducción parcial del oxígeno, sino que algunos son producto de reacciones enzimáticas que catalizan la descomposición de

compuestos de deshecho o procesos que necesitan la generación intencional de estas ROS, como en el estallido respiratorio.

1.5.2.1. Xantina Oxidasa (XO)

Entre las enzimas más oxidantes se puede contar la xantina oxidasa (XO). Como su nombre indica, esta enzima citoplásmica se encarga de oxidar la xantina, que es el producto del catabolismo de las purinas (guanina y adenina), generando ácido úrico como deshecho final. Esta reacción está relacionada con muchas enfermedades inflamatorias y oxidativas (Harrison, 2004).

La XO es de las principales fuentes de compuestos oxidantes fuera de las mitocondrias, ya que como productos de su catálisis se pueden generar el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 (Kumar *et al.*, 2018). Su actividad se ha visto aumentada al avanzar la edad en varias localizaciones de ratones o ratas, como hígado, cerebro, leucocitos peritoneales o en plasma (Arranz *et al.*, 2010b; Vida *et al.*, 2011, 2014), así como en plasma de humanos (Maté, 2015).

1.5.2.2. NADPH Oxidasa (Nox)

Otro de los principales generadores de ROS es el complejo enzimático NADPH oxidasa (Nox), que se encuentra de manera ubicua en todos los animales. Las diversas isoformas de este complejo se encuentran incluidas en diferentes membranas celulares y transfieren electrones de NADPH a moléculas de oxígeno, generando anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Esta enzima contribuye al estallido respiratorio que tiene lugar en los fagocitos del sistema inmunitario innato, pero también participa en la respuesta adaptativa (De la Fuente, 2018b).

La enzima Nox sufre cambios durante el envejecimiento que dependen del tejido estudiado. Por ejemplo, se ha descrito una expresión aumentada en tejido cardiovascular y neurovascular de individuos viejos (Toth *et al.*, 2014; Vendrov *et al.*, 2015). No

obstante, esa expresión está disminuida en linfocitos reguladores, dificultando así su función inmunosupresora y favoreciendo que se mantenga una inflamación basal después de la resolución de la respuesta inmunitaria (Wen *et al.*, 2016).

1.5.3. Antioxidantes no enzimáticos

Para contrarrestar la continua producción de ROS por parte de la célula y mantener así un correcto balance de oxidantes y antioxidantes (equilibrio u homeostasis redox), los organismos hacen uso de defensas antioxidantes, tanto enzimáticas como no enzimáticas, altamente seleccionadas y conservadas durante la evolución. Estas actúan impidiendo la formación de ROS, neutralizando sus efectos nocivos o remediando su daño (Ames *et al.*, 1993; Subhashini *et al.*, 2011).

Los antioxidantes no enzimáticos pueden ser de síntesis endógena, pero también pueden ser obtenidos o suplementados de manera exógena por la dieta. Por lo general son moléculas de bajo peso molecular, cuyo estado puede ser regenerado tras la eliminación de ROS. Dado que las ROS son por lo general moléculas pequeñas, el reducido tamaño de los antioxidantes no enzimáticos permiten la eliminación de estas ROS de manera más fácil.

1.5.3.1. Glutación

El antioxidante endógeno más importante es el tripéptido de glutación reducido (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) (GSH) cuya concentración intracelular puede alcanzar niveles milimolares en mamíferos de 0,5 a 10mM (Forman & Fisher, 1981) y está implicado como cofactor en numerosos procesos enzimáticos, interviniendo en muchas rutas metabólicas y en el mantenimiento del equilibrio redox, previniendo la alteración de estructuras y funciones celulares, así como participando en la iniciación y elongación en la síntesis de cadenas de ADN y ARN (Miquel & Weber, 1990).

Es capaz de mantener el equilibrio redox como resultado de la oxidación de los grupos sulfhidrilo de sus cisteínas formando, de manera espontánea o como co-sustrato en reacciones catalizadas, el glutatión oxidado (GSSG) (Pandey & Rizvi, 2010).

Se localiza principalmente en el citoplasma, pero también existe en el núcleo o en la mitocondria protegiendo del daño oxidativo al ADN tanto nuclear como mitocondrial (Sandstrom & Marklund, 1990).

En leucocitos peritoneales de ratón, se ha visto que el glutatión activa algunas enzimas antioxidantes, y ejerce un efecto estimulador de las funciones inmunitarias, así como una reducción en su apoptosis o muerte celular programada (PCD) (Pomaki *et al.*, 2005).

Una alteración muy común en casos de bajas cantidades de glutatión es la peroxidación y fragmentación de lípidos insaturados de las membranas celulares, generando como producto final peróxidos orgánicos y malondialdehído (MDA) (Sastre *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2005). Esto causa una pérdida de la flexibilidad, viscosidad y permeabilidad de las membranas, que desemboca en la muerte celular (Pandey & Rizvi, 2010; Zielinski & Pratt, 2017). Este hecho es especialmente importante en la mitocondria, donde la integridad de las membranas es clave para la funcionalidad de la cadena respiratoria (Tatton & Olanow, 1999). Se ha visto en numerosos estudios que el mantenimiento de una adecuada concentración de GSH es imprescindible para una correcta función inmunitaria (Meydani *et al.*, 1995; De la Fuente, 2015). El glutatión se encuentra habitualmente en su forma reducida (menos de un 5% del glutatión se encuentra en forma oxidada en condiciones estándar dentro de la célula). Las concentraciones de GSH y GSSG varían con la edad y en función del estado de salud. De hecho, el cociente GSSG/GSH, es considerado un buen indicador del estado de estrés oxidativo (Kand'ár, 2016).

Los cambios en las concentraciones de estas moléculas con el envejecimiento son objeto también de controversias, debido a diferencias metodológicas, de muestreo de poblaciones humanas, así como de uso de animales, diferencias en cepas o en la edad de los individuos analizados. Muchos autores han observado una disminución del GSH al envejecer, lo que ha llevado a proponerlo como predictor de morbilidad y mortalidad (Meydani *et al.*, 1995). En algunos estudios se ha observado esa disminución con el envejecimiento (Sasaki *et al.*, 2001; Liu, 2002), sin afectarse la del GSSG (Alonso-Fernández *et al.*, 2008; De la Fuente, 2019b), mientras que en otros se ha encontrado un aumento de GSSG, sin una disminución del GSH en leucocitos peritoneales de ratón o en sangre periférica humana (Rebrin *et al.*, 2003; Arranz *et al.*, 2010a). Lo que sí presenta más unanimidad es en el aumento del cociente redox GSSG/GSH durante el envejecimiento (Rebrin *et al.*, 2003). Además, este aumento coincide con el observado en diversas patologías (De la Fuente *et al.*, 2004b; Maté, 2015; Vida *et al.*, 2017).

1.5.3.2. Otros antioxidantes

Además del glutatión, muchas otras moléculas actúan como antioxidantes. Algunas pueden ser sintetizadas de manera endógena como el ácido úrico del metabolismo de ácidos nucleicos (Niki, 1987), la coenzima Q (ubiquinol), esencial para el funcionamiento de la cadena respiratoria (Dutton *et al.*, 2000) o la tiorredoxina (TrX), una proteína ubicua de bajo peso molecular. Otros antioxidantes no enzimáticos deben ser ingeridos en la dieta, como es el caso de polifenoles como el resveratrol (Miura *et al.*, 2000; Biedrzycka & Amarowicz, 2008) o las vitaminas E o C (Anuj *et al.*, 2016; Granger & Eck, 2018). Estas vitaminas han demostrado tener un importante papel en la respuesta inmunitaria, especialmente al envejecer (De la Fuente, 2015; De la Fuente *et al.*, 2020).

1.5.4. Antioxidantes enzimáticos

Entre los antioxidantes enzimáticos se pueden encontrar las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y tioredoxina reductasa (TrR). Todas ellas actúan en consonancia para eliminar las ROS y transformarlas secuencialmente en moléculas más estables y menos reactivas (Vida *et al.*, 2014; De la Fuente, 2018a).

En general se tiende a observar una disminución de las actividades de estas enzimas con la edad (Sandhu & Kaur, 2002; De la Fuente *et al.*, 2004b; Vida *et al.*, 2014), sin embargo, también hay autores que describen un aumento o niveles constantes en estas actividades (Martínez-Romero *et al.*, 2006; Tung *et al.*, 2014). Las diferencias metodológicas de diversos estudios han impedido alcanzar un consenso sobre los cambios que se dan durante el envejecimiento en la actividad de estas enzimas.

1.5.4.1. Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT)

La SOD transforma el radical superóxido en O_2 y H_2O_2 , y esta última es eliminada por la enzima CAT en H_2O y O_2 . La CAT es una enzima con alta constante catalítica, pero presenta una afinidad baja por el sustrato, por lo que su eficiencia es mucho mayor a concentraciones altas de H_2O_2 .

Estas enzimas (SOD y CAT) con el envejecimiento, se ha visto que sufren una disminución de la actividad (Arranz *et al.*, 2010a; Vida, 2016), aunque en otros estudios se ha descrito un aumento en eritrocitos y plasma de humanos (Kasapoglu & Özben, 2001; Rizvi & Maurya, 2007). También hay autores que describen ausencia de cambios en su actividad en leucocitos peritoneales de ratón, así como en eritrocitos y neutrófilos, comparando sangre periférica humana entre personas de 65-75 años y personas jóvenes (Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a).

1.5.4.2. Glutación Peroxidasa (GPx) y Glutación Reductasa (GR)

La enzima glutación peroxidasa (GPx), utilizando como sustratos peróxidos orgánicos o peróxido de hidrógeno y GSH, cataliza la oxidación y dimerización de este último, generando GSSG y reduciendo los peróxidos en el proceso (Couto *et al.*, 2016). La GPx presenta características opuestas a la CAT, siendo más efectiva a concentraciones bajas de H_2O_2 . De esta forma, el peróxido de hidrógeno se consigue neutralizar cualquiera que sea su concentración, con la GPx de manera inicial y la CAT si se produce una concentración excesiva de esta ROS (Ighodaro & Akinloye, 2018). El GSSG producido por la reacción de oxidación del GSH es tóxico para la célula (Franco & Cidlowski, 2012) y es reciclado a su forma reducida por la enzima glutación reductasa (GR) consumiendo NADPH, de forma que el cociente GSSG/GSH se mantiene bajo en condiciones de adecuado equilibrio redox (Couto *et al.*, 2016).

También existe controversia respecto a los cambios que sufre la actividad de las enzimas GPx y GR con la edad. Unos autores afirman que aumentan (Liu *et al.*, 2004; Homma & Fujii, 2015), mientras que otros observan una disminución, tanto en roedores como en humanos (De la Fuente *et al.*, 2004a; Espinoza *et al.*, 2008). Estos resultados aparentemente contradictorios pueden justificarse teniendo en cuenta las diferentes especies, edades, sexos y tejidos de las que se extraen las muestras, pero además algunas enzimas tienen acciones complementarias de otras, como es el caso de la CAT, la cual no es la única que elimina el H_2O_2 , sino que su actividad enzimática se ve complementada por la enzima glutación peroxidasa (GPx), por lo que las diferencias en la actividad de una pueden estar siendo compensadas por la otra.

1.5.5. Oxidantes y antioxidantes en el sistema inmunitario

Como se ha indicado anteriormente, a pesar de lo perjudicial que pueden resultar las ROS, también cumplen funciones necesarias, beneficiosas e imprescindibles en el

organismo. Esto es muy importante en el caso del sistema inmunitario en el que las ROS se usan en la señalización intracelular en los linfocitos, en la acción citotóxica de las células *Natural Killer* (Suzuki & Ono, 1999), y en la función microbicida por parte de los fagocitos (Azarabadi *et al.*, 2017). De hecho, se ha descrito a los fagocitos como los mayores productores de ROS, cuya sobreproducción es claramente perjudicial (Baciou *et al.*, 2018). Así, las células del sistema inmunitario, y especialmente las de la inmunidad innata, estarían muy expuestas al daño oxidativo, siendo las que presentan mayores niveles del mismo en comparación con las otras células inmunitarias. Al envejecer son precisamente los fagocitos los que aumentan las cantidades de ROS, lo que hizo proponer a estas células como las responsables de aumentar la velocidad de envejecimiento en cada individuo y consecuentemente su morbilidad y mortalidad (De la Fuente & Miquel, 2009; Vida *et al.*, 2017).

La dualidad comentada sobre los efectos beneficiosos de las ROS en bajas concentraciones, pero dañinos a altas, ha sugerido el papel hormético de las mismas. Aplicando esta idea a las mitocondrias, se habla del concepto de mitohormesis, que sugiere que una producción moderada de ROS en las mitocondrias puede inducir la formación de defensas antioxidantes, generando una respuesta adaptativa a este tipo de estrés con la síntesis de enzimas detoxificantes, y otras proteínas de estrés (Ristow & Schmeisser, 2014; Martínez de Toda & De la Fuente, 2015).

El desequilibrio redox en las células inmunitarias puede desembocar en un envejecimiento acelerado y en la aparición de enfermedades asociadas a éste (Madamanchi & Runge, 2013; Pouladianiti *et al.*, 2016; Vida *et al.*, 2018; Martínez de Toda *et al.*, 2019b). Por ejemplo, la oxidación de los enlaces lipídicos de las membranas celulares causa rigidez en las mismas y las células inmunitarias tienen unas membranas muy sensibles a la oxidación y además son altamente dependientes de la flexibilidad de

sus membranas para desempeñar su función. En concreto, el daño oxidativo a membranas mitocondriales dificulta la generación de un estallido respiratorio adecuado en sujetos mayores (Cannizzo *et al.*, 2011).

2. Cambios en los sistemas homeostáticos durante el envejecimiento

Las alteraciones que presentan un mayor impacto a nivel del organismo completo con el envejecimiento son las que atañen a los sistemas que regulan las funciones del individuo en su conjunto, es decir, los sistemas homeostáticos (endocrino, nervioso e inmunitario).

2.1. Sistema Endocrino

El deterioro del sistema endocrino con la edad se manifiesta en la disminución de la secreción de ciertas hormonas como la melatonina, hormonas sexuales o la de crecimiento, que provoca modificaciones corporales al envejecer (Reiter, 1992; Bayne & Liu, 2005; De la Fuente, 2018a). Por ejemplo, la reducción de los niveles de melatonina en el envejecimiento causa a su vez una disminución de las enzimas antioxidantes SOD, GR, GPx, así como un aumento en la tasa de generación de ROS, y se asocian con una peor función inmunitaria (Zhang & Zhang, 2014).

Considerando los ejes neuroendocrinos, como el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), que junto con el simpático-adreno-medular (SAM), son los principalmente implicados en las respuestas fisiológicas al estrés, hay importantes alteraciones al envejecer, siendo precisamente la inadecuada capacidad de esas respuestas una de las características de la vejez (Cruces *et al.*, 2014a; De la Fuente, 2018a).

2.2. Sistema Nervioso

El sistema nervioso también sufre cambios moleculares, celulares, tisulares, anatómicos y funcionales asociados al envejecimiento, los cuales se asocian con una mayor predisposición a padecer enfermedades neurodegenerativas (Hou *et al.*, 2019).

Entre los cambios que se pueden observar destacan los de carácter anatómico, como la disminución del volumen cerebral total, con especial afección de la materia blanca (mielina) (Takao *et al.*, 2012; Safaiyan *et al.*, 2016) o una menor producción de neurotransmisores como la acetilcolina o la dopamina (Utkin, 2019; Wang *et al.*, 2019), que puede asociarse al deterioro cognitivo y motor que se experimenta con el envejecimiento (Kluger *et al.*, 1997). De hecho, en los PAM anteriormente mencionados se da una disminución de esos neurotransmisores (De la Fuente *et al.*, 2003). Esta menor producción de neurotransmisores, probablemente esté causada por la disminución de la actividad tiroxina hidroxilasa (Norrara *et al.*, 2018), enzima limitante en la síntesis de catecolaminas y cuya eliminación parcial se ha descrito como causante de un fenotipo de envejecimiento prematuro (Garrido *et al.*, 2018). Esta reducción en la producción de catecolaminas con la edad también estaría causada por la disminución de las neuronas noradrenérgicas, así como por una pérdida de densidad de los receptores asociados en el cerebro (Olpe & Steinmann, 1982; Santulli & Iaccarino, 2013).

Al envejecer tiene lugar una pérdida de la funcionalidad de neuronas serotoninérgicas y glutaminérgicas, junto con una disminución de la concentración de estos neurotransmisores y sus receptores tanto en humanos como en animales de experimentación (Rivera *et al.*, 2016; Karrer *et al.*, 2019).

Como ocurre en todo el organismo, el sistema nervioso también experimenta, al envejecer, aumentos en el estrés oxidativo, generados por una mayor producción de compuestos oxidantes y una menor eficiencia de los antioxidantes (Esiri, 2007; Vida *et al.*, 2014). Estos cambios, junto con la disfunción de la microglía, con una activación prolongada de la misma (Norden & Godbout, 2013), que se asocia con mayor secreción de citoquinas proinflamatorias y el consecuente estado de estrés oxidativo e inflamatorio en el cerebro, favorecen la neurodegeneración (Ransohoff, 2016). Todo ello produce

cambios anatómicos, deterioro conductual (alteración de los patrones de sueño y coordinación motora) (Woytowicz *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2019) o cognitivo (defectos en la memoria y el aprendizaje) (Vida *et al.*, 2014; Nyberg, 2017), así como un mayor estado basal de ansiedad, característico de individuos ancianos (De la Fuente, 2018b; Domènech-Abella *et al.*, 2019), o prematuramente envejecidos (Garrido *et al.*, 2021).

Algunos parámetros de funcionalidad del sistema nervioso se han propuesto como marcadores de envejecimiento en roedores, como es el caso del miedo a la novedad en ratas (*neophobia*) (Cavigelli & McClintock, 2003) o la ansiedad/emocionalidad en ratones analizados en el laberinto en T (Viveros *et al.*, 2007). Así, se ha observado que cohortes de roedores con un mayor miedo a la novedad o una mayor ansiedad en la edad adulta mostraron una longevidad media disminuida en relación a aquellos con menor miedo o ansiedad (Cavigelli & McClintock, 2003; Viveros *et al.*, 2007; De la Fuente, 2018a).

2.3. Sistema Inmunitario. Inmunosenescencia

El sistema inmunitario es el encargado de proteger al organismo de los patógenos y de las células que se malignizan, además de eliminar los tejidos dañados. Está compuesto por toda una serie de células y moléculas, que reconocen lo ajeno de lo propio y se encarga de coordinar y ejecutar la respuesta fisiológica que elimine la amenaza, considerándose, además, un excelente marcador del estado de salud del organismo (De la Fuente, 2019c).

La acción defensiva del sistema inmunitario, conocida como “respuesta inmunitaria”, se divide en tres fases: 1) Reconocimiento de los antígenos; 2) Activación de los mecanismos de la respuesta que implica proliferación de los linfocitos específicos y secreción de citoquinas; 3) Fase efectora con la destrucción de lo potencialmente patógeno (para lo que se establece un estado transitorio de oxidación e inflamación).

De manera clásica, la inmunidad se ha diferenciado en innata, que actúa de manera rápida e inespecífica contra multitud de agresiones, y adaptativa, que es más tardía y requiere la presentación previa y específica de los patógenos (De la Fuente, 2019c).

2.3.1. La inmunidad innata y adquirida

El **sistema inmunitario innato** forma la primera línea de defensa del organismo contra agentes patogénicos. Está formado por una serie de barreras, físicas (barreras epiteliales), químicas (oxidantes o pH) y biológicas (componentes no celulares, leucocitos y también la microbiota) que actúan de manera rápida (tarda del orden de segundos en comenzar) sobre una gran variedad de agresores (inespecífico) y sin necesidad exposición previa. Está constituido por los fagocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos, así como células dendríticas), y las células linfoides innatas, entre las que se encuentran las “*natural killer*” (NK). Sus funciones son esenciales para desencadenar la respuesta adaptativa, pues muchos de los fagocitos tienen capacidad de ser células presentadoras de antígeno (Sun *et al.*, 2017; De la Fuente, 2019c). En los componentes moleculares solubles de la respuesta inmunitaria innata se puede destacar las citoquinas, fundamentalmente proinflamatorias, las proteínas del complemento o la lisozima, entre otros.

Los fagocitos ejercen su acción microbicida mediante el proceso fagocítico en el que se distinguen una serie de etapas: la adherencia a los tejidos, la movilidad al foco infeccioso mediante un gradiente químico (quimiotaxis), la ingestión o fagocitosis de lo extraño y su posterior digestión. Esta destrucción se lleva a cabo en el fagosoma estableciéndose el estallido respiratorio, con la intervención de la Nox de membrana y la formación de anión superóxido O_2^- , seguido de otros radicales libres (**Figura 3**). Los fagocitos más típicos son los macrófagos, en los que se distinguen dos subpoblaciones o “polarizaciones”, M1 y M2, según su modo de activación y las citoquinas implicadas. Los M1 intervienen en las primeras fases de la eliminación de patógenos, por lo que producen

gran cantidad de mediadores proinflamatorios y oxidantes, posteriormente los M2 actúan como antiinflamatorios para promover la cicatrización del tejido dañado (Mills, 2012). Las células NK desarrollan su acción citotóxica lisando las células tumorales o las infectadas por virus, para lo cual se unen a la célula diana y le “lanzan” un programa de apoptosis, en el que intervienen una serie de moléculas (perforinas, granzinas, citoquinas y especialmente radicales libres de oxígeno).

La inmunidad innata, es una forma universal y antigua de defensa del huésped contra la infección y está presente, probablemente, en todos los metazoos. Aunque se denomina también inespecífica, tiene una especificidad singular por los productos de los microorganismos, distinta de la que presenta la inmunidad adquirida. Así, las células de esta inmunidad reconocen, mediante receptores que se denominan “*pattern recognition receptors*” (PRR), unas cuantas estructuras moleculares muy conservadas y presentes en amplios grupos de microorganismos, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), tales como el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Esto ya les permite diferenciar lo propio de lo extraño. Esos receptores están codificados en la línea germinal, por lo que el repertorio de especificidades es más limitado y no es clonal. Un grupo adicional de moléculas reconocido por estos receptores son los DAMP (*damage-associated molecular patterns*) también conocidos como alarminas, moléculas liberadas por células dañadas y que pueden iniciar y perpetuar respuestas inflamatorias no infecciosas.

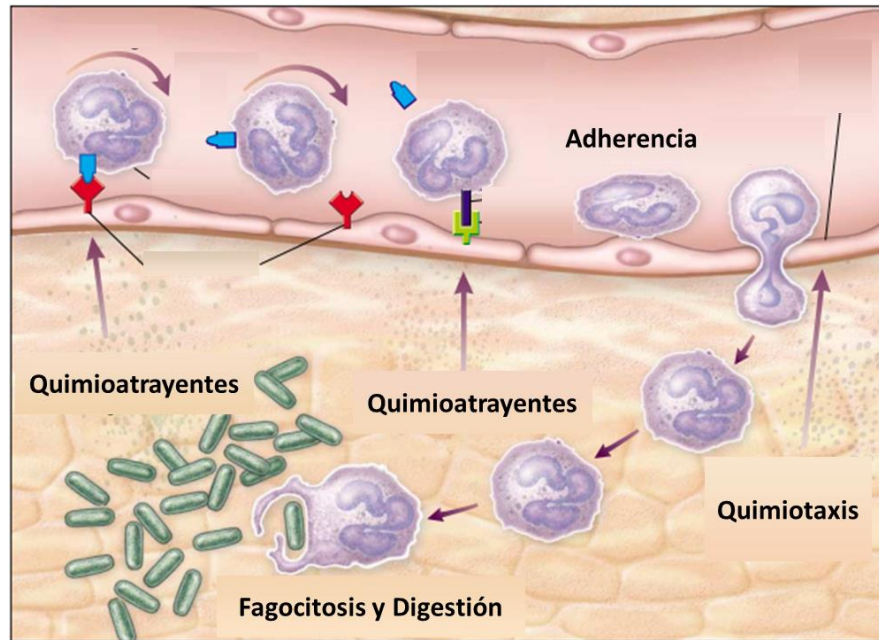


Figura 3. Esquema de la respuesta inmunitaria de los fagocitos (neutrófilos). Los agentes patógenos causan la aparición de un gradiente quimiotáctico. Este gradiente altera las proteínas de adhesión de las células endoteliales, que causan la adherencia de los fagocitos, que posteriormente migran hasta la zona infectada, a favor del gradiente quimiotáctico, donde fagocitan y digieren a los patógenos (Imagen modificada de Delves & Roitt, 2000)

El sistema **inmunitario específico o adaptativo** lo componen prioritariamente los linfocitos, los T (maduran en el timo y se encargan de la respuesta inmunitaria celular), y los B (madurados en la médula ósea y son más implicados en la respuesta inmunitaria “humoral”). Su funcionamiento se basa en el reconocimiento específico del antígeno que los activa y en la memoria inmunológica, característica que les permite actuar con una gran rapidez en encuentros posteriores con el mismo antígeno. El reconocimiento antigénico se hace a través de receptores clonales específicos, que han experimentado reordenamientos genéticos para ser funcionales. Los receptores de linfocitos B (BCR, del inglés “*B-cell receptor*”) son capaces de reconocer antígenos libres y los receptores de los linfocitos T (TCR, del inglés “*T-cell receptor*”) lo hacen mediante la presentación antigénica, en el contexto de las moléculas de superficie celular del complejo principal de histocompatibilidad. En el caso de los T citotóxicos CD8⁺ son las de clase I, que están en prácticamente todas las células y presentadas en esas moléculas estos linfocitos

reconocen los determinantes antigénicos de las células infectadas por virus o malignizadas. En el caso de los T colaboradores CD4⁺ (Th, del inglés “*helper*”) la presentación del antígeno se les hace por parte una célula presentadora (APC, del inglés “*Antigen Presenting Cells*”) y en el contexto de moléculas del complejo de histocompatibilidad de la clase II.

Del mismo modo que los fagocitos, los linfocitos deben llegar hasta la zona del reconocimiento antigénico, para lo cual se adhieren a los tejidos, y posteriormente realizan quimiotaxis hasta el lugar de actuación, en donde tras reconocer al antígeno específico, proliferan (**Figura 4**) (De la Fuente, 2019c).

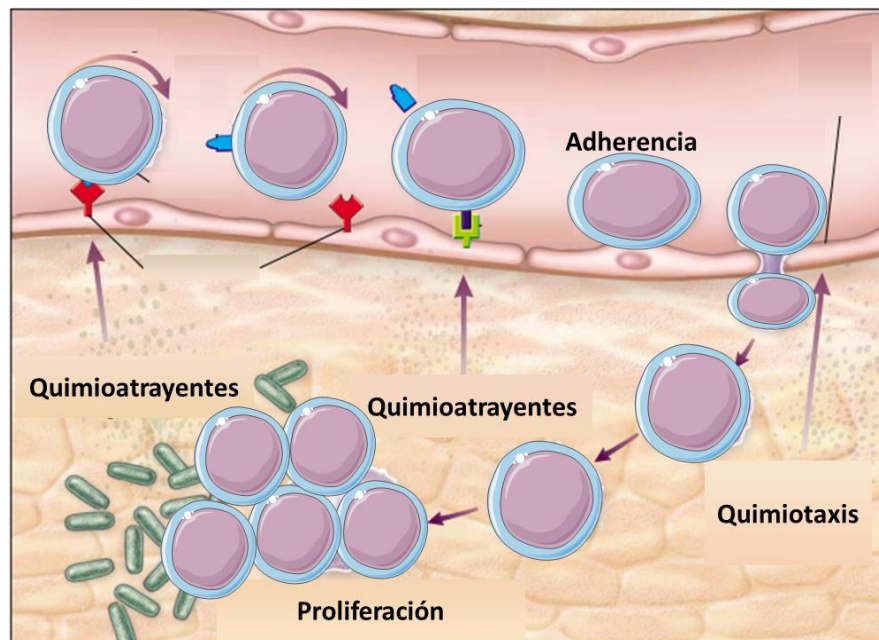


Figura 4. Esquema de la respuesta inmunitaria de linfocitos. Estas células se adhieren y migran en respuesta a gradientes quimiotácticos. Al llegar al lugar del reconocimiento antigénico se produce una proliferación clonal de estas células. (Imagen modificada de Delves & Roitt 2000)

Los linfocitos que aún no han reconocido a su antígeno específico se llaman vírgenes o *naive* y, al activarse tras el reconocimiento, algunos se convierten en células “efectoras”, que intervienen activamente en la eliminación del patógeno, y otros en células “memoria”, que formarán la reserva de la memoria inmunológica para desarrollar

una respuesta más rápida y contundente frente a futuras exposiciones de ese mismo antígeno (De la Fuente, 2019c).

Los linfocitos B efectores se transforman en células plasmáticas, productoras de anticuerpos específicos contra el antígeno. Los linfocitos Th CD4+, al activarse y proliferar se diferencian en Th1 o Th2 dependiendo de las citoquinas a las que estén expuestos (IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ para el perfil Th1 e IL-4, IL-10, IL-6 e IL-13 para el Th2). Funcionalmente, el perfil Th1 favorece la respuesta celular contra patógenos intracelulares (virus, bacterias y otros parásitos) con un patrón de citoquinas inflamatorias, mientras que el perfil Th2 favorece la respuesta humoral contra patógenos extracelulares (como helmintos o alérgenos) con un importante patrón de citoquinas antiinflamatorias (Kidd, 2003).

La inmunidad innata y adaptativa actúan de manera coordinada, ambas colaboran y son igualmente imprescindibles en la defensa frente a patógenos. Además, la división entre ellas se desdibuja con descubrimientos, entre otros, el de los linfocitos innatos o ILC (del inglés, “*Innate Lymphoid Cells*”), y con el de la “memoria inmunológica” de las células innatas, aunque la misma no sea antígeno específica (Almeida & Belz, 2016; Wendeln *et al.*, 2018; De la Fuente, 2019c).

2.3.2. La inmunosenescencia

Durante el envejecimiento se produce una reestructuración general del sistema inmunitario que se ha denominado inmunosenescencia. Esta compleja remodelación se produce de manera continua y dinámica con el paso de los años, pero no se da en un único sentido, sino que unas funciones aumentan, algunas se mantienen y otras disminuyen. Aunque existan resultados contradictorios al respecto, se sabe que todos los componentes moleculares y celulares de la inmunidad innata y adaptativa se ven afectados por el proceso de envejecimiento. Esta inmunosenescencia se hace patente en la elevada

prevalencia y gravedad, en personas mayores, de enfermedades autoinmunes, degenerativas, neoplasias e infecciosas, lo que conlleva una mayor mortalidad (Kumar & Burns, 2008; De la Fuente & Miquel, 2009; Caruso *et al.*, 2009; De la Fuente, 2020).

Durante mucho tiempo se pensó que el **sistema inmunitario innato** no desempeñaba un papel relevante en la inmunosenescencia, al no sufrir tantos cambios funcionales como el adaptativo. Sin embargo, las observaciones de las últimas décadas han demostrado lo contrario, siendo considerado fundamental en el deterioro del sistema inmunitario con la edad y en la consecuente susceptibilidad a infecciones y otras patologías (Hajishengallis, 2010; Martínez de Toda *et al.*, 2016, 2019c).

En la inmunosenescencia del sistema innato, las células NK han sido el componente más estudiado. Con el envejecimiento muchos autores han detectado un aumento en la cantidad de estas células (Ginaldi *et al.*, 2001; Tarazona *et al.*, 2009), sin embargo, la **actividad citotóxica** total no se ve incrementada en sujetos ancianos, ya que la capacidad citotóxica de cada célula disminuye con el envejecimiento y el aumento del número de células puede suponer un intento compensatorio para esta pérdida funcional (Martínez de Toda *et al.*, 2016). Además de la disminución en la actividad citotóxica, también se ha documentado una menor capacidad de proliferación y de liberación de citoquinas en las células NK, que podría estar causado por la menor concentración de IL-2 o IFN- α y γ circulante en personas mayores (Mariani *et al.*, 2001; Waldmann, 2006). Esta disminución de la actividad citotóxica, también podría deberse a modificaciones en los marcadores de superficie de las células NK (Aw *et al.*, 2007). No obstante, la unión de las NK a la célula diana, así como la síntesis y liberación de perforinas aparece conservada en individuos ancianos (Solana *et al.*, 2006; De la Fuente, 2020).

Estos cambios pueden contribuir a la mayor prevalencia de enfermedades infecciosas y neoplasias tanto en personas ancianas como en ratones viejos (Brüünsgaard

et al., 2001; Pawelec, 2017). Así, una capacidad citotóxica alta se ha podido correlacionar con una buena salud en personas, tanto jóvenes como ancianas (Kaszubowska *et al.*, 2008) y se ha propuesto como predictor de morbilidad (Ginaldi *et al.*, 1999) y mortalidad (DelaRosa *et al.*, 2006; Aw *et al.*, 2007).

Por otra parte, en cuanto a los fagocitos (monocitos, neutrófilos y macrófagos), en general no se observan cambios en el número total al envejecer (Gomez *et al.*, 2008) pero sí alteraciones en su funcionalidad general, correlacionadas con una mayor incidencia de infecciones en personas mayores y con una mayor mortalidad (Tortorella *et al.*, 2001). Nuestro grupo de investigación ha observado un menor número de macrófagos en extractos peritoneales de ratón según avanza la edad y esto podría deberse a una mayor adherencia de estas células, mostrando una mayor resistencia a ser extraídas de la cavidad peritoneal con los protocolos que emplea nuestro laboratorio (Puerto *et al.*, 2005; De la Fuente, 2008). Esta **adherencia** incrementada también ha sido comprobada en neutrófilos de sangre periférica de hombres y mujeres (De la Fuente, 2008; Arranz *et al.*, 2009; Maté, 2015). En cuanto a la **capacidad quimiotáctica y fagocítica**, aunque algunos autores observan aumentos o ausencia de cambios con el envejecimiento (Weiskopf *et al.*, 2009; Jackaman *et al.*, 2017), la mayoría de estudios coincide en que los fagocitos sufren una disminución de estas capacidades con el avance de la edad tanto en los diversos tipos de células fagocíticas (monocitos, neutrófilos y macrófagos), como en localizaciones (sangre, bazo, timo y peritoneo) (Wenisch *et al.*, 2000; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a; Simell *et al.*, 2011; Maté, 2015). Esos cambios se han relacionado con una menor longevidad de estos individuos (Guayerbas *et al.*, 2002; De la Fuente, 2008; Martínez de Toda *et al.*, 2016).

Además, esta menor actividad fagocítica, en sujetos mayores comparados con jóvenes, se ve acompañada por una deteriorada capacidad bactericida, con un menor

estallido respiratorio en condiciones de estimulación (en presencia de fMLP o bolas de látex) (Miyaji *et al.*, 2000; Weiskopf *et al.*, 2009). Aunque también hay publicaciones que apuntan lo contrario en esta generación de ROS (Ortega *et al.*, 2000; Guayerbas & De la Fuente, 2003; Alvarado *et al.*, 2006).

La destrucción de patógenos por los fagocitos, es seguida del procesamiento antigénico para su posterior presentación a los linfocitos, señalizando su activación también mediante la liberación de citoquinas (Savina & Amigorena, 2007). Este proceso de presentación se encuentra también deteriorado en sujetos ancianos, afectando a la funcionalidad del sistema inmunitario adaptativo (Donnini *et al.*, 2002; Jackaman *et al.*, 2017). Por ello, una capacidad preservada de presentación de antígenos se ha propuesto como un predictor de salud y longevidad (Solana *et al.*, 2006; DelaRosa *et al.*, 2006).

En resumen, las funciones de los fagocitos varían con la edad. La adherencia tiende a aumentar, mientras que las capacidades quimiotácticas, fagocíticas y de generación del estallido respiratorio parecen estar disminuidas en edades más avanzadas, dificultando en general la actividad microbicida y liberando un perfil de citoquinas proinflamatorio (Fulop *et al.*, 2004; Tortorella *et al.*, 2007).

En este contexto, hay que considerar la alteración que la producción de citoquinas por parte de los fagocitos muestra con el envejecimiento. Mayoritariamente se produce un cambio de polarización de los macrófagos M2 a M1, promoviendo así un perfil proinflamatorio crónico (Oishi & Manabe, 2016), aunque si se controla de forma adecuada, mediante la apoptosis de los emisores de esos compuestos, o contrarrestando los agentes dañinos a través de compuestos antiinflamatorios y antioxidantes, no parece impedir una longevidad extrema (Mecocci *et al.*, 2000; Iannitti & Palmieri, 2011).

Con respecto a la **inmunidad adquirida**, más reciente en términos evolutivos, al ser más especializada, es más susceptible que la innata a los deterioros que conlleva el

envejecimiento (Franceschi *et al.*, 2000c; De la Fuente, 2008, 2020; De la Fuente & Miquel, 2009). Uno de los cambios más evidentes que tiene lugar con el paso del tiempo es el deterioro morfológico del timo (involución o atrofia tímica), lo que produce una pérdida de poblaciones de linaje linfóide T (Yanes *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2020).

Asimismo, muchos estudios coinciden en que los linfocitos tanto B como T muestran un descenso significativo con la edad en su **capacidad proliferativa** frente a diversos estímulos como fitohemaglutinina (PHA, específico de células T) o LPS (estimulador de linfocitos B), tanto en humanos (Ames *et al.*, 1993; Pawelec *et al.*, 2002; De la Fuente & Miquel, 2009; Martínez de Toda *et al.*, 2016), como en linfocitos peritoneales de ratón (en este caso los mitógenos utilizados han sido la concanavalina A (conA), específico de células T y el LPS) (De la Fuente *et al.*, 2004a; Arranz *et al.*, 2010a). En cambio, esta proliferación se ve aumentada con la edad en ausencia de estímulo tanto en ratones como en humanos, lo que sería indicativo de una activación basal elevada, síntoma de una inflamación estéril perjudicial (Martínez de Toda *et al.*, 2017; Vida *et al.*, 2018).

Esta disminución de la linfoproliferación en respuesta a mitógenos, acompañada de una menor producción de IL-2 con la edad, se observa únicamente en linfocitos T vírgenes y no en los de memoria (Adolfsson *et al.*, 2001). Se ha propuesto que estos cambios estén causados por modificaciones en las células madre precursoras o en la atrofia tímica que tendría lugar en el nicho donde maduran estas células (Lynch *et al.*, 2009). Debido a esta atrofia, se produciría un menor número de linfocitos T vírgenes y una menor capacidad de respuesta a nuevos patógenos, lo que aumenta la probabilidad de incidencia de los mismos y, en consecuencia, una mayor mortalidad (Pawelec *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2013). Esta menor producción de nuevas células *naive*, a la vez que un aumento en las células T de memoria al avanzar la edad, se justifica por la exposición continua a

patógenos a lo largo de la vida del individuo (Franceschi *et al.*, 2000a; Adolfsson *et al.*, 2001; Pawelec, 2017).

Si bien las células T son las más afectadas con el envejecimiento, es la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ los que experimentan las mayores alteraciones. Estos CD4⁺ disminuyen en número, mientras que los T CD8⁺ aumentan, lo que hace que el cociente CD8⁺/CD4⁺ aumente al envejecer (Pawelec, 2012; Shao *et al.*, 2017). Así, una menor proliferación en respuesta a mitógenos, junto con un cociente CD8⁺/CD4⁺ elevada correlaciona con una mayor mortalidad (Ferguson *et al.*, 1995).

Algunos autores han detectado una expansión clonal, con el envejecimiento, de los linfocitos T que carecen del marcador de superficie CD28 (CD28⁻) y que poseen telómeros más cortos (Sanson *et al.*, 2008). Este marcador es característico de linfocitos senescentes, que actuarían como linfocitos anérgicos (Akbar *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018), de forma que los linfocitos T CD8⁺ CD28⁻ serían incapaces de reaccionar a señales infecciosas y los CD4⁺ CD28⁻ no podrían estimular a otras células del sistema inmunitario, como a los linfocitos B para fomentar la secreción de anticuerpos. A pesar de esta falta de actividad inmunitaria, los linfocitos CD28⁻ aún conservan su capacidad de secreción de citoquinas proinflamatorias (Mangas-Losada *et al.*, 2017), por lo que su creciente presencia podría ser uno de los causantes del estado inflamatorio crónico observado con el envejecimiento.

En el caso de los linfocitos B también se han podido observar cambios significativos en su funcionalidad, como una menor proliferación en presencia de LPS o de anti-IgM, en individuos viejos respecto a los jóvenes tanto en linfocitos peritoneales, como en poblaciones esplénicas, lo que podría estar causado por una peor activación por parte de los linfocitos T (Frasca *et al.*, 2003; Weiskopf *et al.*, 2009). A pesar de que la médula ósea no sufre una involución, como ocurre con el timo, los linfocitos B se reducen en

número tanto en esa médula (Ademokun *et al.*, 2010) como en sangre periférica de individuos ancianos en comparación con los adultos (Frasca & Blomberg, 2011). Además, estas células sufren modificaciones en sus subpoblaciones similares a los linfocitos T, produciéndose una acumulación de las poblaciones de células de memoria, con una disminución de las *naive* (Colonna-Romano *et al.*, 2006). Esta disminución podría estar causada por un menor número de precursores de células B (Rossi *et al.*, 2003), dificultando la defensa ante nuevas infecciones (Ademokun *et al.*, 2010). Pero además de estos errores en la proliferación y la maduración, también ocurren deterioros generalizados en los linfocitos B, como una peor capacidad de producción de anticuerpos (Colonna-Romano *et al.*, 2008; Frasca *et al.*, 2017). Así, todas estas alteraciones en la función de las células B se manifiestan en una reducida efectividad de las vacunas en personas mayores (Ongrádi & Kövesdi, 2010).

Respecto a otras funciones de los linfocitos, como la **capacidad de adherencia**, la mayoría de los estudios indican un aumento, al envejecer, en la adherencia que presentan los de sangre periférica humana, pero también en los peritoneales de ratón (De la Fuente, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008). Por otra parte, la **capacidad quimiotáctica** en respuesta a compuestos quimioatrayentes (como el fMLP), aunque generalmente poco estudiada en linfocitos, parece encontrarse disminuida en células de órganos inmunocompetentes o de sangre periférica humana con la edad (Arranz *et al.*, 2008; Martínez de Toda *et al.*, 2016), así como en linfocitos peritoneales de ratones cronológicamente viejos o prematuramente envejecidos respecto a adultos sanos (Viveros *et al.*, 2007; De la Fuente, 2008).

En resumen, al envejecer, el sistema inmunitario adaptativo sufre una atrofia del timo, que causa una disminución de la producción de linfocitos T *naive*, viéndose una reducción del número de estas células junto con un aumento de los linfocitos de memoria. Esto ocasiona una peor función inmunitaria a nuevas infecciones, y una disminuida

respuesta a las vacunas en personas ancianas. A su vez, la estimulación de los linfocitos de memoria frente a las repetidas infecciones a las que se enfrenta el organismo provoca el agotamiento y anergia de estas células. Todo esto acaba induciendo una pérdida de inmunovigilancia, así como el establecimiento secuencial de un estado inflamatorio crónico (Ongrádi & Kövesdi, 2010; Bauer & De la Fuente, 2016; Aiello *et al.*, 2019).

Dado que el sistema inmunitario procura la supervivencia del organismo, se ha podido observar una correlación directa entre la funcionalidad de éste (por ejemplo de linfocitos T, células NK o fagocitos) y la longevidad que alcanza el individuo (Guayerbas *et al.*, 2002; Guayerbas & De la Fuente, 2003; Martínez de Toda *et al.*, 2016). Los individuos que alcanzan una gran longevidad (animales de experimentación o en personas centenarias), experimentan también los cambios de la inmunosenescencia, pero en menor medida que los que mueren antes. Además, a esa edad avanzada muestran valores en las funciones inmunitarias similares a los de los adultos, poniendo de relieve la importancia de conseguir un adecuado sistema inmunitario en la vejez (Guayerbas & De la Fuente, 2003; Puerto *et al.*, 2005; De la Fuente & Miquel, 2009; Arranz *et al.*, 2010b; Martínez de Toda *et al.*, 2016, 2018).

Hay que tener presente que la respuesta inmunitaria está estrechamente ligada al estrés oxidativo e inflamatorio, como ya se ha comentado anteriormente. Esto sucede de forma relevante en la inmunidad innata, en la que tanto la función microbicida de los fagocitos como la citotóxica de las NK requieren una generación importante de compuestos oxidantes e inflamatorios. La gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados o PUFAs (del inglés, “*Poly-Unsaturated Fatty Acids*”) que hay en las membranas leucocitarias, hace a estas células especialmente vulnerables a las reacciones espontáneas de oxidación de las ROS (Meydani *et al.*, 1995). Por tanto, se hace necesario generar una respuesta suficiente para hacer frente a los patógenos (respuesta aguda), pero también el

poder controlarla una vez no sea necesaria, para no cronificar el estado oxidativo e inflamatorio a través de un adecuado balance redox (De la Fuente, 2002, 2018a; Franceschi, 2007). Ya que se ha visto que el estrés oxidativo e inflamatorio crónico es capaz, en sí mismo, de producir muchas patologías.

Al avanzar la edad, aumenta la cantidad de compuestos oxidantes e inflamatorios y ocurre una disminución de la producción de compuestos antioxidantes y antiinflamatorios en todas las células, pero más notablemente en las inmunitarias y concretamente en las fagocíticas. Se ha descrito un estrés oxidativo e inflamatorio incrementado en células inmunitarias de ratones prematuramente envejecidos, en comparación con ratones no prematuramente envejecidos (Alvarado *et al.*, 2006; De la Fuente & Miquel, 2009; Baeza *et al.*, 2010a). Asimismo, en humanos se han observado, al envejecer, aumentos de agentes proinflamatorios como la enzima ciclooxigenasa 2 (COX2), prostaglandinas o numerosas citoquinas (Chung *et al.*, 2011), junto con una elevada producción de compuestos oxidantes (Martínez de Toda *et al.*, 2020). En general, ese estrés oxidativo se manifiesta por un deterioro de las defensas antioxidantes en leucocitos, tanto de compuestos no enzimáticos (por ejemplo, el GSH), como de la actividad de las enzimas (GPx, GR, SOD, CAT). También, por una mayor generación de ROS como superóxido y mayor actividad de enzimas oxidantes como XO, así como productos finales de daño oxidativo a lípidos (MDA) y al ADN (8-OHdG) (Vida *et al.*, 2014; De la Fuente, 2018a; Martínez de Toda *et al.*, 2020).

Respecto al aumento de citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α , IL-6 e IL-1 β , que se da al avanzar la edad, éste se produce mayormente en condiciones basales, es decir, sin la presencia de un estímulo. Esto constituye la denominada “inflamación estéril”, que predisponen a fenotipos frágiles y de discapacidad o invalidez funcional, así como a síntomas de demencia o incluso de Alzheimer y, finalmente, a una mayor mortalidad en

individuos mayores (Münch *et al.*, 2003; Bauer & De la Fuente, 2016; Ferrucci & Fabbri, 2018). Sin embargo, su producción en presencia de estímulos antigénicos o mitogénicos se encuentra disminuida en sujetos ancianos (Pawelec *et al.*, 2002; De la Fuente, 2002; Maté, 2015). No obstante, otras citoquinas, fundamentalmente anti-inflamatorias y reguladoras (como IL10 o IL-2) presentan cantidades disminuidas al envejecer (Globerson & Effros, 2000; Mariani *et al.*, 2001; Arranz *et al.*, 2010b; Martínez de Toda *et al.*, 2017; Ventura *et al.*, 2017). Esa diferente liberación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias se ha ligado, respectivamente, con menores y mayores capacidades para alcanzar longevidades más extremas (Franceschi *et al.*, 2000b; Di Bona *et al.*, 2009).

A pesar de que los cambios en la función inmunitaria con el envejecimiento han sido ampliamente estudiados, los mecanismos concretos que regulan el mantenimiento de una correcta respuesta inmunitaria, cuya desregulación supone al establecimiento de la inmunosenescencia, continúan sin esclarecerse. Así, el mejor conocimiento de los factores que causan un buen o mal funcionamiento del sistema inmunitario podrá arrojar algo de luz sobre esos mecanismos que facilitan un envejecimiento saludable y una mayor *healthspan*, pudiendo así abrir la posibilidad a aplicar tratamientos para conseguirlo.

2.4. Comunicación neuroinmunoendocrina

Los sistemas nervioso, inmunológico y endocrino no actúan independientemente unos de otros, sino que se coordinan en la llamada “comunicación neuroinmunoendocrina” para así adecuar sus acciones a mantener un equilibrio homeostático del organismo en su conjunto, preservando la salud y garantizando la supervivencia (Besedovsky & Del Rey, 1996; Perez-Aguilar & Rondon-Mercado, 2018). Esta interrelación se ha llamado más recientemente “comunicación psiconeuroinmunoendocrina”, al considerar también las causas y efectos que pueden

tener los pensamientos y emociones sobre la funcionalidad de los sistemas homeostáticos (Besedovsky & Del Rey, 2007; De la Fuente, 2019d).

Esta comunicación se sustenta en el hecho de que las células de cada uno de estos sistemas presentan receptores para los mensajeros típicos de los otros sistemas (hormonas en el endocrino, neurotransmisores en el nervioso y citoquinas en el inmunitario) (Besedovsky & Del Rey, 1996). Y además, los tejidos propios de estos sistemas pueden sintetizar y secretar mensajeros de los otros, aunque en menores cantidades y con efectos generalmente autocrinos o paracrinos (Madden, 2003; Besedovsky & Del Rey, 2007). De esta forma, se pueden elaborar respuestas acordes al contexto en el que se encuentre el individuo en cada momento.

Adicionalmente hay conexiones anatómicas entre los tres sistemas, ya que el sistema nervioso inerva los órganos linfoides del sistema inmunitario, así como los órganos endocrinos (Bellinger *et al.*, 1992; Artico *et al.*, 2002; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2011). Y los sistemas inmunitario y endocrino, a su vez pueden actuar entre sí y en el nervioso a través del torrente sanguíneo.

De este modo cada sistema homeostático va a poder incidir en el funcionamiento de los otros, estableciéndose relaciones bidireccionales. El sistema endocrino regula la función inmunitaria mediante las hormonas, siendo unas inmunoestimuladoras, como es el caso de la tiroxina, la dehidroepiandrosterona, la prolactina, los estrógenos o la hormona del crecimiento (Gala & Daughaday, 1991; Jara *et al.*, 2017; Roved *et al.*, 2017; Sibai *et al.*, 2020) y otras inhibidoras, entre las que se encuentran los andrógenos y los glucocorticoides (Bauer, 2005; Lai *et al.*, 2012; Csaba, 2014). En este contexto, se han observado cambios en la producción de citoquinas y en la función inmunitaria, en general, en consonancia con el ciclo menstrual y muchos estudios detectan variaciones en la

inmunidad a partir de la menopausia en humanos o la ovariectomía en roedores (Arranz *et al.*, 2008; Baeza *et al.*, 2010b; Vrachnis *et al.*, 2014; Lorenz *et al.*, 2018).

A su vez, ya desde los inicios en las investigaciones en el campo de la comunicación neuroinmunoendocrina, se observó que la respuesta inmunitaria influía en la función del sistema endocrino, causando, por ejemplo, un aumento de la concentración de glucocorticoides en sangre (Besedovsky & Sorkin, 1977). También, el sistema nervioso incide en la función inmunitaria, lo que se aprecia en el efecto inmunoestimulador de muchos neurotransmisores (como la acetilcolina) y el inhibidor inmunitario de otros (como la somatostatina). En este marco se puede entender que el sistema inmunitario mejore con las emociones positivas y se deteriore con las negativas (De la Fuente, 2019d). A su vez, el sistema inmunitario repercute en el funcionamiento del sistema nervioso, como se puede observar en los cambios conductuales que tienen lugar en la denominada “*sickness behavior*” que acompaña a los procesos infecciosos (Dantzer *et al.*, 2008). De hecho, citoquinas como la proinflamatoria IL-1 β es capaz de activar procesos nerviosos (el dolor, el sueño, la memoria o la neuroplasticidad) y endocrinos (la estimulación del eje HHA, aumentando la producción de glucocorticoides (Matsuwaki *et al.*, 2014; Hung *et al.*, 2017; Arkhipov *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2019).

2.4.1. La comunicación neuroinmunoendocrina en la respuesta al estrés y el envejecimiento

La interrelación entre los sistemas homeostáticos se manifiesta, por ejemplo, en la manera que tiene el organismo de señalar las exposiciones a estresores endógenos y ambientales (Reiche *et al.*, 2004; Dantzer *et al.*, 2008). Esta respuesta provoca cambios a nivel fisiológico y prepara al individuo para reaccionar a los estresores y garantizar su supervivencia. Sin embargo, si la fuente del estrés se prolonga en el tiempo, puede acabar resultando perjudicial para el organismo, afectando a su salud (Steimer, 2002), y

generando estados de ansiedad. De hecho, la inadecuada respuesta de los sistemas homeostáticos a las situaciones de estrés está en la base de múltiples enfermedades y puede desencadenar un envejecimiento acelerado (Cruces *et al.*, 2014a; Machado *et al.*, 2014; Martínez de Toda *et al.*, 2019a). Así, la intensidad de la respuesta conductual a un mismo estresor se ha correlacionado negativamente con la longevidad que alcanza cada individuo (Dellu *et al.*, 1994). Esto se ejemplifica en el modelo PAM/ENPAM desarrollado por nuestro grupo de investigación, que clasifica los ratones dependiendo de la mayor ansiedad/emocionalidad que muestran a entornos nuevos. Como ya se ha comentado, los PAM manifiestan peor respuesta al estrés que genera el laberinto en T, lo que se acompaña de deterioro en los tres sistemas homeostáticos, con la consecuente menor esperanza de vida (Viveros *et al.*, 2007; De la Fuente & Gimenez-Llort, 2010; Vida & De la Fuente, 2013; Martínez de Toda *et al.*, 2016).

Centrándonos en el efecto del estrés en el sistema inmunitario, aunque inicialmente se pensaba que los efectos eran únicamente inmunosupresores, posteriormente se ha comprobado que si bien esto suele suceder con el estrés crónico (Cohen *et al.*, 2001; Cruces *et al.*, 2014b), no lo hace con el agudo y el puntual. Más aun, recientemente se ha descrito cómo el enfrentarse a situaciones de estrés puede conllevar un efecto hormético (acorde a las respuestas de los ejes SAM y HHA, que liberan catecolaminas (CA) y glucocorticoides (GC), respectivamente), siendo capaz de regular positivamente muchas funciones inmunitarias (Besedovsky & Del Rey, 2011; De la Fuente *et al.*, 2011; Dhabhar *et al.*, 2012). En una primera respuesta al estrés agudo, la de “lucha o huida”, con la activación del eje SAM y la liberación de CA se favorece una potenciación temporal de las funciones del sistema inmunitario innato para una defensa inminente, ya que requeriría un menor gasto energético (Atanackovic *et al.*, 2006). En cambio, si el estresor persiste en el tiempo (estrés crónico), se activa el eje HHA con liberación de GC, causando

finalmente la inmunosupresión de ambas ramas de la inmunidad (Segerstrom & Miller, 2004; Cruces *et al.*, 2014b).

Con el envejecimiento tiene lugar un deterioro de cada uno de los sistemas homeostáticos y su comunicación, lo que hace que la respuesta a las situaciones de estrés no pueda ser adecuada. Así, los GC aumentan y se afecta el sistema de retro-inhibición de los mismos, generando resistencia y haciendo que se produzcan de manera constante (Bauer, 2005; Rodriguez *et al.*, 2016).

Los numerosos cambios que tienen lugar con el envejecimiento en el sistema inmunitario, con el aumento de compuestos proinflamatorios y prooxidantes, van a tener repercusiones bidireccionales en la funcionalidad de los otros sistemas homeostáticos, el nervioso y el endocrino. Como ejemplo, se puede indicar que la mayor presencia de linfocitos en el cerebro que tiene lugar al envejecer (como consecuencia de esa inflamación que permite un mayor paso de los mismos por la barrera hematoencefálica), se correlaciona con el deterioro cognitivo que se produce con la edad (Stichel & Luebbert, 2007; Laurent *et al.*, 2017).

Estos progresivos deterioros en la función y coordinación entre los tres sistemas, dificultan el mantenimiento de la salud, aumentando así la morbilidad, y teniendo lugar enfermedades que inciden, prioritariamente en alguno de estos sistemas, como diabetes, enfermedades neurodegenerativas o cáncer, entre otras (De la Fuente, 2014a, 2018a, b).

No se ha podido esclarecer cuál de estos sistemas reguladores es el primer desencadenante del deterioro que se observa con el avance de la edad, pero la opción más probable seguramente sea una combinación simultánea de todos ellos (Bellinger *et al.*, 2001). Un hecho comprobado por nuestro grupo de investigación es que aunque las cantidades de mediadores nerviosos (neurotransmisores) o endocrinos (hormonas) que llegan a las células inmunitarias se mantuviesen al envejecer, estas células en los

individuos viejos se vuelven “sordas” a la información que les proporcionan, por lo que no responden adecuadamente a la misma (De la Fuente, 2018a, b).

Por tanto, además de los cambios que tienen lugar en cada sistema homeostático por separado con el envejecimiento, se debe tener en cuenta la influencia que estos cambios tienen en la comunicación entre dichos sistemas, lo que acaba causando el aumento de morbilidad y mortalidad (Besedovsky & Del Rey, 2007; Perez-Aguilar & Rondon-Mercado, 2018).

3. Diferencias entre machos y hembras

El sistema endocrino y, concretamente, las hormonas sexuales ejercen efectos sobre las funciones que desempeñan los sistemas nervioso e inmunitario, y por tanto sobre la salud y la longevidad. Esto hace que la biología del envejecimiento presente un claro dimorfismo sexual, no sólo en la mayor longevidad que muestran las hembras de muchas especies de mamíferos, sino también en un mejor mantenimiento general de la funcionalidad inmunitaria y la comunicación psiconeuroinmunoendocrina (Borras *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2008; Bale, 2009; Pitychoutis & Papadopoulou-Daifoti, 2010; Alonso-Fernandez & De la Fuente, 2012).

Esto se puede apreciar en la diferente susceptibilidad a enfermedades, y en la prevalencia y progresión de las mismas, que existe entre hombres y mujeres, hecho que se aprecia, por ejemplo, en patologías como el Alzheimer, el Parkinson y enfermedades autoinmunitarias (Whitacre, 2001; Giménez-Llort *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013).

Con respecto a la función inmunitaria, la misma es más potente en las hembras que en los machos, lo cual parece ser consecuencia del papel inmunoestimulador de los estrógenos (Baeza *et al.*, 2010a). Además, dada la capacidad de los estrógenos de promover la expresión de defensas antioxidantes (Borras *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012), se explicaría el menor estrés oxidativo de las hembras en general y de sus células inmunitarias en particular (Borras *et al.*, 2007; De la Fuente & Miquel, 2009). Esto permite entender la mayor longevidad de las hembras (Guayerbas *et al.*, 2004; De la Fuente *et al.*, 2004a; Borras *et al.*, 2007).

Asimismo, se puede detectar una respuesta conductual diferente entre machos y hembras asociada a la presencia de distintas hormonas sexuales y otras relacionadas con las mismas como es el caso de los glucocorticoides (Stefanski & Grüner, 2006; Pérez-Cerezales *et al.*, 2018; Heck & Handa, 2019). Por ejemplo, la testosterona, mucho más

abundante en machos, se ha correlacionado positivamente con las conductas de riesgo (Kurath & Mata, 2018). También, en machos, la respuesta fisiológica a estímulo como la exposición crónica a nicotina o a opioides es distinta que en hembras (Cahill, 2006; Caldarone *et al.*, 2008).

Estas diferencias, sin embargo, se van perdiendo con la edad y la aparición de la menopausia (De la Fuente *et al.*, 2004a; Baeza *et al.*, 2010a) y tampoco son apreciables si los roedores son gonadectomizados antes de la pubertad, lo que refuerza la conexión entre la regulación de las hormonas sexuales en el dimorfismo sexual y en el funcionamiento de los sistemas homeostáticos (Stefanski & Grüner, 2006; Lepasavić *et al.*, 2009; Tanaka, 2015).

A raíz de estas diferencias en los sistemas homeostáticos y en sus interacciones, surge la necesidad de analizar las variables fisiológicas tanto en machos como en hembras, ya que un mismo marcador puede ser relevante en un sexo, pero no en el otro (Beery & Zucker, 2011).

3.1. Diferencias en modelos de predicción de longevidad

La propuesta de biomarcadores para pronosticar la esperanza de vida es un hecho relevante en el que hay que considerar la especificidad asociada al sexo.

Una correcta predicción de la esperanza de vida de cada individuo, y especialmente si se consigue con métodos no invasivos, podría permitir tener información relevante de cara a intervenciones (dietéticas, farmacológicas o psicosociales) tempranas que permitirán un envejecimiento más saludable y una mayor longevidad. Además, la detección de esos biomarcadores, que posibiliten los modelos de predicción, puede dar importantes pistas sobre los mecanismos implicados en la velocidad de envejecimiento.

Se han propuesto múltiples modelos de predicción de la longevidad en animales de experimentación como los ratones, considerando, entre otros, parámetros psicomotores

(Ingram *et al.*, 1982), peso corporal y subpoblaciones leucocitarias (Miller, 2001), concentraciones hormonales (Harper *et al.*, 2004), combinaciones de estas variables (Swindell *et al.*, 2008), o la temperatura corporal (Ray *et al.*, 2010). Sin embargo, la capacidad de predicción de estos modelos es sólo aproximada o muy limitada en su aplicabilidad, ya que muchos de estos modelos alcanzaban en torno a un 40% de capacidad de explicación de la varianza de la longevidad, mientras que otros sólo permiten la predicción en ratones muy viejos o cercanos a la muerte.

Muchos de estos autores coinciden en que los modelos basados en parámetros con mayor diversidad resultaban en modelos con ajustes consistentemente mejores que aquellos que sólo consideran variables hormonales o linfocitarias y apuntan a que se podrían alcanzar modelos más predictivos si se contase con mayor variedad de parámetros (Pignolo, 2019).

Asimismo, una apreciación común es que existe una clara especificidad en la capacidad predictiva de las variables consideradas en función del sexo. En los estudios de Fählstrom y colaboradores, se determinó la variación de distintos parámetros conductuales y sensoriomotores con la edad en ratones hembra y macho, observándose que no todos ellos presentaban la misma tendencia (Fahlström *et al.*, 2011, 2012). En otros trabajos, Cavigelli y colaboradores comprobaron inicialmente que los ratones macho que presentaban conductas neofílicas, con mayor grado de locomoción en entornos novedosos, alcanzaban también una mayor longevidad y, sin embargo, cuando repitieron estos experimentos en hembras, aquellas con comportamientos neofílicos morían antes que sus hermanas neofóbicas (Cavigelli & McClintock, 2003; Cavigelli *et al.*, 2008).

4. Nuevos marcadores de envejecimiento

En la búsqueda de nuevos marcadores de velocidad de envejecimiento, dos interesantes candidatos son la inserción de fragmentos de ADN mitocondrial (ADNmt) en el ADN nuclear (ADNn) y la presencia de micronúcleos, resultado de la inestabilidad cromosómica, que se ve incrementada con la edad.

4.1. Inserción de fragmentos de ADNmt en el genoma nuclear: la NUMTogénesis

La transferencia de fragmentos de ADN de las mitocondrias al núcleo ha jugado un papel fundamental en la evolución de los organismos eucariotas (Kleine *et al.*, 2009; Hazkani-Covo *et al.*, 2010). Se ha comprobado que este fenómeno, conocido como “numtogénesis” (del inglés NUMTs “NUclear MiTochondrial DNAs”), sigue ocurriendo en la actualidad en diversas especies (Lopez *et al.*, 1994; Lough *et al.*, 2008). Así, se ha observado la presencia de NUMTs en levaduras (Cheng & Ivessa, 2012), hongos (*Phytophthora*) (Krampis *et al.*, 2006), plantas como *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oryza sativa*) (Richly & Leister, 2004) y maíz (*Zea mays*) (Lough *et al.*, 2008). También en animales como cabra (*Capra hircus*) (Ning *et al.*, 2017), caballo (*Equus ferus*) (Nergadze *et al.*, 2010), mosquito (*Anopheles*) (Ding *et al.*, 2018), rata (*Rattus norvegicus*) (Caro *et al.*, 2010) o ratón (*Mus musculus*) (Martínez-Cisuelo *et al.*, 2016), entre otros.

El ADNmt es una de las principales biomoléculas afectadas por las ROS, siendo unas 15 veces más susceptible que el ADNn (Richter, 1988). Este hecho hace que el ADNmt muestre una tasa de mutación muy superior a la del ADNn, que aumenta durante el envejecimiento, debido a los efectos deletéreos acumulativos de las ROS a lo largo de la vida (Song *et al.*, 2005; Trifunovic, 2006).

Además de la proximidad a la fuente de producción de ROS, en la membrana interna de la mitocondria, el ADNmt cuenta con otras características que lo hacen más

susceptible que el ADNn al daño oxidativo: carece de histonas, tiene un peor sistema de reparación (Bogenhagen, 2012), menor fidelidad en la replicación (Song *et al.*, 2005) y una generalizada ausencia de intrones, es decir, que casi cualquier mutación no sinónima se verá reflejada en una pérdida de funcionalidad de la proteína que codifica (Taanman, 1999).

La teoría mitocondrial del envejecimiento postula que el daño oxidativo producido en las mitocondrias por acción de las ROS ocasiona una deficiencia energética que se encuentra como una de las causas del envejecimiento. Sin embargo, la gran cantidad de mitocondrias en una misma célula, así como las numerosas copias de ADNmt en cada mitocondria y la baja proporción de genes mitocondriales (menos de un 0,01% de los genes del organismo), hacen poco probable la mutación de un mismo gen en todas estas copias y, por *ende*, que este fenómeno sea el causante del deterioro generalizado observado en el envejecimiento. Las inserciones de fragmentos de ADNmt en el genoma nuclear relacionadas con la edad plantearían un cambio de perspectiva dentro de la teoría mitocondrial del envejecimiento, ya que las inserciones podrían producir inestabilidad genómica afectando al núcleo, donde se encuentran la mayoría de los genes.

Las ROS son capaces de inducir roturas de hebra simples o dobles (Sharma *et al.*, 2019), cuya frecuencia se encuentra aumentada con la edad (Crott *et al.*, 2005). En ocasiones, estas roturas (con ayuda de endonucleasas) dan lugar a pequeños fragmentos ricos en 8-OHdG que se liberan fuera de la mitocondria, a través de poros de transición inespecíficos, entre otros mecanismos, detectándose en el citoplasma (Patrushev *et al.*, 2004). Como ya propuso Richter en 1988, estos fragmentos podrían insertarse en regiones del ADNn postulándose como una posible causa de cáncer y envejecimiento (Richter, 1988). Se ha demostrado un incremento en la presencia de secuencias de ADNmt en el genoma nuclear relacionado con el envejecimiento en hígado y cerebro de ratón (Caro *et*

al., 2010). Las secuencias mitocondriales identificadas correspondieron a los genes para la citocromo oxidasa III y 16S ARNr. Estos fragmentos contenían idénticos SNPs (del inglés, polimorfismo de nucleótido único “*Single Nucleotide Polymorphism*”) a los encontrados en el genoma mitocondrial de los mismos individuos, revelando un origen reciente. Se han observado resultados similares en levaduras, relacionándose las inserciones de ADNmt con el envejecimiento, pues dichas inserciones disminuyen la CLS (*Chronological life span*) o tiempo en que las poblaciones celulares no proliferativas pueden sobrevivir (Cheng & Ivesa, 2010, 2012) (**Figura 5**).

Por otro lado, se ha demostrado que la numtógenés asociada a la edad está relacionada con la producción de ROS en la mitocondria a lo largo de la vida de los individuos. Se ha comprobado que en un grupo de ratones viejos tratados con rapamicina, fármaco que disminuye la producción de ROS de la mitocondria y aumenta la longevidad (Harrison *et al.*, 2009), la presencia de fragmentos mitocondriales en el núcleo se veía reducida hasta niveles similares a los encontrados en los individuos adultos (Martínez-Cisuelo *et al.*, 2016).

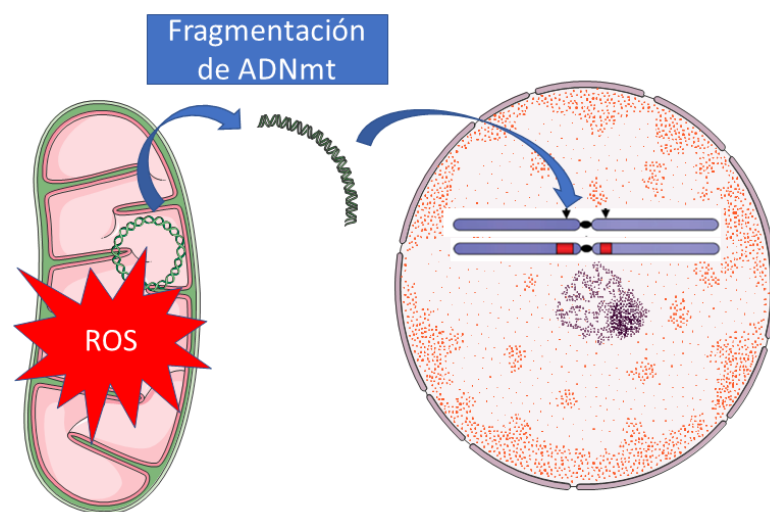


Figura 5. Esquema de inserción de fragmentos mitocondriales en el genoma nuclear. Las ROS causan roturas de doble hebra que fragmentan el ADNmt. Algunos de estos fragmentos salen de la mitocondria y se insertan en las regiones centroméricas y (peri)centroméricas de los cromosomas. (Figura creada a partir de imágenes obtenidas de <https://smart.servier.com/>)

Se ha propuesto que, con el paso del tiempo, la progresiva acumulación de daño oxidativo al ADNmt en todas las células del organismo aumentaría la frecuencia de inserciones, provocando inestabilidad genómica. De esta manera se vería afectado un importante número de células en el organismo con el avance de la edad, sin necesidad de que muchas copias de ADNmt se vieran mutadas (Barja & Herrero, 2000; Sastre *et al.*, 2003; Barja, 2004). Así, estas inserciones en el ADNn contribuirían al aumento de la inestabilidad genómica observada durante el envejecimiento y al deterioro generalizado que tiene lugar con el avance de la edad, además de ser el origen de distintas patologías como el síndrome de Pallister-Hall o diversas neoplasias (Hazkani-Covo *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2017).

Las numerosas evidencias experimentales, que vinculan el envejecimiento con estas inserciones de forma causal, permiten que este fenómeno se postule como un posible nuevo marcador de envejecimiento y edad biológica.

Los fragmentos de ADNmt, una vez liberados fuera de la mitocondria, se transportarían por el citoplasma utilizando distintos mecanismos. En algunos casos el transporte está mediado por vacuolas (Campbell & Thorsness, 1998), por proteínas de unión a ADN tipo histonas (Kutsyi *et al.*, 2005), por interacción directa entre el núcleo y las mitocondrias (Mota, 1963) o por encapsulación de mitocondrias por parte del núcleo (Jensen *et al.*, 1976). Además, los fragmentos mitocondriales podrían salir en forma de ARN mensajero (ARNm) que se retrotranscribiría una vez en el núcleo (Rodley *et al.*, 2012). No obstante, este mecanismo parece no suceder en todos los casos, ya que se han encontrado NUMTs correspondientes a regiones no codificantes del genoma mitocondrial (Woischnik & Moraes, 2002) o de mayor tamaño que los transcritos mitocondriales (Falkenberg *et al.*, 2007). Una vez en el interior del núcleo, los NUMTs se insertan preferentemente en las regiones pericentroméricas y subteloméricas de los cromosomas

por un mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *Non-Homologous End Joining*), un fenómeno frecuente en estas zonas del cromosoma (Ricchetti *et al.*, 1999). Se ha observado que los NUMTs que presentaban una menor identidad con las secuencias mitocondriales, y por tanto eran más antiguos ya que habían tenido más tiempo para mutar de forma divergente respecto a las secuencias en el genoma mitocondrial, eran también más cortos (Bensasson *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). Esto indica que estos NUMTs no permanecen intactos una vez insertados, sino que pueden sufrir fragmentaciones y reorganizaciones mediadas por elementos móviles (Michalovova *et al.*, 2013).

Las regiones (peri)centroméricas en mamíferos se caracterizan por la presencia de numerosas secuencias genéticas repetidas en tándem de ADN satélite, como el satélite Alpha en humanos o las secuencias *minor* y *major satellite* en ratones (MiSat y MaSat, respectivamente) (Manuelidis, 1978; Wu & Manuelidis, 1980).

En el caso concreto del ratón, las regiones pericentroméricas de sus cromosomas, todos telocéntricos excepto el Y, se encuentran formadas por secuencias continuas de ADN telomérico, MiSat y MaSat, que parecen formar cada una su dominio cromosómico propio (Garagna *et al.*, 2002). Además de las mencionadas, se han descrito otras dos secuencias, MS3 y MS4, que aparecen entremezcladas con las secuencias Mi y MaSat, respectivamente, así como otras secuencias de naturaleza desconocida (Kuznetsova *et al.*, 2006).

Las regiones donde se insertan preferentemente esos fragmentos corresponden a lo que se conoce como heterocromatina centromérica. A pesar de que son en su mayoría transcripcionalmente inactivas, las regiones (peri)centroméricas son de vital importancia en los procesos de división celular ya que aseguran la correcta segregación cromosómica,

permitiendo la unión de las proteínas del cinetocoro, que interaccionan con el huso mitótico, y la cohesión entre cromátidas hermanas (Guenatri *et al.*, 2004).

No obstante, el efecto que sobre la segregación cromosómica ejercen las inserciones de ADNmt que tienen lugar en las regiones (peri)centroméricas, queda aún por dilucidar.

4.2. Inestabilidad genómica: los micronúcleos (MNs)

La inestabilidad genómica aumenta con el avance de la edad (Aubert & Lansdorp, 2008; Ziętkiewicz *et al.*, 2009) y su origen se encuentra en múltiples causas, como en sistemas de reparación defectuosos (Aguilera & Gómez-gonzález, 2008), mutaciones en componentes de los puntos de control del ciclo celular (Garinis *et al.*, 2008; Negrini *et al.*, 2010), la inadecuada metilación de las regiones pericentroméricas (Gisselsson *et al.*, 2005) o errores en el ensamblaje e interacción de microtúbulos y cinetocoro (Gisselsson, 2008; Bakhoum *et al.*, 2009), entre otras.

Un caso particular de inestabilidad genómica es la inestabilidad cromosómica, que origina anomalías cromosómicas tanto numéricas (aneuploidías) como estructurales (deleciones, translocaciones o inserciones de fragmentos cromosómicos). Estas alteraciones, que se presentan con mayor prevalencia al avanzar la edad, suponen un “*Hallmark*” del envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2013; Vijg & Montagna, 2017).

Una de las manifestaciones citológicas de la inestabilidad cromosómica es la presencia de micronúcleos (MNs), originalmente denominados “cuerpos de Howell-Jolly” por haber sido descritos en 1890 por William Howell y Justin Jolly (Howell, 1890).

Los MNs pueden contener fragmentos cromosómicos acéntricos, cromátidas o cromosomas enteros que quedan excluidos de los núcleos tras la división celular. Al microscopio se observan como pequeñas estructuras esféricas similares al núcleo principal, pero de menor tamaño (1-5 μm de diámetro) y sin ningún tipo de conexión física detectable con éste (**Figura 6**).

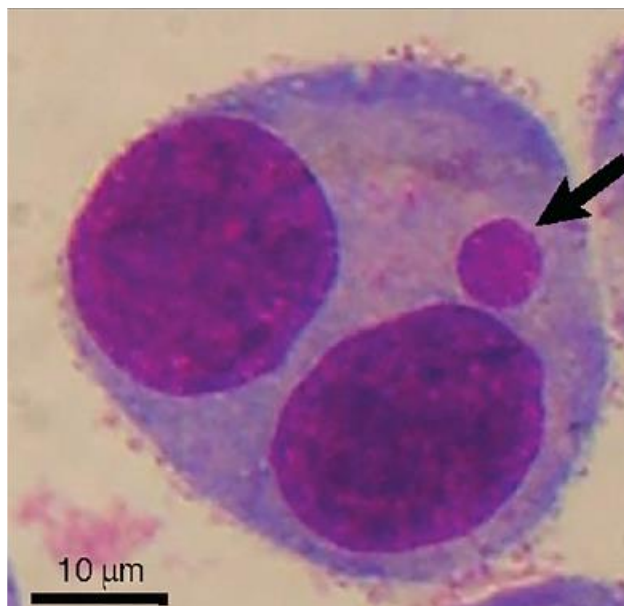


Figura 6. Célula binucleada con un micronúcleo (flecha). Tinción con de Giemsa (Imagen obtenida de Guo *et al.*, 2019).

El origen de los MNs es diverso. Por un lado, pueden ser consecuencia de errores en los puntos de control durante la mitosis, como el SAC (del inglés, *Spindle Assembly Complex*) encargado de garantizar la correcta interacción de los cinetocoros de cada cromosoma con los microtúbulos antes de la entrada en anafase, o una sobreactivación del APC (del inglés, *Anaphase Promoting Complex*) que promovería la segregación prematura de las cromátidas hacia cada uno de los polos de las células hijas. Estos fenómenos dan lugar a segregaciones cromosómicas anómalas, induciendo la activación de mecanismos de corrección de errores que retrasan la segregación cromosómica, impidiendo la inclusión de parte del material genético una vez que el reensamblaje de la envoltura nuclear ha tenido lugar (**Figura 7A**) (Cimini *et al.*, 2002). Un escenario similar tendría lugar en el caso de que las cohesinas no disgregaran correctamente y las cromátidas hermanas se mantuvieran unidas tras la entrada en anafase, retrasando o impidiendo su migración a los correspondientes polos celulares (**Figura 7A**) (Haarhuis *et al.*, 2013).

Los MNs también pueden originarse por una deficiente reparación de roturas de doble hebra del ADN que da lugar a fragmentos cromosómicos acéntricos, incapaces de migrar a ninguno de los polos durante la anafase (**Figura 7B**) (Fenech, 2010; Chia *et al.*, 2017). Estos MNs que contienen fragmentos acéntricos tienen un origen clastogénico, ya que proceden de roturas cromosómicas.

Alternativamente, esta reparación deficiente puede dar lugar a la fusión de dos cromosomas por los extremos, originando un cromosoma dicéntrico. En este caso, si los dos centrómeros de una misma cromátida dicéntrica interaccionan con microtúbulos procedentes de distintos polos durante la anafase, resultará en la formación de un puente nucleoplásmico (NPB, del inglés *NucleoPlasmic Bridge*) (**Figura 7C**) (Pampalona *et al.*, 2010).

Asimismo, durante la interfase, los núcleos pueden generar protusiones o NB (del inglés, *Nuclear Buds*), que pueden llegar a albergar fragmentos cromosómicos acéntricos, que se acaban expulsando del núcleo principal, formando MNs (Chmielewska *et al.*, 2018).

Por último, los MNs pueden contener cromátidas o cromosomas completos y tener un origen aneugénico, ya que las células originadas durante la división precedente resultan aneuploides, esto es, sus núcleos principales presentan un número cromosómico diferente al número del complejo diploide de la especie. En cualquiera de los casos, los fragmentos de ADN y las cromátidas o cromosomas completos quedan en el citoplasma en el momento de la reconstitución de las envolturas nucleares, suponiendo una pérdida de material genético.

Se ha observado la presencia de MNs conteniendo secuencias centroméricas (Catalan *et al.*, 1995), estableciéndose una relación causal entre el aumento de

aneuploidías y la formación de micronúcleos, ambas acrecentadas con el envejecimiento (Fenech & Morley, 1985).

Por otra parte, se ha descrito que pequeñas variaciones en la secuencia de nucleótidos en las regiones centroméricas y pericentroméricas pueden causar importantes alteraciones en la segregación cromosómica (McGrew *et al.*, 1986; Slee *et al.*, 2012).

Con el tiempo, estos MNs pueden permanecer en el citoplasma, degradarse, reincorporarse al núcleo, expulsarse de la célula o inducir la apoptosis o senescencia celular (Utani *et al.*, 2010; Hintzsche *et al.*, 2017). Estas células senescentes, lejos de ser inertes, son metabólicamente activas y liberan abundantes componentes proinflamatorios, como citoquinas o metaloproteasas (Campisi, 2005), por lo que se consideran parcialmente causantes del envejecimiento (Ouellette, 2000; Baker *et al.*, 2016).

La evidencia anteriormente expuesta permite considerar que la frecuencia de MNs y otros fenómenos asociados a la inestabilidad cromosómica, así como la presencia de NPBs, pueden ser candidatos a marcadores de la velocidad de envejecimiento o edad biológica.

4.2.1. CBMN assay

La técnica CBMN (del inglés, *Cytokinesis-Block MN Assay*), o *test* de MNs, fue desarrollada en 1985 por los científicos Michael Fenech y Alexander Morley, para detectar agentes genotóxicos y daño cromosómico, que se manifiesta en forma de MNs de una primera mitosis de linfocitos humanos, originalmente empleando radioisótopos (Fenech & Morley, 1985).

Actualmente constituye la mejor técnica validada para cuantificar inestabilidad cromosómica en células humanas y se emplea en laboratorios de todo el mundo. Los resultados obtenidos hasta el momento se recogen en el *HUMN Project (HUMAN MicroNucleus Project)*, donde se han estandarizado los protocolos y criterios de recuento

para esta técnica, pudiéndose estimar el efecto que tienen diferentes factores como la dieta, el sexo o la edad sobre la frecuencia de MNs (Fenech *et al.*, 2003; Fenech, 2007).

Brevemente, este *test* hace uso del compuesto citocalasina-B (Cyt-B), que inhibe la formación del anillo contráctil de actina que da lugar a la citocinesis durante la división celular. Al no afectar a la cariocinesis, tras finalizar la mitosis los dos núcleos generados quedan englobados dentro del mismo citoplasma dando lugar a células binucleadas (BNs).

Estas células BNs reflejan cómo ha tenido lugar la mitosis inmediatamente precedente, de tal modo que si ha existido algún problema en la segregación cromosómica o en la reparación de roturas cromosómicas, se detectará en el citoplasma la presencia de uno o varios MNs.

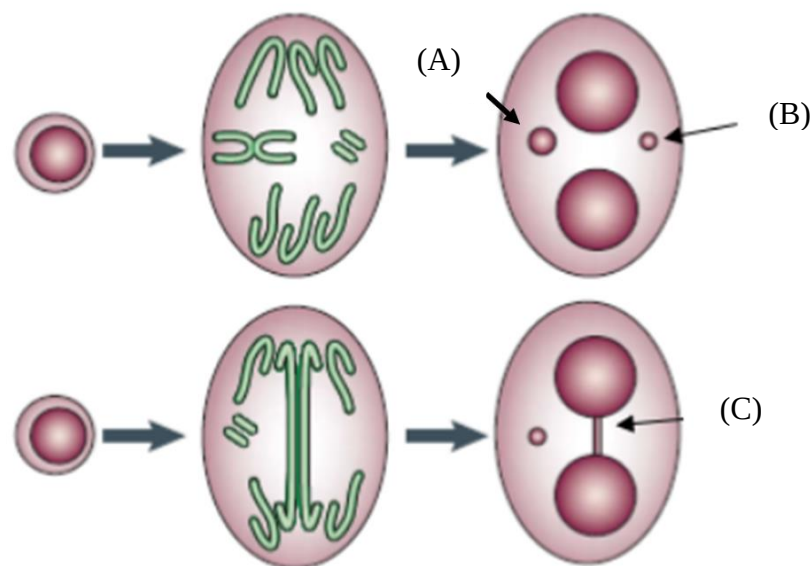


Figura 7. Esquema que refleja la presencia de micronúcleos (MNs) y puentes nucleoplásmicos (NPBs) en células binucleadas (BNs). Los MN pueden contener cromátidas/cromosomas o fragmentos acéntricos (A y B). Los NPB (C) se forman por la interacción de los centrómeros de una misma cromátida dicéntrica con microtúbulos procedentes de polos opuestos. (Imagen adaptada de Fenech *et al.*, 2007)

4.2.2. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada (PCD, del inglés, *Programmed Cell Death*) es una forma de muerte celular, diferente de la necrosis, que requiere de gasto energético para completarse y no libera contenidos intracelulares al exterior. Ésta se caracteriza por una reducción del tamaño celular en las primeras fases, seguida de la evaginación de la membrana plasmática (en inglés *blebbing*) y fragmentación de la célula en los llamados “cuerpos apoptóticos”. Regula la homeostasis celular de tejidos durante el desarrollo, pero también a lo largo de la vida adulta del organismo.

Este proceso puede producirse de tres formas (**Figura 8**) (Elmore, 2007):

Vía intrínseca: El daño celular irreversible (como por daño excesivo al ADN) señala la célula para su destrucción mediante la despolarización de las membranas mitocondriales con la liberación de proteínas como el citocromo C, que acaban en la activación de una cascada de proteasas, llamadas caspasas. Estas caspasas ocasionan fragmentación y condensación del ADN.

Vía extrínseca: La señalización extracelular por parte de células citotóxicas (como linfocitos T CD8+ o NK) activa receptores de membrana de la familia de los receptores de TNFs y generan una cascada de señalización que termina en la activación de la misma ruta de caspasas que en la vía intrínseca.

Vía de las perforinas/granzimas: Alternativamente, los linfocitos citotóxicos también pueden ocasionar la apoptosis de células insensibles a la vía extrínseca liberando perforinas, abriendo poros en la membrana plasmática de la célula diana y liberando granzimas en su interior. Las granzimas actúan como proteasas que acaban activando la misma ruta de apoptosis que en la vía extrínseca.

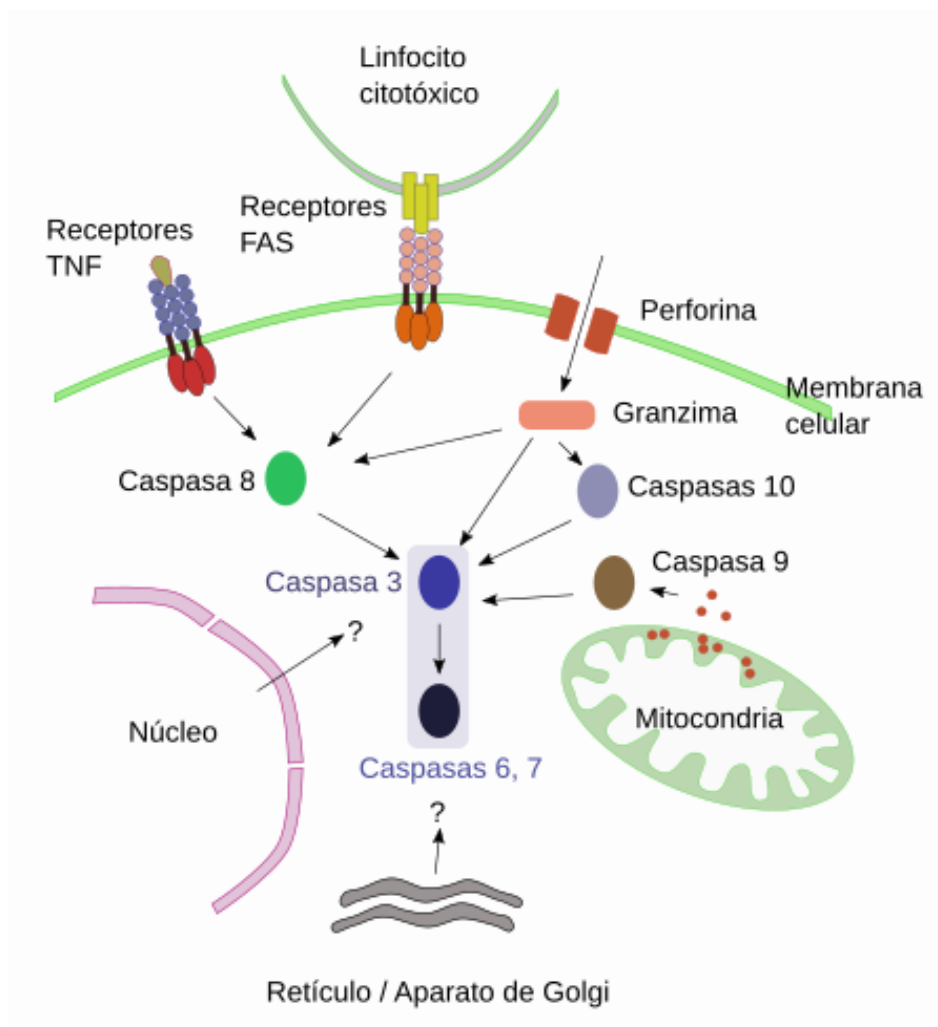


Figura 8. Esquema de las rutas de la apoptosis. Las células citotóxicas pueden causar la muerte celular por apoptosis por la vía extrínseca mediante activación de la familia de receptores de TNF o segregando perforinas y granzimas. Alternativamente, el daño celular irreparable causa la liberación de citocromo C del espacio intermembrana de las mitocondrias. Las tres rutas provocan una cascada de señalización mediante caspasas que convergen y causan la fragmentación del genoma celular y formación de cuerpos apoptóticos. (Imagen obtenida de <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/ampliaciones/8-apoptosis.php>)

Esta regulación es especialmente relevante en el sistema inmunitario, ya que los linfocitos inmaduros auto-reactivos son normalmente eliminados mediante PCD y los cuerpos apoptóticos generados son fagocitados. Durante el envejecimiento se puede observar una mayor resistencia a la apoptosis de forma generalizada en el organismo, lo que alteraría este equilibrio pudiendo causar mayor predisposición a enfermedades autoinmunes, así como a la inflamación crónica (Chong *et al.*, 2005; Aprahamian *et al.*, 2008; Devitt & Marshall, 2011). A su vez, una estimulación inmunitaria repetida puede

resultar en fenotipos anérgicos similares a la senescencia en los linfocitos T CD8⁺ CD28⁻, en los que se puede observar una elevada resistencia a la apoptosis *in vitro* (Chou & Effros, 2013).

Por tanto, la apoptosis es un proceso clave susceptible de sufrir graves alteraciones durante el envejecimiento.

Las mitocondrias, como intermediario en la vía intrínseca de la apoptosis (Esteve *et al.*, 1999), y más concretamente su capacidad de producir oxidantes, serían un factor clave en el mal funcionamiento de la apoptosis observado durante el envejecimiento (Simon *et al.*, 2000).

5. Enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento: enfermedad de Parkinson

El envejecimiento de la sociedad conlleva un aumento dramático de la prevalencia de diversas enfermedades, como es el caso de las neurodegenerativas. Esto ha hecho que en las últimas décadas se hayan dedicado amplios esfuerzos científicos para estudiar en profundidad la neurobiología del envejecimiento y la etiopatología de estas enfermedades

La enfermedad de Parkinson (EP) es una patología neurodegenerativa crónica descrita por primera vez hace más de 200 años por James Parkinson y caracterizada por síntomas mayoritariamente motores, como dificultad de coordinación fina, bradiquinesia, temblores en reposo, pero también se describen síntomas no motores, como dolor, parestesia y depresión (Massano & Bhatia, 2012; DeMaagd & Philip, 2015). Está relacionada con la edad y no cuenta con cura, sólo con tratamientos paliativos (Maarouf *et al.*, 2012).

Es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente en el mundo (después de la enfermedad de Alzheimer) afectando a más de un 1% de la población mayor de 50 años, lo que aumenta a un 1-3% si consideramos únicamente sujetos mayores de 80 años (Driver *et al.*, 2009; Massano & Bhatia, 2012; Pringsheim *et al.*, 2014). Además, presenta un claro dimorfismo sexual con una prevalencia de en torno a 2:1 de hombres frente a mujeres (Farhadi *et al.*, 2017).

Los mecanismos del desarrollo y progresión de la EP no son conocidos en su totalidad, pero se le reconoce un origen multifactorial. A pesar de que se han descrito marcadores genéticos, éstos sólo explicarían un 15% de los casos de la enfermedad (EP familiar), mientras que el restante 85% estaría causado por factores ambientales (EP idiopática), incluyendo el envejecimiento, actualmente el mayor factor de riesgo para la

aparición de enfermedades neurodegenerativas en general y para la EP en particular (Greenamyre & Hastings, 2004).

No existe ningún diagnóstico definitivo, sino que se basa en observaciones clínicas, cuando los síntomas son ya evidentes, pero desgraciadamente, para ese momento se estima que se han perdido entre el 50 y el 60% de las neuronas dopaminérgicas (Bezard *et al.*, 2001; Maarouf *et al.*, 2012). La confirmación es únicamente posible mediante un análisis neuropatológico post-mortem (Maarouf *et al.*, 2012). Se han realizado grandes esfuerzos para encontrar marcadores periféricos que faciliten su diagnóstico temprano y así poder realizar tratamientos a más largo plazo o incluso preventivos (Goetz *et al.*, 2004; Maarouf *et al.*, 2012). Sin embargo, dada la dificultad del diagnóstico temprano (fases I y II), resulta complicado encontrar marcadores de estas fases y la mayoría de los estudios se han realizado en fases avanzadas o en poblaciones de pacientes en los que hay distintos estadios de la enfermedad.

5.1. α -Sinucleína y cuerpos de Lewy

Neuropatológicamente se caracteriza por daño cerebral con la pérdida neuronal de la *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) reduciéndose su capacidad de producción de dopamina (DA) (Forno, 1996), así como por la presencia de agregados citoplásmicos proteicos globulares de α -sinucleína y otras proteínas ubiquitinadas (llamados “cuerpos de Lewy”) en el interior de las neuronas (Braak *et al.*, 2004; Bendor *et al.*, 2013). Estos cuerpos de Lewy se acumularían progresivamente, tanto por errores en el plegamiento de proteínas, como por un descenso de la eliminación de las mismas (Ambrosi *et al.*, 2014; Araki *et al.*, 2019).

5.2. Disfunción mitocondrial y ROS

Además de la acumulación anormal de agregados proteicos, en la EP, como pasa en otras enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer y de Huntington), se ha observado también una desregulación de la respiración mitocondrial, con la disfunción del complejo I de la cadena respiratoria. Esto causa un estrés oxidativo y acumulación de daño oxidativo a las macromoléculas celulares (Hauser & Hastings, 2013; Bose & Beal, 2016), siendo ese estrés oxidativo el primer factor patogénico que se hipotetizó como causante de la EP (Olanow, 2007). De hecho, en pacientes de fases avanzadas de la enfermedad, se ha detectado una menor actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPx o GR, así como un agotamiento de las reservas de GSH y una mayor oxidación a lípidos, proteínas y ADN en sus cerebros (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Sanyal *et al.*, 2009; Venkateshappa *et al.*, 2012).

Junto a este desbalance en el estado redox, algunos autores han observado una capacidad proteolítica disminuida por deficiencias en la formación de un correcto proteasoma (McNaught *et al.*, 2003). Además, la α -sinucleína presenta capacidad inhibitoria de la autofagia (Winslow *et al.*, 2010), de modo que se dificultaría la correcta eliminación de proteínas mal plegadas, así como el reciclaje de las mitocondrias disfuncionales por mitofagia. Todo ello aceleraría la generación de ROS, la acumulación de cuerpos de Lewy y, por tanto, la progresión de la enfermedad (Janda *et al.*, 2012).

Adicionalmente, algunos autores han mostrado evidencias de que una desregulación en la respiración mitocondrial y signos de estrés oxidativo pueden ser detectados en fluido cerebroespinal, en eritrocitos de pacientes con EP o en células del sistema inmunitario periférico, antes incluso de un diagnóstico clínico del sistema nervioso central (Vranová *et al.*, 2010; Colamartino *et al.*, 2014; Ide *et al.*, 2015;

Annesley *et al.*, 2016). Sin embargo, estos cambios en el estado redox de pacientes de EP en fases tempranas de la enfermedad no se han podido estudiar en profundidad.

5.3. Disfunción del Sistema Inmunitario

Junto con las características antes comentadas (acúmulos de cuerpos de Lewy, disfunción mitocondrial, etc), se ha observado que el avance de la EP está acelerado por la neuroinflamación, causada por la activación de células de glía e infiltración de linfocitos T en el cerebro, asociado a un aumento de la liberación de citoquinas proinflamatorias. Además, se ha detectado una inflamación periférica mediada por el sistema inmunitario en pacientes con EP y en modelos animales de esta patología (McGeer & McGeer, 2004; Hirsch & Hunot, 2009).

De hecho, diversos estudios han demostrado que la EP se acompaña de alteraciones de las funciones del sistema inmunitario, tanto de las innatas como de las adaptativas (Stone *et al.*, 2009; Kannarkat *et al.*, 2013; Joshi & Singh, 2018), así como de la desregulación de la red de citoquinas y cambios en las subpoblaciones de células del sistema inmunitario periférico (Scalzo *et al.*, 2011; Wheeler *et al.*, 2014).

Por tanto, el uso de marcadores inmunitarios obtenidos de sangre completa supone una forma accesible de estudiar y monitorizar el avance de la EP, pudiendo dar lugar a predictores de la severidad y progresión de la enfermedad.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

La edad es un importante factor de riesgo para muchas enfermedades. Por ello, comprender los mecanismos mediante los que se desarrolla el envejecimiento y las enfermedades asociadas al mismo, ayudará a tratar y prevenir el declive de las funciones fisiológicas que se observan con la edad.

Diversos estudios indican que algunos parámetros de los sistemas homeostáticos (nervioso, endocrino e inmunitario) son útiles para la determinación de la edad biológica e indicativos de buena salud y longevidad. Hasta ahora nuestro grupo de investigación ha realizado abundantes trabajos al respecto, pero pocos estudios analizan estos marcadores de manera longitudinal en ratones macho de cepa ICR-CD1, debido a su dificultad de estabulación. Recientemente, se ha comprobado que ciertos parámetros conductuales, de función y estado redox de células inmunitarias en ratones hembra ICR-CD1 adultas permiten desarrollar modelos matemáticos que determinan la esperanza de vida de cada individuo. Sin embargo, se desconoce cuáles de estos parámetros pueden ser utilizados para tal fin en el caso de los ratones macho.

Se han propuesto numerosas variables fisiológicas como marcadores de velocidad de envejecimiento y edad biológica, pero pocos marcadores genéticos que permitan medirla. Por ello las inserciones de fragmentos de ADNmt en el núcleo y la frecuencia de MNs/NPBs se presentan como buenos candidatos para el estudio de la inestabilidad cromosómica relacionada con el envejecimiento y posibles marcadores de edad biológica.

Debido a la dificultad que entraña un diagnóstico en estadios tempranos de la enfermedad de Parkinson, pocos estudios analizan los parámetros de función inmunitaria y estrés oxidativo en fase II. Esto puede ser clave para entender mejor los mecanismos del proceso de envejecimiento y su implicación en esta enfermedad neurodegenerativa, así como para poder establecer estrategias y tratamientos adecuados en estadios tempranos.

HIPÓTESIS

En base a lo comentado se han planteado las siguientes 3 hipótesis:

1. Existen variables bioquímicas, de función inmunitaria, de estrés oxidativo y conductuales en ratones macho de la cepa ICR-CD1 que pueden ser marcadores de velocidad de envejecimiento y que en la edad adulta permitan la predicción de la longevidad individual, existiendo diferencias con los equivalentes obtenidos en hembras.
2. Asociado al envejecimiento hay un aumento en la frecuencia de las inserciones de ADNmt en el núcleo y en la de micronúcleos (MNs) y/o de puentes nucleoplásmicos (NPBs), los cuales pueden ser marcadores de la velocidad de envejecimiento, en linfocitos T peritoneales de ratones hembra de la cepa ICR-CD1.
3. Las personas mayores con enfermedad de Parkinson de fase temprana (fase II), presentan diferencias con individuos sanos de equivalente edad cronológica, en la función inmunitaria y estado redox de sus células de sangre periférica, que pueden ser utilizadas como marcadores tempranos del desarrollo de esta patología.

OBJETIVOS

Para dar respuesta a las hipótesis planteadas, se establecen los siguientes objetivos:

1. Analizar los cambios en una serie de parámetros bioquímicos, de función inmunitaria, y estrés oxidativo, en un estudio longitudinal a lo largo del envejecimiento, en ratones macho de la cepa ICR-CD1.
2. Generar modelos matemáticos de predicción de esperanza de vida a partir de datos obtenidos en los parámetros bioquímicos, de función inmunitaria, estado redox, y combinación de los mismos, en la edad adulta de ratones macho de la cepa ICR-CD1, y comprobar su capacidad predictiva.
3. Estudiar las diferencias conductuales en la edad adulta entre ratones macho y hembra y establecer la capacidad predictiva del modelo matemático generado en machos con las variables conductuales, estableciendo comparaciones con lo obtenido en hembras.
4. Estudiar los parámetros citogenéticos: “inserciones de ADNmt en el núcleo” y “frecuencia de MNs y NPBs” en linfocitos T peritoneales de ratones hembra de la cepa ICR-CD1 como posibles nuevos marcadores de edad biológica.
5. Analizar la función inmunitaria y estado oxidativo de células de sangre periférica de pacientes mayores en fase temprana (fase II) de la enfermedad de Parkinson y establecer comparaciones con individuos sanos de equivalente edad cronológica, así como con adultos sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Humanos

Para la realización de la presente tesis doctoral, se recogieron muestras de sangre de pacientes humanos según los protocolos detallados en el apartado [6.1.](#) para los estudios de Parkinson.

1.2. Animales de experimentación

Para los estudios longitudinales se trabajó con ratones (*Mus musculus*) machos y hembras de la cepa ICR-CD1. Su número, sexo y edad se detalla en cada uno de los apartados de los correspondientes diseños experimentales ([5.2.](#)). Todos los animales se obtuvieron de Janvier Labs (Alemania) y todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con el Real Decreto 1201/2005 del 21 de octubre de 2005 (BOE nº 252) sobre la protección de animales, de acuerdo con las directrices indicadas por el *European Community Council* 2010/63/EU para experimentación y por autorización del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid (proyecto PROEX 373/2015). Los animales de experimentación se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid) con alimento a base de pienso estándar (Teklad, Envigo, Madison WI, EEUU) y agua corriente *ad libitum* y a una temperatura constante de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo invertido (12 h: 12 h, con apagado de luces a las 8:00h).

1.3. Líneas celulares

Se emplearon líneas celulares tumorales YAC-1, procedente de leucemia linfoblástica de ratón, cedidas por el laboratorio de Inmunología del Hospital de Alcalá de Henares, y la línea K562, procedente de leucemia linfoblástica humana (Sigma-Aldrich), para el análisis de la actividad citotóxica *NK* en los estudios con humanos y ratones, respectivamente. Ambas líneas celulares se mantuvieron en ultracongelación a -80°C en alícuotas de 3×10^6 células/mL en medio completo suplementado al 10% con dimetil sulfóxido (DMSO) como agente crioprotector.

2. Reactivos y kits comerciales

Se emplearon los siguientes reactivos comerciales para la elaboración de soluciones y medios:

- Ácido clorhídrico al 37% (HCl) (PANREAC).
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (SIGMA-ALDRICH).
- Ácido perclórico al 60 % (HClO₄) (SIGMA-ALDRICH).
- Agua destilada y ultrapura (MILLIPORE).
- Albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA-ALDRICH).
- Azul tripán, solución al 0,4% (SIGMA-ALDRICH).
- Azul de Eosina (PANREAC APPLICHEM).
- Azur-Eosina-Azul de Metileno, solución según GIEMSA (PANREAC).
- Bicarbonato sódico (NaHCO₃) (PANREAC).
- Citocalasina B (SIGMA-ALDRICH).
- Cloruro cálcico (CaCl₂) (PANREAC).
- Cloruro magnésico (MgCl₂) (PANREAC).
- Cloruro potásico (KCl) (PANREAC).
- Cloruro sódico (NaCl) (PANREAC).
- Colchicina (SIGMA-ALDRICH)
- Concanavalina A (ConA, SIGMA-ALDRICH).
- D(+)-Glucosa (C₆H₁₂O₆) (PANREAC).
- DPX medio de montaje (SIGMA-ALDRICH).
- Dihidrógeno fosfato de potasio (KH₂PO₄) (PANREAC).
- Dimetilsulfóxido anhidro (DMSO) (MERCK).
- Etanol (PANREAC).

- Ficoll Histopaque de densidad 1,077 g/mL (SIGMA-ALDRICH).
- Ficoll Histopaque de densidad 1,119 g/mL (SIGMA-ALDRICH).
- Filtros de fibra de vidrio.
- Fitohemaglutinina (PHA) procedente de *Phaseolus vulgaris* (SIGMA-ALDRICH).
- *FlexiGene*® DNA kit (QIAGEN).
- Gentamicina (10mg/mL) (PAA).
- Glutación oxidado (GSSG) (SIGMA-ALDRICH).
- Glutación reducido (GSH) (SIGMA-ALDRICH).
- Glutación reductasa (GR) (SIGMA-ALDRICH).
- Hematoxilina de Carazzi (PANREAC APPLICHEM).
- Hidrógeno fosfato de sodio (Na_2HPO_4) (PANREAC).
- Hidrógeno fosfato de magnesio (MgHPO_4) (PANREAC).
- Hidróxido sódico (NaOH) (PANREAC).
- Hidroperóxido de cumeno (SIGMA-ALDRICH).
- Kit ácido bicinconínico (BCA) (SIGMA-ALDRICH).
- Kit colorimétrico para actividad citotóxica (PROMEGA).
- Lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) (SIGMA).
- Líquido de centelleo Última Gold XR (PERKIN ELMER).
- Malondialdehído (MDA, Sigma-Aldrich)
- Metanol (PANREAC).
- N-etilmaleimida (NEM) (SIGMA-ALDRICH).
- n-butanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida (NADPH) (SIGMA-ALDRICH).

- *Nick Translation* Kit (SIGMA-ALDRICH).
- O-ftalaldehido (OPT) (SIGMA-ALDRICH).
- Partículas de látex, poliestireno (SIGMA-ALDRICH), de 1,1 μm de diámetro.
- Péptido formilado (N-Formyl-Met-Leu-Phe; fMLP) de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH).
- *QIAquick® PCR Purification Kit* (QIAGEN).
- Solución de Türk (MERCK).
- Sonda pancentromérica comercial de ratón marcada con fluorescenina (StarFISH)
- Suero fetal bovino (FBS) (PAA).
- *Taq PCR Master Mix Kit* (QIAGEN).
- Timidina tritiada (^3H -Timidina) (MP) con 35 Ci/mmol de actividad específica ajustado con PBS estéril a 0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$.
- Tritón X-100 (SIGMA-ALDRICH).
- Vectashield® *antifade* con DAPI (H- 1200, VECTOR LABORATORIES).
- Vial microbeta CS/3000 (PERKIN-ELMER).

3. Medios y soluciones

3.1. Medios comerciales

- RPMI 1640 con L-glutamina (20mM) y HEPES (25mM) (*HyClone*).
- RPMI 1640 sin L-Glutamina y con Hepes (25mM) (*HyClone*).
- RPMI 1640 con L-Glutamina y sin rojo fenol (*HyClone*).

Estos medios se mantuvieron en condiciones de esterilidad a 2-8°C para su conservación.

3.2. Medios preparados

Se prepararon los siguientes medios y soluciones:

Tampón fosfato

Disolución de hidrógeno fosfato de sodio (Na_2HPO_4) 50mM y dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) 45mM y pH 7,4.

Tampón fosfato con EDTA

Disolución de hidrógeno fosfato de sodio (Na_2HPO_4) 50mM, dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) 45mM, EDTA 6,3mM y pH 7,4.

Tampón fosfato para glutación

Disolución de tampón fosfato (50 mM) con EDTA (0,1 M) ajustado a pH 8

Tampón de fosfato salino (PBS)

Disolución de cloruro sódico (NaCl) 123,2mM, hidrógeno fosfato de sodio (Na_2HPO_4) 10,84mM, dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) 3,23mM y pH 7,4.

Medio de Hank

Disolución de D(+)-Glucosa 5,55mM, cloruro magnésico (MgCl_2) 1mM, cloruro sódico (NaCl) 137mM, cloruro potásico (KCl) 5,36mM, cloruro cálcico (CaCl_2) 1,26mM, hidrógeno fosfato de magnesio (MgHPO_4) 0,8mM, dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) 0,44mM, hidrógeno fosfato de sodio (Na_2HPO_4) 0,42mM y bicarbonato sódico (NaHCO_3) 4,16mM y pH 7,4.

Medio completo

RPMI 1640 con L-Glutamina y suplementado con 10% en volumen de suero fetal bovino descomplementarizado (FBS) (*HyClone*) (calentando 30 min en baño a 56°C) y 1% de Gentamicina.

Solución de citrato sódico

Disolución de NaCl 300mM y citrato de sodio (30mM) en agua destilada, a pH 7,0.

Solución de TBA

Disolución de 250 mg de TBA en 7,5 mL de ácido acético glacial. Tras la completa disolución del TBA, se lleva a 25 mL con agua destilada para alcanzar una concentración final de 10 mg/mL.

Tampón TBE

Disolución de Tris (89 mM), ácido bórico (89 mM), EDTA (2 mM) y pH 8,3.

4. Material de laboratorio y aparataje

4.1. Material de laboratorio

- Cámaras de Boyden. Cilindros de metacrilato con compartimentos superior e inferior de 13 mm de diámetro externo, 9 mm de diámetro interno y 5 mm de altura cada uno. El superior se encuentra abierto por ambas caras, mientras que el inferior sólo por una y cuenta con una apertura a un lado del tamaño de una aguja.
- Columnas de adherencia. Pipeta Pasteur de vidrio con 50 mg de fibra de nylon en su interior a lo largo de 1,25 cm.
- Cubetas de vidrio óptico y de cuarzo de 10 mm de paso óptico.
- Fibra de nylon (DU PONT).
- Filtros de nitrocelulosa (MILLIPORE). De 33 mm de diámetro y 0,22 μm de diámetro de poro, para la esterilización de medios.
- Filtros de nitrocelulosa (MILLIPORE) de 13 mm de diámetro y 3 μm de diámetro de poro, para las pruebas de quimiotaxis.
- *Flask* de cultivo de 15 mL (NUNC).
- Gradillas.
- Guantes de nitrilo.
- Hemocitómetro de Neubauer (BLAU BRAND).
- Materiales de plástico: jeringuillas desechables, tubos (FALCON), puntas de pipetas automáticas, tubos (EPPENDORF), parafilm, etc.
- Material de vidrio: tubos de ensayo milimetrados, pipetas Pasteur, portaobjetos, cubreobjetos, probetas, vasos de precipitados, termómetros, etc.
- Papel de filtro para recolector de células (SKATRON INSTRUMENTS).

- Pipetas automáticas (BOECO y GILSON).
- Placas de 96 pocillos con fondo plano transparentes y de fondo en U transparentes (NUNC).
- Placas de 96 pocillos negras y de fondo plano (NUNC).
- Placas MIF (KARTELL) de 8 pocillos (1,5 cm de diámetro).

La esterilización de material de efectuó en autoclave a 120 °C y 1 atmósfera de presión durante 1 hora. Para el material que no puede ser sometido a autoclave (placas MIF, pipetas automáticas, etc.), se empleó luz ultravioleta durante 20 minutos antes de su utilización.

4.2. Aparataje

- Accutrend Plus Medidor Glucosa Triglicéridos Colesterol. (ACCUTREND)
- Agitador magnético (BOECO).
- Autoclave (SELECTA).
- Balanzas de precisión (METTLER TOLEDO y BOECO).
- Baño termostatzado con agitación (MEMMERT).
- Bomba de vacío (MILLIPORE).
- Cabina de flujo laminar vertical AV-100 (TELSTAR).
- Centrífugas con refrigeración para tubos de vidrio (HERAEUS; HETTICH ZENTRIFUGEN).
- Congelador de -20°C (LIEBHERR) y de -80°C (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC y THERMO SCIENTIFIC).
- Contador de radiación β MicroBeta² (PERKIN-ELMER).
- Filtrado de agua destilada y agua ultrapura MilliQ (MILLIPORE).
- Dispensador de hielo picado (SCOTSMAN).

- Espectrofotómetro (THERMO SPECTRONIC).
- Espectrofotómetro y Fluorímetro de placas (BMG).
- Frigoríficos de 4°C (FAGOR y LYNX).
- Granatario (PRECISA INSTRUMENTS).
- Incubadoras termostatzadas con CO2 regulable (SELECTA y HERAEUS).
- Microscopio óptico invertido (PLEUGER).
- Microscopio óptico (NIKON).
- Microscopio de epifluorescencia BX60 (OLYMPUS)
- pH-metro (XS INSTRUMENTS) con electrodo (HAMILTON).
- Recolector semiautomático de células (SKATRON INSTRUMENTS).
- Sonicador (BANDELIN SONOPULS).
- Termociclador *LabCycler* (SENSOQUEST).

5. Diseños experimentales

5.1. Diseños experimentales en humanos

5.1.1. Participantes

Para el estudio llevado a cabo en humanos, se seleccionaron 45 pacientes con enfermedad de Parkinson (EP) en grado II (mujeres/hombres, 15/30; edad media $\pm$ SD: 67 ± 12 años), así como 34 mayores sanos (mujeres/hombres, 24/10; edad media $\pm$ SD: 74 ± 11 años) y 20 voluntarios adultos sanos (mujeres/hombres, 10/10; edad media $\pm$ SD: 40 ± 8 años) reclutados por el Dr. José Antonio Molina en el Departamento de Neurología del Hospital 12 de Octubre de Madrid, España, y fueron examinados mediante una batería estandarizada de pruebas neuropsicológicas. El diagnóstico de la EP se realizó de acuerdo a los criterios del *U.K. Parkinson's Disease Brain Bank* y se clasificaron según la escala *Hoehn and Yahr (HY)* (Goetz *et al.*, 2004; Vandenberg *et al.*, 2009). Se excluyeron pacientes con síntomas parkinsonianos debido a parkinsonismo vascular o inducido por medicinas o toxinas, así como a todos aquellos con disfunción renal, hepática o cardíaca, cáncer, malabsorción, enfermedades autoinmunes o infecciones. Todos los pacientes fueron sometidos a supervisión clínica y examen físico.

En el grupo de pacientes con EP grado II hubo 40 pacientes diagnosticados, pero que todavía no habían sido medicados y 5 pacientes medicados con L-DOPA, durante más de 6 meses.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices y regulaciones de la Declaración de Helsinki.

Los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética en la Investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas Hospital 12 Octubre

(código: ES280790001164). Se recogió el consentimiento informado de todos los participantes y sus representantes.

5.1.2. Parámetros analizados

En este estudio se analizaron las **funciones inmunitarias** de leucocitos de sangre periférica (capacidades de **adherencia, quimiotaxis y fagocítica de neutrófilos** y de **adherencia, quimiotaxis, citotóxica y proliferativa de linfocitos**), las actividades de las **enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa**, así como el contenido de **glutatión reducido, glutatión oxidado y malondialdehído**.

5.2. Diseños experimentales en ratones

5.2.1. Características de los ratones y condiciones de estabulación

Para los experimentos longitudinales con ratones macho (*Mus musculus*) de la cepa ICR-CD1 se adquirieron recién destetados (4 semanas de vida) y se mantuvieron vírgenes, pues su agresividad hacia individuos desconocidos impedía la utilización de animales criados en entornos diferentes. Por otro lado, los ratones hembra, al no mostrar tales signos de agresividad con convivientes desconocidas, fueron adquiridas siendo ya exreproductoras (30±4 semanas de edad).

Todos los animales de experimentación se estabularon en condiciones de temperatura constante de 22±1°C, 50-60% de humedad relativa y ciclo luz/oscuridad, invertido, 12h:12h (con apagado de luces a las 8 am), con acceso a agua corriente y comida estándar prensada (Envigo Teklad, Envigo, Madison WI, EEUU) *ad libitum*, agrupándose un máximo de 8 ratones por jaula (dimensiones: 21,5 cm x 46,5 cm x 14,5 cm).

Dado que los datos de esperanza de vida son difíciles de recopilar en humanos, debido a su larga esperanza de vida, los ratones, que tienen una longevidad media de

alrededor de dos años, son más adecuados para el estudio y validación de biomarcadores para la predicción de la longevidad.

Se empleó una cohorte de 65 ratones macho en la que se analizó la variación de una serie de parámetros de bioquímica sanguínea (corte de cola), inmunitarios y de estado redox, en leucocitos peritoneales, a las edades: adulta (40 ± 4 semanas), vieja (72 ± 4 semanas), muy vieja (96 ± 4 semanas) y longeva (120 ± 4 semanas) (a esta edad no se analizó la bioquímica sanguínea por no poder hacerse adecuadamente el corte de la cola) (**Figura 9**). Con los datos recogidos en la edad adulta (40 ± 4 semanas), se generaron los modelos matemáticos bioquímico, inmunitario, redox y combinado para la predicción de la longevidad, como se indicará más adelante. En todos los casos se trabajó con los ratones en horario de 8:30-12:00h, para evitar en lo posible la incidencia del ritmo circadiano en los resultados.

Tras las fechas de toma de muestras establecidas, se dejó a los ratones en las mismas condiciones de estabulación hasta la siguiente fecha de toma o hasta su fecha de muerte natural, momento en el que se retira el animal de la jaula, y se anota para conocer la “longevidad” de cada animal.

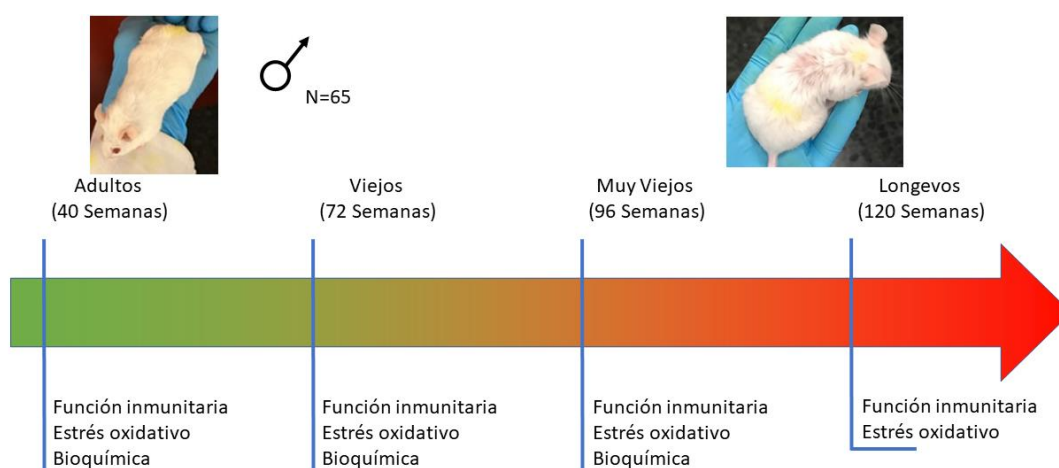


Figura 9. Esquema de planificación de experimentos en ratones macho para estudios longitudinales.

5.2.2. Estudio conductual comparativo entre machos y hembras adultas

Para estudiar las diferencias conductuales que presentan machos y hembras de ratones, se emplearon 43 de estos ratones macho y 45 hembras a la edad adulta (40 semanas) para el estudio y comparación de parámetros conductuales y la generación del modelo conductual. Se sometió a estos ratones a pruebas de conducta únicamente en la edad adulta, para evitar efectos de memoria en posteriores pruebas. Posteriormente se dejaron envejecer a ambas cohortes, registrando su fecha de muerte natural. A partir de los datos conductuales a la edad adulta se generó un quinto modelo de predicción de la longevidad (“modelo conductual”), como se indica seguidamente.

5.2.3. Parámetros analizados

Se midió y analizó la **respuesta conductual** de ratones adultos y la **bioquímica sanguínea**, parámetros de **función inmunitaria**, y **estrés oxidativo** de leucocitos peritoneales de forma longitudinal en los ratones macho.

Se valoró la **respuesta conductual** de ratones adultos, tanto machos como hembras, a las pruebas del **laberinto en T**, **el EPM** y **del HB** a la edad adulta.

Respecto a la **bioquímica**, se midieron las concentraciones que presentaban los ratones de **glucosa**, **colesterol** y **triglicéridos** en sangre.

La **función inmunitaria** se valoró cuantificando las **capacidades quimiotáctica** y **fagocítica de macrófagos** peritoneales, y **quimiotáctica** y **proliferativa de linfocitos** peritoneales, así como la **actividad NK**.

Y como medidas de estrés oxidativo, se midió la actividad de las **enzimas GPx** y **GR**, así como las concentraciones de las moléculas **GSSG**, **GSH** y **MDA**, y el **cociente** que existe entre las concentraciones de GSSG y GSH.

5.2.4. Generación de nuevos modelos matemáticos de predicción de longevidad en machos

Se generaron modelos matemáticos a partir de los datos obtenidos en los parámetros bioquímicos, inmunológicos y de estado redox, del estudio longitudinal en ratones macho, así como de los conductuales de la otra cohorte de ratones macho utilizados para este fin. Para generar tales modelos se siguió un método de regresión lineal múltiple (MLR, por sus siglas en inglés) con el programa estadístico SPSS 23 (IBM SPSS *Statistics*) por el método del “paso adelante”. Este método incluye inicialmente al modelo matemático la variable (variable independiente) que más correlacione con la longevidad observada (variable dependiente), y posteriormente agrega las siguientes variables más predictivas, con un límite de significación de $p < 0,05$.

5.2.5. Estudio de nuevos marcadores de envejecimiento en hembras

Para la caracterización de nuevos marcadores de envejecimiento se empleó una cohorte de 5 ratones hembra de la cepa ICR-CD1. En cada uno de ellos se cuantificó la presencia de inserciones de ADNmt y se calculó la frecuencia de MNs y de NPBs en linfocitos T obtenidos a distintas edades a lo largo del proceso de envejecimiento. Los leucocitos peritoneales fueron obtenidos de cada uno de los 5 ratones a la edad adulta (40 ± 4 semanas), madura (56 ± 4 semanas) y vieja (72 ± 4 semanas) (**Figura 10**).

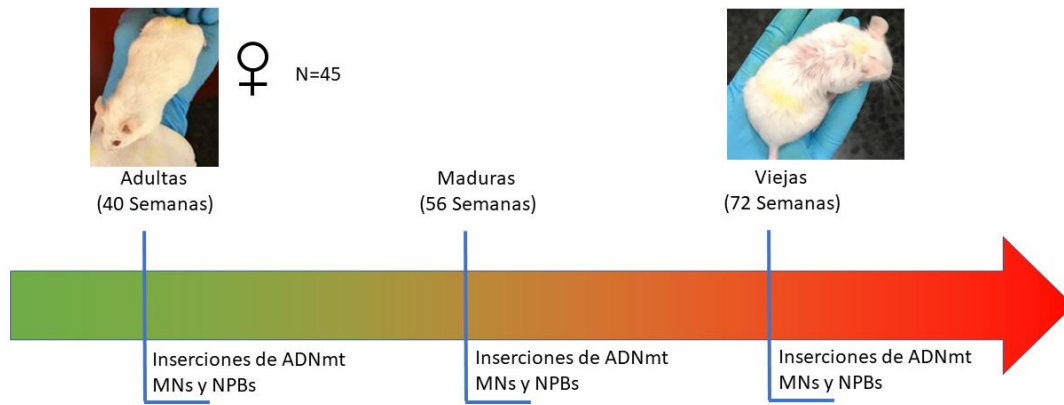


Figura 10. Esquema de toma de muestras en ratones hembra para el estudio longitudinal de los parámetros: “inserciones de ADNmt en el núcleo” y “frecuencia de MNs y NPB”.

6. Métodos

6.1. Colección de células sanguíneas periféricas y aislamiento de neutrófilos y linfocitos sanguíneos en muestras humanas

Se recogieron muestras de sangre periférica humanas (10 mL) utilizando tubos Vacutainer con citrato de sodio (BD Diagnostic, Madrid, España). La extracción de sangre se realizó entre las 8:00h y las 11:00h para evitar variaciones circadianas en los parámetros inmunológicos.

Se utilizaron 8 mL de sangre periférica para el aislamiento de leucocitos polimorfonucleares (principalmente neutrófilos) y mononucleares (principalmente linfocitos) siguiendo un método descrito anteriormente (De la Fuente *et al.*, 2008).

Brevemente, los neutrófilos y linfocitos se aislaron utilizando gradientes de Ficoll Histopaque de densidades 1,077 y 1,119 g/cm³ (Sigma-Aldrich, Madrid, España), y tras la centrifugación a 700 g durante 50 min, se obtuvieron dos halos de células (**Figura 11**). El halo superior contenía las células mononucleares (linfocitos) y el inferior los neutrófilos.

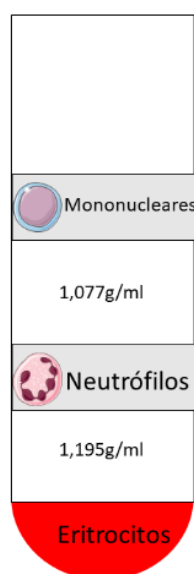


Figura 11. Esquema de separación de células monocíticas (linfocitos) y células polimorfonucleares (neutrófilos) a partir de sangre periférica.

Las células recogidas en cada uno de ellos, mediante una pipeta Pasteur de vidrio, se contaron en cámaras de Neubauer y se ajustaron las concentraciones finales a 10^6 células/mL para la realización de los diferentes ensayos de función inmunitaria con los medios descritos en cada apartado. Estos ensayos se realizaron con células en fresco inmediatamente después de ajustar las concentraciones. La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de exclusión por tinción con azul tripán, y en todos los casos la misma fue superior a un 97%.

Para la determinación de los parámetros de estado redox se congelaron alícuotas de sangre completa (200 μ L para la medición de actividad GPx, 100 μ L para GR, 50 μ L para GSSG y GSH y 100 μ L para MDA) y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso, como se describe en la sección 6.5.

6.2. Obtención de leucocitos peritoneales en ratones

Los leucocitos peritoneales de ratón se obtuvieron mediante lavado peritoneal, siguiendo un método previamente descrito (Guayerbas *et al.*, 2002; Arranz *et al.*, 2010a).

Brevemente, se inmovilizó a cada ratón sujetándolo con un pellizco de piel de la nuca y espalda y, tras desinfectar la zona con etanol al 70%, se inyectaron un total de 3mL de medio de Hank estéril atemperado a 37°C de manera intraperitoneal. Posteriormente, mediante un suave masaje, se fue extrayendo el líquido introducido por el mismo agujero de entrada y se recogió en un tubo de ensayo graduado y estéril.

Se contabilizó la concentración de linfocitos y macrófagos en el líquido extraído mediante hemocitómetro de Neubauer, evaluando la viabilidad mediante colorante vital azul tripán, y se ajustó a la concentración requerida con los medios correspondientes que se describirán en cada apartado.

6.3. Pruebas conductuales en ratones

Con el fin de analizar el funcionamiento del sistema nervioso en ratones, se recurrió a pruebas de comportamiento, las cuales proporcionan datos baratos, no invasivos y de fácil acceso (Gilad & Gilad, 1995; Dellu *et al.*, 1996).

6.3.1. Laberinto en T

La prueba del laberinto en T permite analizar la conducta que muestran los ratones cuando son expuestos a un ambiente novedoso.

Consiste en un recinto en forma de T con un brazo corto (sección vertical) de 27 cm x 10 cm y un brazo largo (sección horizontal) de 64 cm x 10 cm, todo ello rodeado de paredes verticales de 19 cm. La base de todo el laberinto está formada por cilindros metálicos de 0,5 cm de diámetro transversales a la dirección del brazo con espacios intermedios de 0,5 cm (**Figura 12**).



Figura 12. Prueba del laberinto en T

Cada ratón se introduce, sujetado por la base de la cola en la parte cerrada del brazo corto mirando hacia la pared, bajo luz roja y se contabilizó el tiempo en segundos que

tardaron en cruzar con las patas traseras el cilindro metálico que marca la intersección entre los brazos.

6.3.2. Laberinto en cruz elevado (EPM)

El EPM valora el nivel de ansiedad que presenta el ratón, dada su aversión a las alturas y a los espacios abiertos (De Cabo de Vega et al., 1995). Este laberinto, adquirido en Panlab (España), consiste en una estructura de madera negra en forma de cruz con dos brazos abiertos opuestos (BA) y dos brazos cerrados opuestos (BC), cada uno de 30 cm x 5 cm. Los BC están rodeados en tres lados por paredes de madera negra de 40 cm de altura, mientras que los BA carecen de paredes. Estos brazos se cruzan en una plataforma central (PC) también de color negro que mide 5 cm x 5 cm. La estructura está elevada a 40 cm del suelo.

Después de un período de aclimatación a la sala de experimentación de 1 hora, los ratones fueron colocados individualmente en la plataforma central frente a un BA y se dejó que exploraran libremente durante 5 minutos bajo luz roja con un foco blanco brillante de 75 W (**Figura 13**). Este tiempo de 5 minutos, contados a partir del momento en el que los ratones se colocan en el laberinto, parece ser el ideal para detectar las conductas de ansiedad (de Cabo de la Vega *et al.*, 1995).

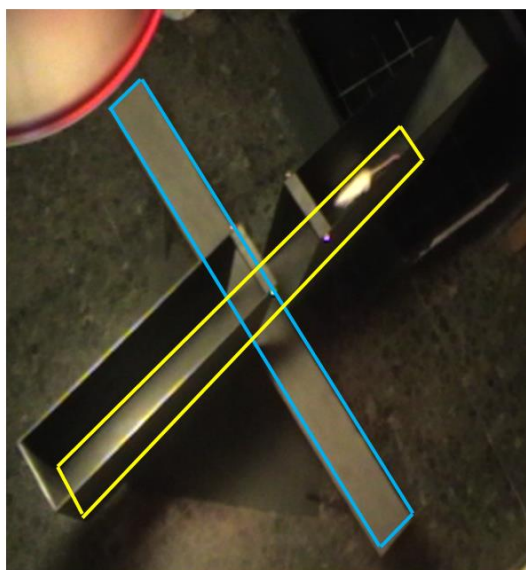


Figura 13. Laberinto en cruz elevado. La región marcada en amarillo determina los segmentos que componen los brazos cerrados (BC), mientras que la región en azul determina los segmentos que componen los brazos abiertos (BA). A su vez, la intersección entre ambos determina la plataforma central (PC).

Para asegurar una interferencia mínima por parte del experimentador, éste abandona la sala donde se encuentra el laberinto, grabándose la prueba en vídeo. Esta grabación se utilizó para obtener los parámetros del tiempo total invertido en los BA, el tiempo total empleado en los BC, el tiempo total invertido en la PC, así como el número de entradas en cada tipo de sección, teniendo en cuenta una entrada cuando las cuatro patas se colocaron en el mismo (**Tabla 1**).

Tabla 1. Variables medidas en la prueba conductual del EPM	
Parámetro	Descripción
Tiempo en la PC	Tiempo (s) de permanencia en la plataforma central bajo los criterios de cuatro patas
Tiempo en BA	Tiempo (s) de permanencia en cualquiera de los brazos abiertos bajo los criterios de cuatro patas
Tiempo en BC	Tiempo (s) de permanencia en cualquiera de los brazos cerrados bajo los criterios de cuatro patas
Nº de entradas en la PC	Número de entradas a la plataforma central desde cualquier brazo
Nº de entradas en BA	Número de entradas a los brazos abiertos desde la plataforma central
Nº de entradas en BC	Número de entradas a los brazos cerrados desde la plataforma central

6.3.3. Tablero con agujeros (HB)

El HB es un tablero negro de forma cuadrada (60 cm x 60 cm x 45 cm) dividida en 36 cuadrados (10 cm x 10 cm), con cuatro orificios circulares (3,8 cm de diámetro) en las esquinas de los cuatro cuadrados centrales, cada uno de los cuales contiene un objeto plástico blanco para motivar la inspección de ratones, todo ello rodeado por paredes de madera negra de 40 cm de altura (**Figura 14**).

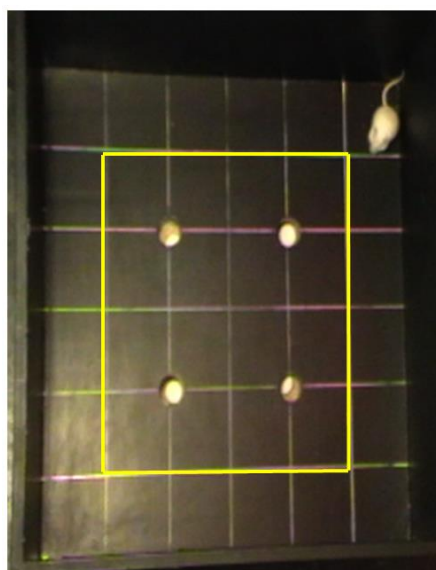


Figura 14. Tablero con agujeros. La región marcada en amarillo divide el tablero en la región interna y la región externa.

Cada uno de los 6 cuadrados adyacentes a un lado de pared se consideraron "externos" (20 en total) y el resto, cuadrados "internos" (16 en total).

Los ratones fueron colocados uno por uno en una esquina mirando a la pared y se les dejó explorar libremente durante 5 minutos bajo la luz roja con un foco blanco brillante de 75W y sus movimientos fueron grabados en video.

Los parámetros analizados en esta prueba aparecen descritos en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Resumen de los parámetros estudiados en cada una de las pruebas	
Parámetro	Descripción
Locomoción total	Número total de cuadrados cruzados
Locomoción interna	Número de cuadrados cruzados en la región interna
Locomoción externa	Número de cuadrados cruzados en la región externa
Porcentaje de locomoción interna (%)	Porcentaje de la locomoción realizada en la región interna
Porcentaje de locomoción externa (%)	Porcentaje de la locomoción realizada en la región externa
Número de <i>rearings</i> con apoyo	Número de posturas erguidas del cuerpo sobre las patas traseras con un ángulo mayor a 45° (<i>rearing</i>) y apoyándose en la pared
Duración total de <i>rearings</i> con apoyo (s)	Duración total de posturas de <i>rearing</i> apoyándose en la pared
Número de <i>rearings</i> sin apoyo	Número de posturas de <i>rearing</i> sin apoyarse en la pared
Duración total de <i>rearings</i> sin apoyo (s)	Duración total de posturas de <i>rearing</i> sin apoyarse en la pared
Número de <i>head-dippings</i>	Número de exploraciones de los agujeros del tablero (<i>head-dipping</i>)
Duración total de <i>head-dippings</i> (s)	Duración total de <i>head-dippings</i>
Número de <i>groomings</i>	Número de posturas en las que el ratón se acicala (<i>groomings</i>)
Duración total de <i>groomings</i> (s)	Duración total de posturas de <i>grooming</i>

6.4. Funcionalidad Inmunitaria

Respecto a la función inmunitaria de ratones, se valoraron las **capacidades de quimiotaxis y de fagocitosis de macrófagos** peritoneales, **quimiotáctica y proliferativa de linfocitos** peritoneales, así como la **actividad NK** de leucocitos peritoneales.

En muestras procedentes de participantes humanos, se midió la **capacidad de adherencia de neutrófilos y linfocitos** de sangre periférica, la **quimiotaxis** y la **fagocitosis** de los **neutrófilos** y la **quimiotaxis, linfoproliferación y capacidad citotóxica NK** de sus **linfocitos** de sangre periférica.

6.4.1. Capacidad de adherencia de neutrófilos y linfocitos de sangre periférica humana

La evaluación de la capacidad de adherencia de neutrófilos y linfocitos de sangre periférica humana se realizó siguiendo el método descrito anteriormente por McGregor y colaboradores (1974) con ligeras modificaciones (Vida *et al.*, 2018). En una pipeta Pasteur de vidrio se introdujeron 50 mg de fibra de nylon de manera homogénea a lo largo de 1,25 cm de altura aproximadamente, para simular el epitelio vascular. Se efectuó un recuento inicial de leucocitos con el microscopio óptico a 40 aumentos, para lo cual se empleó una mezcla de sangre diluida al 50% con medio de Hank. Posteriormente a 100 μL de esta dilución se le añadieron 900 μL de medio de Türk, para lisar los eritrocitos, teñir los linfocitos de células polimorfonucleares (leucocitos totales). Un mL de la dilución original al 50% de la sangre se hizo pasar por la pipeta Pasteur dejando que la mezcla atravesara la fibra de nylon, donde se adhieren linfocitos y neutrófilos imitando el proceso fisiológico de adhesión al endotelio. Después de 10 min, se recogió y diluyó el eluido en las mismas proporciones con medio de Türk, realizando un recuento con microscopio óptico a 40 aumentos mediante hemocitómetro de Neubauer diferenciando los neutrófilos o linfocitos eluidos, y calculando el índice de adherencia (I.A.) según la **Ecuación 1:**

Ecuación 1:

$$IA = \frac{\text{neutrófilos o linfocitos} \frac{\text{totales}}{\text{mm}^3} - \text{neutrófilos o linfocitos eluidos/mm}^3}{\text{neutrófilos o linfocitos totales/mm}^3} \times 100$$

6.4.2. Capacidad de quimiotaxis de fagocitos y linfocitos humanos y de ratón

Para analizar la movilidad inducida o quimiotaxis de neutrófilos, macrófagos y linfocitos se evaluó la capacidad de migración de las células frente a un gradiente quimiotáctico, de acuerdo con el método desarrollado por Boyden (1962) con ligeras modificaciones (Vida *et al.*, 2018).

Esta técnica está basada en la capacidad de las células de migrar a través de un filtro de 3 μm de diámetro de poro, que separa los dos compartimentos cilíndricos de una cámara Boyden sellados e inmovilizados con plastilina. Como compuesto quimioatrayente se empleó el péptido formilado f-met-phe-leu de *E. coli* (Sigma-Aldrich).

Las suspensiones celulares se ajustaron con medio de Hank a 10^6 células/mL en el caso de las células mononucleares y polimorfonucleares para los ensayos con sangre periférica de humanos y a 5×10^5 células/mL en el caso de linfocitos y macrófagos de ratón. Se depositaron 300 μL de estas suspensiones en el compartimento superior de las cámaras Boyden separado del inferior por un filtro de policarbonato de 3 μm . El compartimento inferior se rellena de 400 μL de quimioatrayente diluido en medio de Hank (fMLP, 10^{-8} M).

Las cámaras Boyden se incubaron a 37°C con humedad a saturación. Una vez transcurridas 3 h, se retiraron los filtros y se fijaron en metanol 50% 4 min, etanol 70% 4 min, se lavaron con agua destilada 2 min y se tiñeron con azul de eosina durante 20 min. Tras la tinción, se retiró el exceso de colorante lavando los filtros con abundante agua corriente y se depositaron sobre portaobjetos con la cara inferior orientada hacia arriba. Los filtros se cubrieron con cubreobjetos y sellaron con laca de uñas. El índice quimiotáctico (I.Q.) se calculó contando, mediante el objetivo 100x con aceite de

inmersión, el número de células (neutrófilos o linfocitos aislados, en el caso de muestras humanas o diferenciando morfológicamente macrófagos de linfocitos, en el caso de muestras de ratón) que migraron a la cara inferior del filtro (orientada hacia arriba) en el equivalente a un tercio del área de éste.

6.4.3. Capacidad fagocítica de neutrófilos humanos y macrófagos de ratón

La fagocitosis de partículas inertes (bolas de látex de 1,1 μm de tamaño, Sigma-Aldrich) se midió en fagocitos (neutrófilos sanguíneos aislados o macrófagos peritoneales) siguiendo un método descrito previamente (De la Fuente, 1985; De la Fuente *et al.*, 2004b, 2008).

Brevemente, 200 μL de una solución de neutrófilos humanos (10^6 neutrófilos/mL) o de suspensión peritoneal de ratón (5×10^5 macrófagos/mL), se dispensaron en los pocillos de placas MIF. Se incubaron a 37°C con humedad a saturación para permitir la adhesión de los fagocitos a la superficie de plástico. Transcurridos 45 min aproximadamente se retiró el sobrenadante que contenía las células no adherentes mediante un lavado suave con una pipeta Pasteur de plástico y se añadieron 200 μL por pocillo de medio de Hank fresco. Se añadieron 20 μL de suspensión de partículas de látex al 1% en PBS y se incubó en las mismas condiciones antes indicadas durante 30 min. Pasado ese tiempo, se retiró el sobrenadante conteniendo las partículas no fagocitadas mediante un lavado fuerte con jeringuilla, se fijaron las células de las preparaciones depositando metanol al 50% en los pocillos de la placa MIF durante 4 min, posteriormente se tiñeron en solución de azul de Giemsa durante 15 min, se retiró el colorante con abundante agua corriente y se dejaron secar al aire.

La capacidad fagocítica se evaluó contando el número de bolas de látex que han ingerido 100 fagocitos (neutrófilos humanos o macrófagos de ratón) mediante

observación al microscopio óptico a 100 aumentos con aceite de inmersión. Se consideró la Eficacia Fagocítica (E.F.%) como el número de fagocitos que han ingerido al menos una partícula de látex, y el Índice Fagocítico (I.F.) como el número total de bolas ingeridas por 100 células fagocíticas.

6.4.4. Capacidad proliferativa de linfocitos humanos y de ratón

La capacidad proliferativa de los linfocitos de sangre periférica humana y los presentes en la suspensión peritoneal se evaluó mediante técnicas previamente estandarizadas en nuestro laboratorio (De la Fuente *et al.*, 2004a, 2008; Alvarado *et al.*, 2006). La proliferación fue cuantificada valorando la incorporación de ^3H -timidina al ADN de linfocitos, y se realizó tanto en condiciones basales como en presencia de mitógenos. Se utilizaron como mitógenos fitohemaglutinina (PHA) y lipopolisacárido (LPS), para las muestras humanas, y Concanavalina A (ConA) y LPS, para las de ratón. Estos mitógenos se conservaron congelados a -20°C , se disolvieron en medio completo hasta concentraciones de $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ en el momento de su uso.

Las suspensiones de linfocitos, ajustadas a 5×10^5 linfocitos/mL de medio completo en el caso de los ratones y a 10^6 linfocitos/mL en los humanos, se sembraron poniendo $200\text{ }\mu\text{L}$ /pocillo en una placa multipocillo estéril de fondo plano. Posteriormente se añadieron $20\text{ }\mu\text{L}$ de medio completo en los pocillos destinados a medir proliferación espontánea y $20\text{ }\mu\text{L}$ de las soluciones mitogénicas en los pocillos para medir proliferación inducida (concentración de trabajo de $1\text{ }\mu\text{g/mL}$). Se incubó la placa en estufa estéril a 37°C , atmósfera con 5% de CO_2 y humedad a saturación durante 48 h. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Transcurrido ese tiempo, se retiraron $100\text{ }\mu\text{L}$ de sobrenadante del cultivo de cada pocillo, que se conservó congelado a -80°C para la medición de citoquinas. Se repuso el medio retirado con medio completo fresco y se añadieron $7,5\text{ }\mu\text{L}$ de ^3H -timidina a una concentración final de $0,5\text{ }\mu\text{Ci}$ por pocillo y se continuó la

incubación durante 24 h más, tras lo cual se recogieron las células de los pocillos en filtros de fibra de vidrio con el recolector de células semiautomático. Los filtros se dejaron secar al aire y se introdujeron en tubos con líquido de centelleo para cuantificar su radiactividad en el contador de radiactividad beta. La incorporación de ^3H -timidina, tanto en las condiciones basales como con estimulación por ambos mitógenos, se cuantificó en cuentas por minuto (c.p.m.) y los resultados se expresan en cpm y en % de estimulación (considerando 100% a la c.p.m. en condiciones basales).

6.4.5. Capacidad citotóxica NK

La actividad citotóxica *Natural Killer* (NK) se evaluó mediante un ensayo colorimétrico enzimático (Cytotox 96 TM Promega, Boehringer Ingelheim, Biberach, Alemania) basado en la determinación de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada por la lisis de las células diana (células de linfoma K562 humanas o de linfoma de ratón Yac-1), como se describió previamente por De la Fuente y colaboradores (2020). Los resultados se expresaron como el porcentaje de células tumorales muertas (% lisis).

Las células tumorales correspondientes se conservaron congeladas en DMSO a -80°C , y se descongelaron, utilizando medio completo, una semana antes de ser utilizadas. Para ello, se lavaron 2 veces, centrifugando a 400 g durante 10 min y 4°C , retirando el sobrenadante y resuspendiendo en medio completo para retirar el DMSO de la congelación. En la última resuspensión, las células se depositaron en *flasks* con 10 mL de medio completo y se mantuvieron a 37°C en atmósfera estéril y con humedad a saturación hasta ser utilizadas. Las suspensiones de células tumorales se mantuvieron a la densidad celular adecuada, para lo cual se fueron distribuyendo en *flasks* y renovando el medio cada 3 o 4 días.

Para la prueba, las células tumorales se centrifugaron en las mismas condiciones anteriormente descritas, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en medio RPMI sin

rojo fenol. Se realizó un recuento de las células en hemocitómetro Neubauer y se ajustaron a 10^5 células/mL células vivas con RPMI sin rojo fenol, constituyendo la suspensión de células diana. Los linfocitos de sangre humana y la suspensión peritoneal de ratón se ajustaron a 10^6 linfocitos/mL RPMI sin rojo fenol (para muestras humanas) y 10^6 leucocitos totales/mL para ratón. Estas fueron las células efectoras. En todas las suspensiones celulares se llevó a cabo la prueba de exclusión de azul tripán, para cuantificar la viabilidad, que en todos los casos fue superior al 98%.

Se realizaron las pruebas en placas multipocillo de 96 con fondo en U añadiendo en cada pocillo por triplicado los siguientes volúmenes (**Tabla 3**).

Tabla 3. Volúmenes de los pocillos para evaluar la actividad citotóxica			
Tipo	RPMI sin rojo fenol (μL)	Células Diana (tumoraes) (μL)	Células Problema (μL)
Pocillos control efectoras	100	-	100
Pocillos experimentales	-	100	100
Pocillos control diana	100	100	-
Pocillos control lisis total	100	100	-

Se incubó la placa en estufa a 37°C durante 4 h, pero transcurridas 3 h y 15 min se añadieron 20 μL de tampón de lisis a los pocillos control total mezclando bien, para conseguir la lisis completa, y se devolvió la placa a la estufa hasta completarse las 4 h. Tras esto, se centrifugó la placa a 300 g y 4°C durante 5 min para precipitar las células que no se hubieran lisado, se recogieron 50 μL de sobrenadante de cada pocillo y se transfirieron a una placa multipocillo de 96 de fondo plano.

Se añadieron 50 μL de sustrato del kit de actividad citotóxica y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se detuvo la reacción con solución de *stop*, se eliminaron las posibles burbujas y se midió la absorbancia a 492 nm.

La capacidad citotóxica de la muestra se expresa como % Lisis, calculado según la fórmula:

$$\%Lisis = \frac{experimental - control\ efectoras - control\ diana}{control\ total - control\ diana} \times 100$$

6.5. Estrés oxidativo

6.5.1. Actividad de Glutación Reductasa (GR)

La actividad de la enzima glutación reductasa (GR) se midió mediante el método descrito por Massey y Williams (1965), en el que la actividad es proporcional a la velocidad de desaparición de NADPH, medida espectrofotométricamente a 340 nm, que ocurre durante el ciclo descrito en la **Figura 15**.

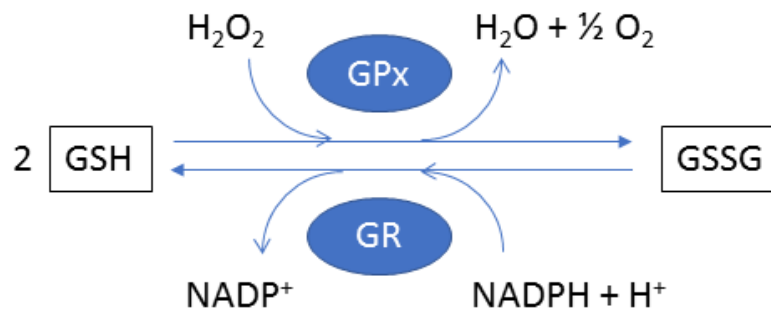


Figura 15. Esquema de las reacciones implicadas en el ciclo del glutación. El glutación reducido (GSH) se transforma en glutación oxidado por la enzima glutación peroxidasa (GPx) reduciendo diversos peróxidos como el H₂O₂. El glutación oxidado (GSSG) que se genera con la reacción anterior es devuelto a su forma reducida mediante la enzima glutación reductasa (GR) consumiendo NADPH.

Para la valoración de la actividad GR, se siguió una metodología previamente descrita (Martínez de Toda *et al.*, 2019b), utilizando en ratones 10⁶ leucocitos peritoneales recién obtenidos, que se dispensaron en tubos *eppendorf* y se centrifugaron a 400g durante 10 min a 4°C; y en el caso de muestras humanas, se emplearon alícuotas congeladas de 100 µL de sangre completa (conteniendo leucocitos totales, así como eritrocitos). Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en tampón fosfato con EDTA,

previamente burbujeado con helio durante 10 min para retirar oxidantes atmosféricos. Las muestras se lisaron por sonicación con una intensidad del 70% durante 10s con 20s de reposo manteniendo las muestras en hielo en 3 rondas. Se volvieron a centrifugar a 3200 rpm durante 20 min a 4°C para precipitar los restos celulares y se conservó el sobrenadante donde se encontraba la enzima a medir.

Se prepararon disoluciones de GSSG 80 mM y NADPH 6 mM con el mismo tampón fosfato con EDTA. Para descontar la oxidación basal de NADPH que pueda producirse no causada por la enzima, se midió la actividad no catalizada de la misma mezcla sin contener la enzima glutatión reductasa (**Tabla 4**) y posteriormente se cuantificó la actividad catalizada (**Tabla 5**).

Tabla 4. Composición de la reacción no catalizada

V(μL) no catalizada	Tampón (μL)	Muestra (μL)	GSSG 80mM (μL)	NADPH 6mM (μL)
Blanco	700	-	-	-
Reacción	630	-	35	35

Tabla 5. Composición de la reacción catalizada

V(μL) catalizada	Tampón (μL)	Muestra (μL)	GSSG 80mM (μL)	NADPH 6mM (μL)
Blanco	650	50	-	-
Reacción	580	50	35	35

Las mezclas de reacción atemperadas a 37°C en baño de agua se midieron a 340 nm durante 4 min a intervalos de 40 s.

Se midió la cantidad total de proteína, en el extracto peritoneal de ratón y en el de la sangre humana, mediante un kit de ácido bicinonínico y se expresó como unidades de actividad por miligramo de proteína total del extracto (U/mg), según la **Ecuación 2**.

Ecuación 2:

$$Actividad (U/mg) = \frac{pte * Vtotal}{\epsilon * Cp * Vmuestra}$$

Siendo:

- Pte: Pendiente de la disminución de absorbancia con el tiempo ($\Delta DO/min$)
- V_{total} : Volumen total en la cubeta de reacción
- $V_{muestra}$: Volumen de muestra empleado en cada reacción
- ϵ : Coeficiente de extinción molar de NADPH ($6,22 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- Cp : Concentración de proteína total de la muestra (mg/mL)

Los resultados se expresaron como unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína (proteína U_{GR}/mg).

6.5.2. Actividad de Glutación Peroxidasa (GPx)

La actividad de enzima GPx se evaluó empleando la técnica descrita inicialmente por Lawrence y Burk (1976) con ligeras modificaciones (Alvarado *et al.*, 2006; Martínez de Toda *et al.*, 2019b). La actividad glutación peroxidasa es proporcional a la pendiente de la pérdida de absorbancia de NADPH a 340 nm, calculada según la **Ecuación 2**.

Se utilizaron alícuotas de 10^6 leucocitos peritoneales de ratón que fueron centrifugadas 10 min a 400 g y 4°C, y, en el caso de muestras humanas, alícuotas congeladas de 200 μL de sangre completa (conteniendo leucocitos totales, así como eritrocitos). En ambos casos se resuspendieron en un volumen final de 200 μL con tampón fosfato previamente burbujado con helio para retirar el oxígeno disuelto y se lisaron las células por sonicación en 3 rondas al 70% de intensidad durante 10 s alternándose con reposos de 20 s en un baño de hielo.

Los productos de sonicación fueron centrifugados a 3200 g durante 20 min a 4°C para precipitar los restos celulares y se aisló el sobrenadante que contenía la fracción

soluble, de la que se midió la actividad enzimática y que se mantuvo en hielo hasta su utilización.

La actividad enzimática de esta fracción soluble se evaluó de forma indirecta utilizando como sustratos hidróperóxido de cumeno y NADPH en su forma reducida y añadiendo enzima glutatión reductasa a una concentración de 1 U/mL a la solución reactiva (**Tabla 6**).

Tabla 6. Componentes de la solución reactiva disuelta en tampón fosfato.	
EDTA	1mM
Azida Sódica	4mM
GSH	4mM
NADPH	0,2mM
GR (enzima glutatión reductasa)	1U/mL

De nuevo, se descontó la oxidación basal no catalizada por la enzima mediante una reacción de la misma mezcla sin contener la enzima GPx.

Se preparó una disolución de hidróperóxido de cumeno en tampón fosfato al 10% y se midieron las actividades de oxidación no enzimática (Tabla 7) y enzimática (**Tabla 8**) del NADPH.

Tabla 7. Composición de la reacción no catalizada			
V(μL) no catalizada	Solución reactiva (μL)	Tampón (μL)	Cumeno (μL)
Blanco	700	25	-
Reacción	630	25	25

Tabla 8. Composición de la reacción catalizada			
V(μL) catalizada	Solución reactiva (μL)	Muestra (μL)	Cumeno (μL)
Blanco	700	25	-
Reacción	630	25	25

Las mezclas de reacción atemperadas a 37°C en baño de agua se midieron a 340 nm durante 5 min a intervalos de 40s. La actividad fue proporcional a la velocidad de disminución de la absorbancia a 340 nm dada por la disminución de concentración de NADPH. El contenido proteico de las muestras fue igualmente evaluado con el kit de

ácido bicinconínico. La actividad por unidad de masa de proteína fue calculada según la **Ecuación 2** y expresada como U_{GPx}/mg .

6.5.3. Concentración de Glutación

Las concentraciones de glutación tanto oxidado (GSSG) como reducido (GSH) se determinaron por el método fluorimétrico descrito por Hissin y Hilf (1976) con posteriores modificaciones (Garrido *et al.*, 2018; Martínez de Toda *et al.*, 2019b).

Este método emplea la capacidad del o-ftalaldehído (OPT) para reaccionar con GSSG a pH 12 y con GSH a pH 8 para dar lugar a un compuesto fluorescente ($\lambda_{excitación}=350\text{ nm}$ y $\lambda_{emisión}=420\text{ nm}$).

Para esto se trabajó con alícuotas de 10^6 leucocitos de suspensión peritoneal de ratón, o 50 μL de sangre completa congelada (conteniendo leucocitos, así como eritrocitos) en el caso de humanos. Estas muestras se precipitaron centrifugando a 400 g durante 10 min y 4°C en tubos eppendorf. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 100 μL de tampón fosfato para glutación. Estas suspensiones se lisaron por sonicación en las mismas condiciones ya descritas y se añadieron 400 μL del mismo tampón hasta un volumen final de 500 μL . De esta disolución se midió el contenido proteico mediante el kit de ácido bicinconínico para expresar la cantidad de glutación en nmol/mg.

Una vez recogidas las alícuotas para medir proteína, se desproteinizaron las muestras lisadas añadiendo 5 μL de HClO_4 60% y se agitó vigorosamente la muestra. Se precipitaron las proteínas desnaturalizadas centrifugando las muestras a 10000 g durante 10 min a 4°C, y se conservaron los sobrenadantes en hielo hasta su utilización.

Para evitar la oxidación de GSH a pH 12, se inhibió la oxidación de GSH mezclando 10 μL de cada muestra con 12 μL de NEM 5 mg/mL directamente en la placa de 96 pocillos de fondo oscuro, donde se realizó la medición, y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

Tras la incubación se alcalinizó cada pocillo añadiendo 178 μL de solución de NaOH (0,1 M pH 12) y 20 μL de disolución de OPT (1 mg/mL en metanol 99%) en oscuridad. Se incubó la placa en oscuridad y temperatura ambiente durante 15 min más y se midió la fluorescencia de emisión a 420 nm con absorción a 350 nm.

La forma reducida del glutatión se determinó añadiendo 10 μL de cada muestra y 190 μL de tampón fosfato para glutatión a una placa de 96 pocillos de fondo oscuro. A continuación, se añadieron 20 μL de OPT a cada pocillo en oscuridad y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Tras ese tiempo, se midió la fluorescencia de emisión a 420 nm con absorción a 350 nm.

6.5.4. Concentración de Malondialdehído (MDA)

La peroxidación lipídica se valoró utilizando un kit comercial (Biovision, Milpitas, CA, EE. UU.), que indica medir la concentración de malondialdehído (MDA) mediante la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA). De esa reacción se obtiene un producto detectable colorimétricamente a 532 nm (**Figura 16**).

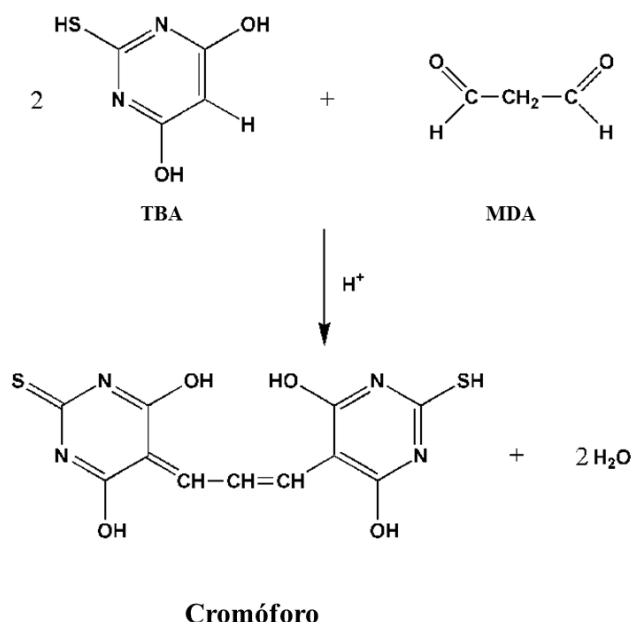


Figura 16. Esquema de la reacción del malondialdehído (MDA). El MDA y el ácido tiobarbitúrico (TBA) reaccionan para originar un producto MDA-TBA detectable por colorimetría a 535 nm

Se emplearon alícuotas de 10^6 leucocitos de suspensión peritoneal de ratón, y alícuotas congeladas de 100 μL de sangre completa humana. Las alícuotas fueron resuspendidas en 300 μL de tampón fosfato con 0,1 mM de hidroxitolueno butilado (BHT), se lisaron por sonicación en las mismas condiciones ya descritas y se centrifugaron a 13000 g durante 10 min para precipitar los restos celulares. A 200 μL de estos sobrenadantes se añadieron 600 μL de solución de TBA y se incubaron en un baño de agua a 95°C durante 60 min. Tras enfriar las muestras en hielo durante 10 minutos, se añadieron 300 μL de n-butanol y se mezclaron con vórtex para extraer el producto MDA-TBA en la fase orgánica. La separación se completó mediante centrifugación de las muestras a 400 g durante 15 min a 4°C y se retiraron 200 μL de la fase orgánica, que se dispensaron directamente en una placa de 96 pocillos para medir la absorbancia a 532 nm. Como patrón se empleó MDA a concentraciones entre 0,1 mM y 0,025 μM .

De la misma manera ya descrita previamente, se midió la concentración de proteína de las muestras y se expresó la concentración de MDA en $\text{nmol}_{\text{MDA}}/\text{mg}_{\text{proteína}}$.

6.6. Pruebas bioquímicas

La concentración de compuestos bioquímicos de sangre periférica de ratón se midió mediante Accutrend Plus con tiras desechables específicas para glucosa, colesterol y triglicéridos. Se mojó la almohadilla de una tira desechable con una gota de sangre extraída de una pequeña incisión en la punta de la cola del animal en ayuno nocturno.

Este procedimiento se realizó posteriormente a finalizar todas las pruebas anteriormente descritas para evitar las alteraciones que el ayuno o el estrés del corte pudieran provocar en el resto de los ensayos.

Se obtuvieron mediciones de los ratones macho a las edades adulta (40 semanas), vieja (72 semanas) y muy vieja (96 semanas), pero no a la longeva, ya que el corte en la cola de la incisión a la edad muy vieja no había cicatrizado completamente.

6.7. Análisis y cuantificación de inserciones de fragmentos de ADNmt en el genoma nuclear

En este estudio se detectó y cuantificó la presencia de inserciones de ADNmt en el ADNn de linfocitos T obtenidos a partir de suspensiones peritoneales enriquecidas en estas células, obtenidas en la edad adulta (40 ± 4 semanas), madura (56 ± 4 semanas) y vieja (72 ± 4 semanas). Asimismo, se analizó la localización cromosómica de dichas inserciones utilizando sondas específicas para secuencias mitocondriales y (peri)centroméricas de ratón marcadas con fluorescencia mediante la técnica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*).

6.7.1. Obtención de suspensiones celulares enriquecidas en linfocitos T

Se depositaron 300 μ L de la suspensión peritoneal, extraída como se indica en el apartado 6.2, sobre placas MIF previamente esterilizadas. Al cabo de 45 minutos a 37°C en incubador se recogieron los sobrenadantes enriquecidos en células no adherentes (linfocitos T) y se cuantificaron en hemocitómetro de Neubauer con microscopio óptico de 40 aumentos. Estas suspensiones se ajustaron con medio completo hasta una concentración de 10^6 linfocitos/mL (concentración de trabajo) antes de proceder a su fijación.

6.7.2. Obtención de células en metafase mitótica.

Para el estudio de la localización cromosómica de las inserciones de los fragmentos mitocondriales, algunas de las células se sometieron a un tratamiento con colchicina con el objetivo de acumular células en metafases mitóticas. Para ello, se estimuló la división celular con el agente mitogénico específico de linfocitos T de ratón Concanavalina A (ConA 1 μ g/ μ L) como se describe en el apartado 6.4.4, incubando la placa en condiciones de esterilidad a 37°C, en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO₂.

A las 41-42 h de cultivo, se añadió la colchicina (0,1 µg/mL), sometiendo a las células a este tratamiento durante 4h a 37°C, tras el cual fueron fijadas.

6.7.3. Fijación

Las células obtenidas de los apartados 6.7.1 y 6.7.2 se fijaron inmediatamente añadiendo una solución de metanol:ácido acético (3:1 v/v) hasta completar el mililitro de volumen, seguido de precipitación de las células centrifugando a 900 r.p.m. durante 7 minutos, retirando el sobrenadante hasta 200 µL tras la centrifugación. Se repitió este proceso 3 veces.

Las muestras con la solución de fijación se conservaron 24 h a 4°C y posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

6.7.4. Obtención de la sonda para detectar secuencias mitocondriales

Se amplificó por PCR una región del genoma mitocondrial de 1841pb (1841MT). Dicho fragmento fue detectado en el citoplasma de ratones irradiados y descrito previamente por Patrushev y colaboradores (Patrushev *et al.*, 2004). Para ello, se aislaron las mitocondrias de hepatocitos de ratones de la misma cepa ICR-CD1 por el método descrito por Rickmond (1987) y se aisló su ADNmt por el método descrito por Latorre (1986). Para la amplificación del fragmento 1841MT se utilizaron los cebadores indicados en la **Tabla 9** mediante el kit *Taq PCR Master Mix*, partiendo de cada cebador a concentraciones de 0,2 µM y 100ng de ADN molde. El programa de PCR que se empleó fue:

- 95°C 3 min
- 20 ciclos:
 - 95°C 30 s
 - 65°C 1:30 min
- 15 ciclos:
 - 95°C 30 s
 - 60°C 1:30 min
- 72°C 7 min

La presencia de los productos de PCR y su tamaño fueron confirmados por electroforesis en gel de agarosa el 2,5%, con TBE 0,5X y a 70 V. Se purificaron con el *QIAquick® PCR Purification Kit* y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

6.7.5. Obtención de las sondas para detectar secuencias (peri)centroméricas MaSat y MiSat

Se aisló el ADN total de las suspensiones celulares enriquecidas en linfocitos T según el apartado 6.7.1 utilizando el kit *FlexiGene*. A partir de este ADN total, se amplificaron por PCR las secuencias centroméricas y pericentroméricas de ratón *Minor Satellite (MiSat)* y *Major Satellite (MaSat)*, respectivamente, utilizando los cebadores descritos en Garagna y colaboradores (2002), que se detallan en la **Tabla 9** y el mismo kit anteriormente descrito. Cada cebador se usó a una concentración 0,2 µM y se utilizaron 100 ng de ADN molde. Ambas secuencias se amplificaron utilizando los programas de PCR tipo *touch-down* que se describen a continuación.

El programa de PCR que se empleó para la amplificación de *MiSat* fue:

- 94°C 5 min
- 30 ciclos:
 - 95°C 30 s
 - 57°C 1 min, reduciendo la temperatura 0,5°C por ciclo
 - 72°C 1 min
- 15 ciclos:
 - 95°C 30 s
 - 55°C 1 min
 - 72°C 4 min

La amplificación de *MaSat* se realizó con el mismo *kit* y el siguiente programa de PCR:

- 95°C 3 min
- 20 ciclos:
 - 95°C 30 s
 - 65°C 1:30 min
- 15 ciclos:
 - 95°C 30 s
 - 60°C 1:30 min
- 72°C 7 min

Por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% en medio TBE 0,5X a 70 V se confirmó la correcta formación del producto y el tamaño de los amplicones (múltiplos de una secuencia que se repite en tándem de 240pb, en el caso de *MaSat*, y de 120pb, en el caso de *MiSat*). Los productos de amplificación se purificaron mediante el kit *QIAquick® PCR Purification Kit* y se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Tabla 9. Secuencias de los cebadores empleadas para las amplificaciones

Cebador	Secuencia Fwd	Secuencia Rvs
MaSat	5'-GGACCTGGAATTATGGCGAGAAA-3'	5'-TTCAGTGTGCATTTCTCATTTT-3'
MiSat	5'-CAATGAGTTACAATGAGAAACATGG-3'	5'-TGATATACACTGTTCTACAAATCCCG-3'
1841MT	5'-CCACTCATTTCATTGACCTACCTGCC-3'	5'-TAGGTGATTGGGTTTTCGCGACTA-3'

6.7.6. Secuenciación de los productos de amplificación

Los productos amplificados (1841MT, MaSat y MiSat) se enviaron a la Unidad de Genómica y Proteómica del Centro de Apoyo a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) para su secuenciación. Las secuencias se editaron mediante el programa BioEdit© (*Biological Sequence Alignment Editor*) y se analizaron con la herramienta BLAST© (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCIB (*National Centre for Biotechnology Information*).

6.7.7. Marcaje con fluorescencia de las sondas

Las tres secuencias amplificadas por PCR se marcaron con fluorescencia para ser utilizadas como sondas en una hibridación *in situ* sobre los núcleos de las suspensiones celulares enriquecidas en linfocitos T, obtenidas a partir del líquido peritoneal de los ratones. Se utilizó el kit *Nick Translation Kit* y los nucleótidos modificados tetrametil-rhodamina-5-dUTP (rojo) y fluoresceína-12-dUTP (verde).

6.7.8. Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

Se depositaron 20 µL de la suspensión celular enriquecida en linfocitos T fijada en metanol:ácido acético sobre portaobjetos de vidrio. La correcta densidad celular se comprobó visualizando las preparaciones al microscopio de contraste de fase, dejando secar al aire 24 h. Pasado este tiempo, se realizó un protocolo de FISH doble, con distintas combinaciones de sondas de dos en dos, comenzando con una incubación con RNAsa 1µg/mL en 2XSSC a 37°C durante 1 hora, seguido de dos lavados de 5 min cada uno con 2XSSC a 37°C. Posteriormente, las células se trataron con una solución de pepsina

(0,12% pepsina y 0,02N HCl) a 37°C durante 15 minutos, tras los cuales las preparaciones se lavaron dos veces 5 min con PBS 1X y una vez con 2XSSC durante 5 minutos.

Después de los lavados, se realizó una fijación en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de tres lavados con 2XSSC de 5 min cada uno y deshidratación en una serie de alcoholes (etanol 70%, 90% y 100%) durante 3 min cada uno, tras lo cual se dejaron secar las preparaciones entre 30 y 75 min.

A continuación, se desnaturalizó el DNA de los núcleos mediante un tratamiento en formamida al 70% durante 15 minutos, sumergiendo las preparaciones inmediatamente después en etanol 100% a 4°C.

Para la desnaturalización de las sondas y su posterior hibridación, se preparó una mezcla de hibridación conteniendo formamida al 50%, sulfato de dextrano al 20%, SSC 20X al 10%, y una combinación de dos sondas marcadas. Tras 10 min a 95°C, la solución de hibridación se añadió a las preparaciones, dejándolas incubar en oscuridad a 37°C en cámara húmeda durante 24 horas.

Pasado ese tiempo, se realizaron lavados de astringencia, dos en formamida al 50% en 2XSSC seguido de otros dos en 2XSSC, todos a 45°C con una duración de 5 min en oscuridad.

Finalmente, las preparaciones se contratiñeron y montaron utilizando 10 µL de la solución Vectashield® con DAPI, depositando sobre ellas un cubreobjetos sellado con laca de uñas.

Las preparaciones se conservaron a 4°C en oscuridad hasta su posterior observación.

6.7.9. Observación de las preparaciones y cuantificación de la fluorescencia

Las preparaciones se visualizaron mediante un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 equipado con un eje Z motorizado y dotado de los filtros adecuados para recoger la emisión característica de cada uno de los fluorocromos empleados en el marcaje de las sondas. Las imágenes se tomaron a 100 aumentos con la cámara Olympus CCD DP70 acoplada al microscopio, a una resolución de 4080x3072 píxeles, usando el paquete de software DP Manager y DP Controller y convirtiéndolas a imágenes de 8 bits en escala de grises. Para cada célula, y cada fluorocromo, se obtuvieron *stacks* que contenían entre 10-13 imágenes tomadas en distintos planos a lo largo el eje vertical cada 0,5 micras. Se obtuvieron 100 *stacks* (50 para cada fluorocromo) por individuo y grupo de edad. La cuantificación de las señales de fluorescencia se realizó con el programa ImageJ® (NIH, Bethesda, Maryland, EEUU).

Para ello, se seleccionaron manualmente las regiones de interés y se cuantificó la señal de cada fluoróforo. Las señales de ADNmt fueron normalizadas frente a la señal detectada de MiSat para corregir posibles diferencias causadas por variaciones en la compactación de la cromatina en diferentes células, individuos o edades. La fluorescencia relativa correspondiente al ADNmt (FrMT) se cuantificó como la relación ADNmt/MiSat para 50 células por individuo y edad, aproximadamente.

6.8. Test de micronúcleos (CBMN assay)

Para cuantificar la formación de MNs y NPBs se empleó el *test Cytokinesis-Block Micronucleus assay* (CBMN assay), o *test* de MNs, desarrollado por Fenech (2007) con modificaciones menores. Esta prueba se basa en la inhibición de la citocinesis durante la mitosis para dar lugar a células binucleadas, cuyo citoplasma puede contener micronúcleos detectables por tinción con hematoxilina y eosina.

6.8.1. Cultivos celulares

Se obtuvieron leucocitos peritoneales a las distintas edades, adulta (40 semanas), madura (56 semanas) y vieja (72 semanas) según el protocolo detallado en 6.2 y se enriquecieron en linfocitos T siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.7.1. Estos extractos enriquecidos fueron ajustados a 10^6 de linfocitos/mL con medio completo estéril y depositados en placas multipocillo de 96 a razón de 200 μ L por pocillo. Se estimuló la división celular con el agente mitogénico específico de linfocitos T de ratón Concanavalina A (ConA 1 μ g/ μ L) como se describe en el apartado 6.4.4, incubando la placa en condiciones de esterilidad a 37°C, en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO₂.

A las 18 h desde el inicio de la estimulación mitogénica, se añadió el agente inhibidor de la citocinesis Citocalasina B (concentración final de 4,5 μ g/mL) a cada uno de los pocillos, recogándose las células 26 h más tarde y fijándolas como se indica en la sección 6.7.3.

6.8.2. Montaje de preparaciones de células binucleadas

Para la visualización de las células, se depositaron 20 μ L de la suspensión fijada de linfocitos T sobre un portaobjetos. Se dejó secar al aire durante 2 min y se comprobó el adecuado aspecto y densidad celular en un microscopio óptico de contraste de fase.

6.8.3. Tinción de las preparaciones

Las muestras del apartado anterior se hidrataron en agua corriente durante 10 min y se sumergieron en el colorante hematoxilina de Carazzi otros 10 min, se retiró el exceso con abundante agua corriente y se procedió a sumergir las preparaciones en eosina amarillenta durante 2 min. Se retiró el exceso de eosina con agua corriente y las preparaciones se deshidrataron en sucesivos baños de etanol 96% 15 s, etanol 100% 2

min dos veces, seguido de tres baños de xileno de 1 min por baño. Finalmente, las preparaciones se montaron con DPX y un cubreobjetos de vidrio y se conservaron a temperatura ambiente en oscuridad hasta que fueron observadas al microscopio óptico.

Adicionalmente, para evaluar la presencia de regiones centroméricas o teloméricas contenidas en los micronúcleos, se realizó en alguna de las preparaciones una FISH según el protocolo descrito en el apartado 6.7.8. Para ello, se empleó la sonda comercial de la secuencia pancentromérica de ratón marcada con fluoresceína (*StarFISH*), y la sonda telomérica de vertebrados (TTAGGG)_n marcada con rodamina.

6.8.4. Observación de las preparaciones

Las preparaciones se visualizaron con un microscopio óptico a 40 y 100 aumentos, analizando alrededor de 1800 células por individuo. Para el recuento de células BN que presentaban los marcadores de daño al DNA e inestabilidad cromosómica (MNs y NPBs), así como para la detección de células en apoptosis, se siguieron los criterios definidos en Fenech et al. 2003. Se tuvieron en cuenta únicamente las células que presentaban dos núcleos claramente diferenciables y de tamaño similar dentro de una misma membrana celular intacta (se excluyeron las células multinucleadas) (**Figura 17A-D**).

Además, se consideraron como MNs aquellos que presentaban un diámetro entre 1/16 y 1/3 del tamaño medio de los núcleos principales, y que no mostraran ninguna conexión física con ninguno de ellos (**Figura 17B, D**). Para el cálculo de la frecuencia de NPBs, se tuvieron en cuenta aquellas células binucleadas con membrana celular intacta en las que se observaran estructuras de cromatina que uniesen físicamente dos núcleos de similar tamaño (**Figura 17C-D**). Para el cálculo de la frecuencia de células con signos citológicos compatibles con apoptosis, se contabilizaron aquellas células que mostraban cuerpos apoptóticos y citoplasma intacto, signos de un estado tardío de apoptosis (**Figura 17E**).

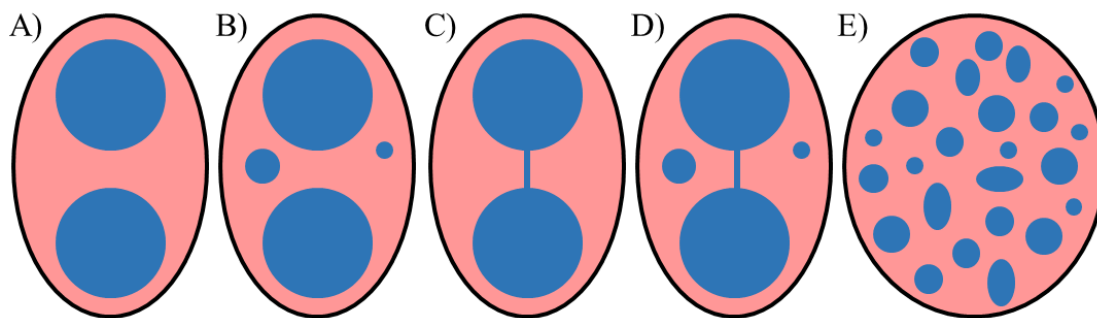


Figura 17. Esquema de células analizadas. Célula binucleada (BN) (A), célula BN con micronúcleos (MN) (B), célula BN con un puente nucleoplásmico (NPB) (C), célula BN con NPB y dos MN (D), célula con signos de apoptosis (E) (Imagen adaptada de Fenech et al., 2003)

Para cada individuo y grupo de edad se calcularon los siguientes parámetros:

- **Frecuencia de células binucleadas con micronúcleos:**

$$F. BN \text{ con } MN = \frac{MN_1 + MN_2 + MN_3 + MN_4}{T_{BN}}$$

Donde MN₁-MN₄ representa el número de células binucleadas con 1-4 micronúcleos, respectivamente, y T_{BN} es el total de células binucleadas (con y sin micronúcleos).

- **Frecuencia de micronúcleos en células binucleadas con micronúcleos:**

$$F. MN \text{ en } BN \text{ con } MN = \frac{1 * MN_1 + 2 * MN_2 + 3 * MN_3 + 4 * MN_4}{T_{BN\_MN}}$$

Donde MN₁-MN₄ representa el número de células binucleadas con 1-4 micronúcleos, respectivamente, y T_{BN_MN} es el total de células binucleadas con micronúcleos.

- **Frecuencia de puentes nucleoplásmicos en células binucleadas:**

$$F. \text{puentes en } BN = \frac{P}{T_{BN}}$$

Donde P es el número de células binucleadas con puentes y T_{BN} es el total de células binucleadas.

- **Frecuencia de células con signos citológicos de estado tardío de apoptosis:**

$$F. \textit{apoptosis} = \frac{A}{T_A}$$

Donde A representa el número de células en apoptosis tardía y T_A el número total de células analizadas.

6.8.5. FISH en células BN con MN

Para conocer si los MNs estaban originados por fragmentos cromosómicos o por la pérdida de cromátidas o cromosomas y, por tanto, averiguar si su origen era clastogénico o aneugénico, respectivamente, se analizó la composición de los MNs en 300 células BN mediante la técnica FISH. Para ello, se utilizó una sonda comercial pancentromérica de ratón (StarFISH) marcada con rodamina (rojo), además de una sonda específica de los telómeros de vertebrados, de secuencia (TTAGGG)_n, marcada con fluoresceína (verde). La sonda específica de telómeros se generó mediante PCR siguiendo el método descrito por Ijdo *et al.* (1991) utilizando la pareja de cebadores 5'-(TTAGGG)₅-3' y 5'-(CCCTAA)₅-3' en ausencia de ADN molde. La mezcla de reacción empleada para la amplificación de las secuencias teloméricas contenía: MgCl₂ (3 mM), dNTPs (200 μM), cebadores (0,4μM), enzima Taq polimerasa (2U), y el tampón apropiado para la enzima (1X). El programa de PCR fue el siguiente:

- 94°C 5 min
- 10 ciclos:
 - 95°C 1 min
 - 55°C 30 s
 - 72°C 1 min
- 30 ciclos:
 - 95°C 1 min
 - 60°C 30 s
 - 72°C 90 s

La sonda de telómeros de vertebrados generada se marcó mediante *nick-translation* con fluoresceína-dUTP (verde) utilizando el kit *Nick Translation Kit*.

La frecuencia de MNs Cen⁺ se calculó como:

$$F.MN\ Cen^{+} = \frac{1 * C_1 + 2 * C_2 + 3 * C_3 + 4 * C_4}{1 * MN_1 + 2 * 2MN_2 + 3 * 3MN_3 + 4 * 4MN_4}$$

Donde C₁-C₄ es el número de células binucleadas con 1-4 micronúcleos con señal centromérica y MN₁-MN₄ representa el número de células binucleadas con 1-4 micronúcleos, respectivamente.

7. Análisis estadísticos

Se comprobó la normalidad de cada conjunto de datos mediante la prueba de *Kolmogorov-Smirnov* en aquellos que tuviesen más de 30 casos y *Shapiro-Wilks* en los conjuntos con menos de 30 casos. A su vez, se confirmó la homocedasticidad de cada conjunto de datos mediante la prueba de *Levene*. Para aquellos en los que se confirmasen ambos criterios se comprobó la significación de las diferencias entre grupos mediante una prueba t de *Student* o ANOVA. En aquellos casos que no cumpliesen las condiciones de normalidad u homocedasticidad, las diferencias se comprobaron con el test no paramétrico de la *U de Mann-Whitney* o *Kruskal-Wallis*. Los tests de comparaciones múltiples ANOVA y *Kruskal-Wallis* se completaron con análisis *post hoc* de *Tukey* o *Games-Howell*, respectivamente.

La calidad del ajuste en las correlaciones entre los parámetros se analizó mediante el coeficiente de correlación de *Pearson*.

En todas las pruebas se empleó un valor de significación mínimo de $p < 0,05$ para rechazar la hipótesis nula. Todos los análisis y pruebas estadísticas se realizaron con el programa IBM® SPSS® Statistics 21 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Las longevidades observadas de los grupos de machos y hembras se representaron mediante un diagrama Kaplan-Meier y las diferencias estadísticas en las longevidades de ratones macho y hembra se comprobaron mediante una prueba log-rank de Mandel-Cox.

En el caso concreto de la ecuación de predicción de longevidad en machos a partir de datos conductuales, se realizó una validación cruzada de los datos generados en la nueva cohorte de ratones hembra con la ecuación de dos parámetros, anteriormente generada por Martínez de Toda y colaboradores (**Ecuación 3**) (Martínez de Toda *et al.*, 2019c) y también con los datos de los ratones macho.

Ecuación 3:
Longevidad estimada = 11,833 + 0,378x(deambulaci3n interna) + 0,202x(tiempo en BA)

Estos resultados, así como los de la longevidad observada en los machos con respecto a la longevidad estimada mediante la nueva ecuación generada en la presente tesis se representaron en forma de gráfico de dispersión y la significación se calculó mediante un *test* de correlación de *Pearson* con un límite mínimo de significación de $p < 0,05$

Todas las figuras se representaron mediante el programa GraphPad Prism 6 Software (LLC, San Diego, CA, EE. UU.).

RESULTADOS

1. Cambios en una serie de parámetros bioquímicos, de función inmunitaria, y estrés oxidativo, en un estudio longitudinal a lo largo del envejecimiento, en ratones macho de la cepa ICR-CD1.

1.1. Parámetros bioquímicos

En este apartado se exponen los resultados obtenidos en los parámetros de bioquímica sanguínea (glucosa, colesterol y triglicéridos) de ratones macho a las edades adulta (40 semanas), vieja (72 semanas) y muy vieja (96 semanas) (**Tabla 10**).

Tabla 10. Valores sanguíneos de glucosa, colesterol y triglicéridos, medidos en ratones macho a las edades adulta, vieja y muy vieja

Edad	Parámetro	N	Media	EE
Adulta	Glucosa (mg/dL)	60	116,0	± 3,1
	Colesterol (mg/dL)	57	163,6	± 2,9
	Triglicéridos (mg/dL)	60	128,6	± 7,1
Vieja	Glucosa (mg/dL)	31	89,6	± 5,3 ^{aaa}
	Colesterol (mg/dL)	26	149,5	± 7,1
	Triglicéridos (mg/dL)	30	94,6	± 4,8 ^a
Muy vieja	Glucosa (mg/dL)	14	99,9	± 5,4
	Colesterol (mg/dL)	10	167,4	± 6,7
	Triglicéridos (mg/dL)	13	107,5	± 9,5

Los datos representan la media aritmética ± error estándar (EE) de los valores obtenidos a cada edad (adulta 40 semanas, vieja 72 semanas, muy vieja 96 semanas).
N: número de animales utilizados en la medición.
^a $p < 0,05$; ^{aaa} $p < 0,001$ comparado con el valor obtenido en el parámetro correspondiente a la edad adulta.

Aquellos parámetros sanguíneos en los que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en relación a la edad adulta se representan gráficamente (**Figura 18**). Se puede observar una disminución significativa en las concentraciones de glucosa ($p < 0,001$) y triglicéridos ($p < 0,05$) sanguíneos a la edad vieja, mientras que no se detectaron diferencias entre las edades adulta y muy vieja en ninguno de los parámetros mencionados. Además, tampoco se encontraron diferencias significativas en la cantidad de colesterol en sangre a las diferentes edades estudiadas.

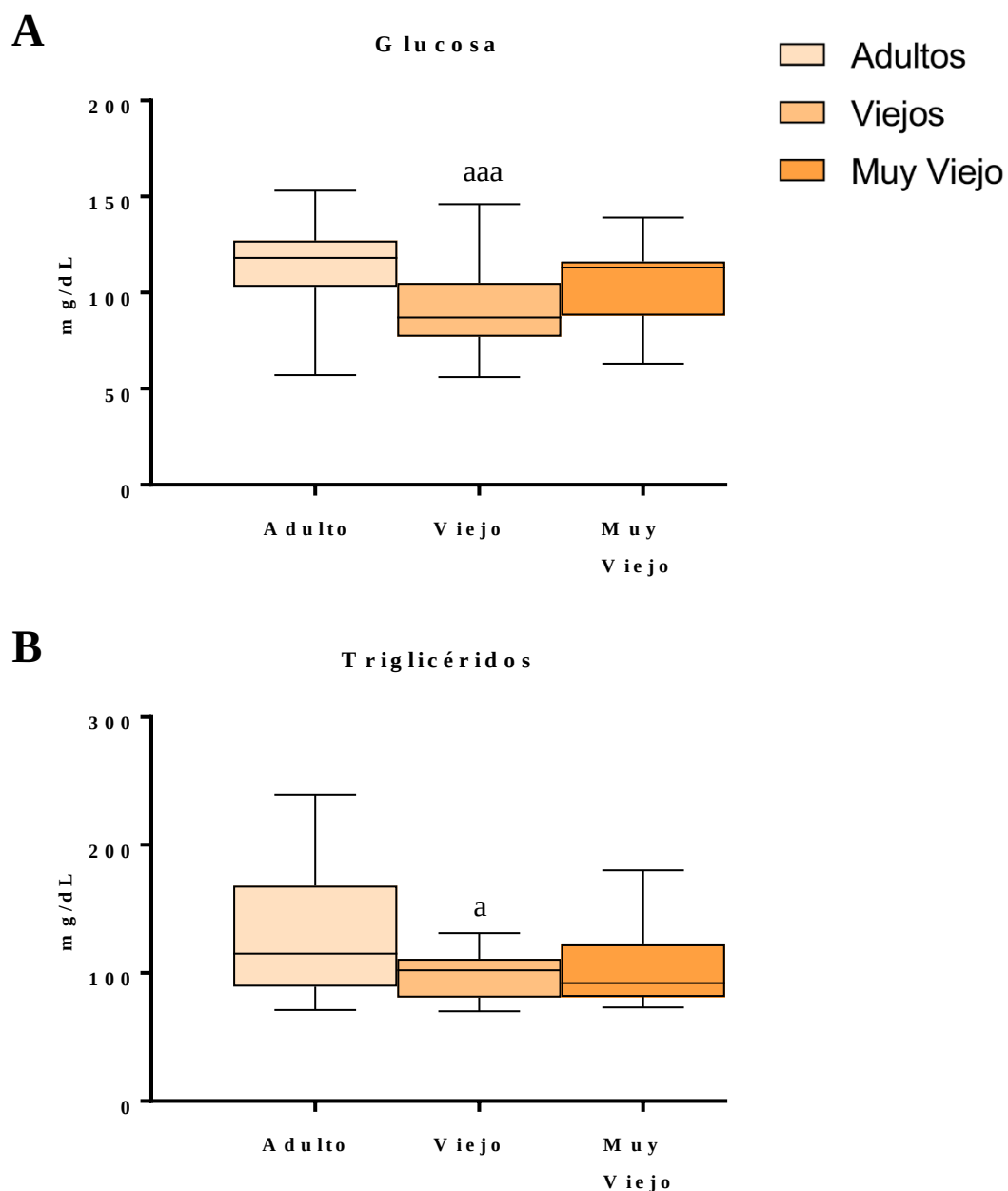


Figura 18. Concentraciones de glucosa (A) y triglicéridos (B) en sangre de ratones macho en la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas) y muy vieja (96 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

a $p < 0,05$; **aaa** $p < 0,001$ respecto al valor medido a la edad adulta.

1.1.1. Parámetros bioquímicos analizados en grupos de ratones, a cada edad, en función de la supervivencia de los animales a medio y largo plazo

Para cada parámetro, y en cada edad, se segregaron los valores de los ratones que alcanzaban la siguiente edad de medición, los que morían antes de dicha fecha y los que alcanzaban una longevidad extrema (120 semanas).

Considerando esta subdivisión en diferentes grupos de supervivencia, se detectaron concentraciones de glucosa (**Figura 19**) significativamente inferiores a las edades adulta ($p<0,05$) y vieja ($p<0,01$) en los animales que no sobrevivieron hasta la siguiente edad respecto a los que sí que lo hicieron. A su vez, se observó un aumento significativo ($p<0,05$) en la glucosa sanguínea de ratones muy viejos (96 semanas) respecto a cuando eran viejos (72 semanas).

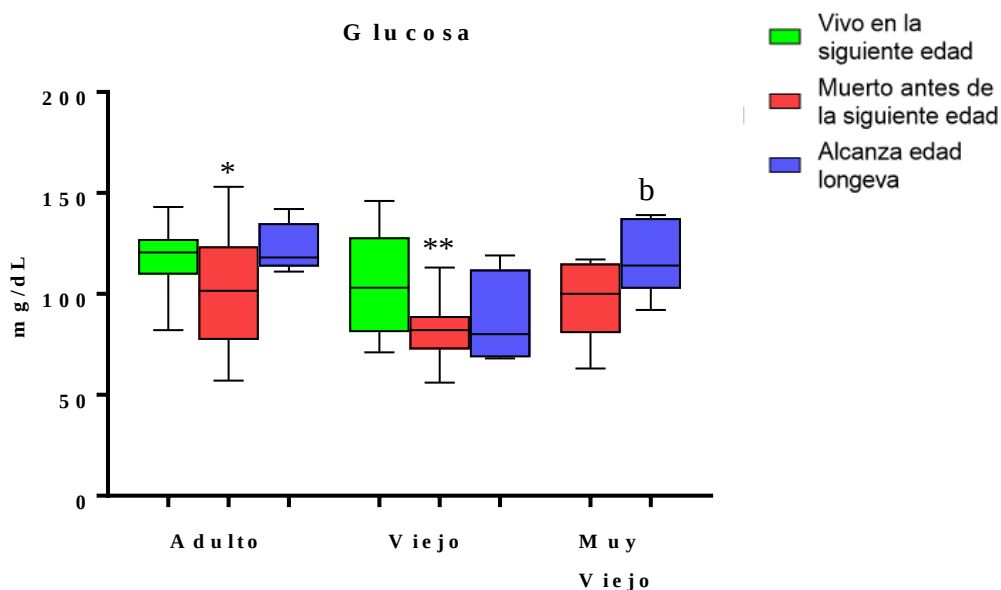


Figura 19. Concentraciones de glucosa sanguínea de ratones macho a las edades adulta (40 semanas), vieja (72 semanas) y muy vieja (96 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

* $p<0,05$; ** $p<0,01$ respecto al grupo de ratones que sobrevivieron hasta la siguiente edad.
b $p<0,05$ comparado con el grupo de viejos que llegó a longevos.

Con respecto a las concentraciones de colesterol en sangre, en general se mantuvieron dentro de un mismo rango y sin grandes variaciones a lo largo del envejecimiento, a excepción de los niveles de los ratones adultos que murieron antes de la siguiente edad de medición, los cuales mostraron valores significativamente superiores a los de los adultos que sobrevivieron ($p < 0,05$) (**Figura 20**).

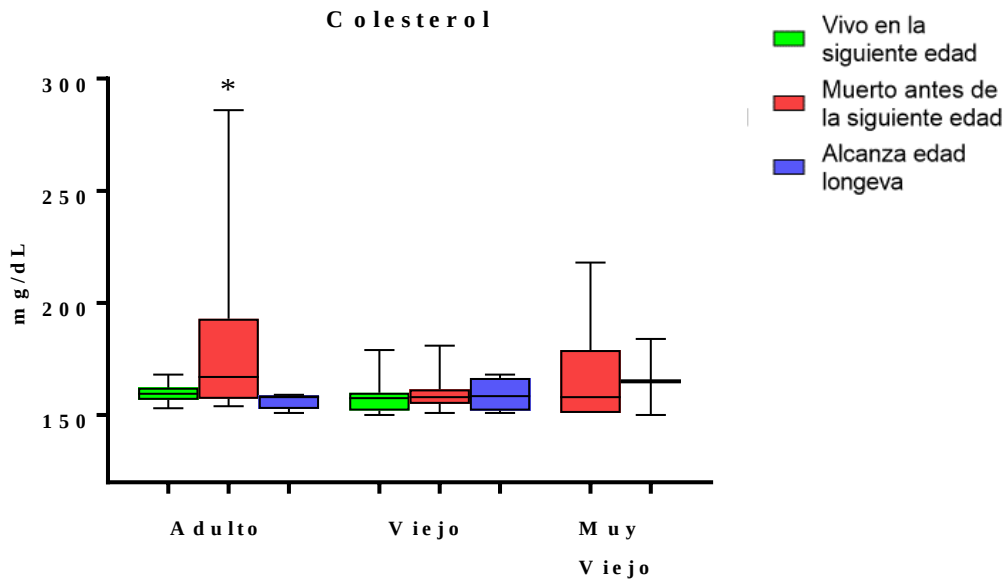


Figura 20. Concentraciones de colesterol sanguíneo de ratones macho a las edades adulta (40 semanas), vieja (72 semanas) y muy vieja (96 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

* $p < 0,05$ respecto al grupo de ratones que sobrevivieron hasta la siguiente edad.

Los niveles de triglicéridos en sangre tampoco mostraron diferencias significativas durante el envejecimiento, salvo en los valores de los individuos muy viejos que alcanzaron las 120 semanas y los que no lo hicieron ($p < 0,05$) (**Figura 21**).

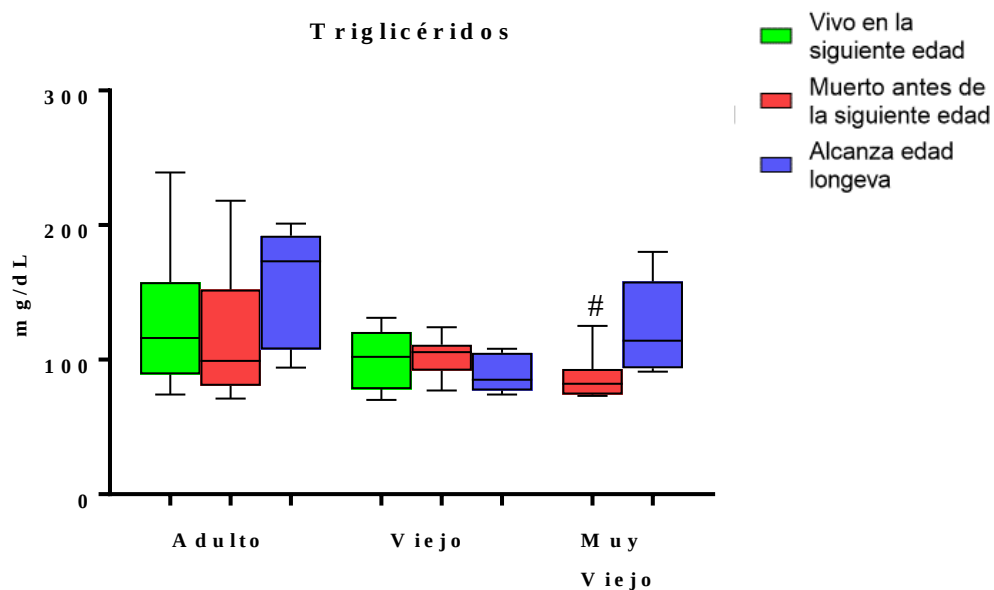


Figura 21. Concentraciones de colesterol sanguíneo de ratones macho a las edades adulta (40 semanas), vieja (72 semanas) y muy vieja (96 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

$p < 0,05$ respecto al grupo de ratones que sobrevivieron hasta edad longeva.

1.2. Sistema Inmunitario

1.2.1. Función inmunitaria

Los resultados obtenidos en las pruebas de función inmunitaria realizadas en ratones macho a las edades consideradas: adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), se detallan en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Funciones inmunitarias en leucocitos peritoneales de ratones macho, medidas a la edad adulta, vieja, muy vieja y longeva.

Edad	Parámetro	N	Media	EE
Adulta	Quimiotaxis de macrófagos (n° macrófagos por filtro)	59	1012	± 35
	Quimiotaxis de linfocitos (n° linfocitos por filtro)	62	883	± 41
	Índice fagocítico (n° de bolas fagocitadas/100 macrófagos)	62	453	± 35
	Eficacia fagocítica (células que fagocitan/100 macrófagos)	61	85	± 1
	Citotoxicidad NK (%lisis)	60	45	± 2
	Proliferación basal de linfocitos (cpm)	62	156	± 10
	Linfoproliferación con ConA (cpm)	62	311	± 35
	Linfoproliferación con LPS (cpm)	62	278	± 18
	Estimulación proliferativa (ConA) (%)	62	218	± 18
	Estimulación proliferativa (LPS) (%)	62	207	± 16
Vieja	Quimiotaxis de macrófagos (n° macrófagos por filtro)	32	868	± 60
	Quimiotaxis de linfocitos (n° linfocitos por filtro)	33	474	± 29 ^{aaa}
	Índice fagocítico (n° de bolas fagocitadas/100 macrófagos)	21	302	± 18
	Eficacia fagocítica (células que fagocitan/100 macrófagos)	20	91	± 1
	Citotoxicidad NK (%lisis)	34	51	± 4
	Proliferación basal de linfocitos (cpm)	29	255	± 42
	Linfoproliferación con ConA (cpm)	27	752	± 137
	Linfoproliferación con LPS (cpm)	30	443	± 70
	Estimulación proliferativa (ConA) (%)	30	370	± 56
	Estimulación proliferativa (LPS) (%)	31	211	± 25
Muy vieja	Quimiotaxis de macrófagos (n° macrófagos por filtro)	13	667	± 30 ^{aaa, b}
	Quimiotaxis de linfocitos (n° linfocitos por filtro)	12	531	± 129 ^{aaa}
	Índice fagocítico (n° de bolas fagocitadas/100 macrófagos)	13	276	± 16
	Eficacia fagocítica (células que fagocitan/100 macrófagos)	13	8	± 2
	Citotoxicidad NK (%lisis)	14	43	± 4
	Proliferación basal de linfocitos (cpm)	12	167	± 27
	Linfoproliferación con ConA (cpm)	12	472	± 99
	Linfoproliferación con LPS (cpm)	12	260	± 39
	Estimulación proliferativa (ConA) (%)	12	277	± 40
	Estimulación proliferativa (LPS) (%)	12	175	± 34
Longeva	Quimiotaxis de macrófagos (n° macrófagos por filtro)	4	701	± 45
	Quimiotaxis de linfocitos (n° linfocitos por filtro)	5	319	± 146
	Índice fagocítico (n° de bolas fagocitadas/100 macrófagos)	4	272	± 16
	Eficacia fagocítica (células que fagocitan/100 macrófagos)	4	84	± 4
	Citotoxicidad NK (%lisis)	5	38	± 5
	Proliferación basal de linfocitos (cpm)	5	107	± 21
	Linfoproliferación con ConA (cpm)	5	165	± 42
	Linfoproliferación con LPS (cpm)	5	135	± 25
	Estimulación proliferativa (ConA) (%)	5	153	± 16
	Estimulación proliferativa (LPS) (%)	5	129	± 8

Aquellos parámetros en los que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas se representan gráficamente en la **Figura 22**. Es lo que sucedió con las capacidades de quimiotaxis de linfocitos y macrófagos. En el caso de la quimiotaxis de linfocitos (**Figura 22A**), se observa, en comparación con la edad adulta, una disminución significativa en la edad vieja y muy vieja ($p < 0,001$). En la quimiotaxis de macrófagos (**Figura 22B**) la disminución significativa se encontró en la edad muy vieja respecto a la adulta ($p < 0,001$), pero también en la muy vieja en comparación con la vieja ($p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la comparación de los valores de quimiotaxis de linfocitos o macrófagos obtenidos de los ratones a la edad longeva con ninguno de los otros grupos de edad.

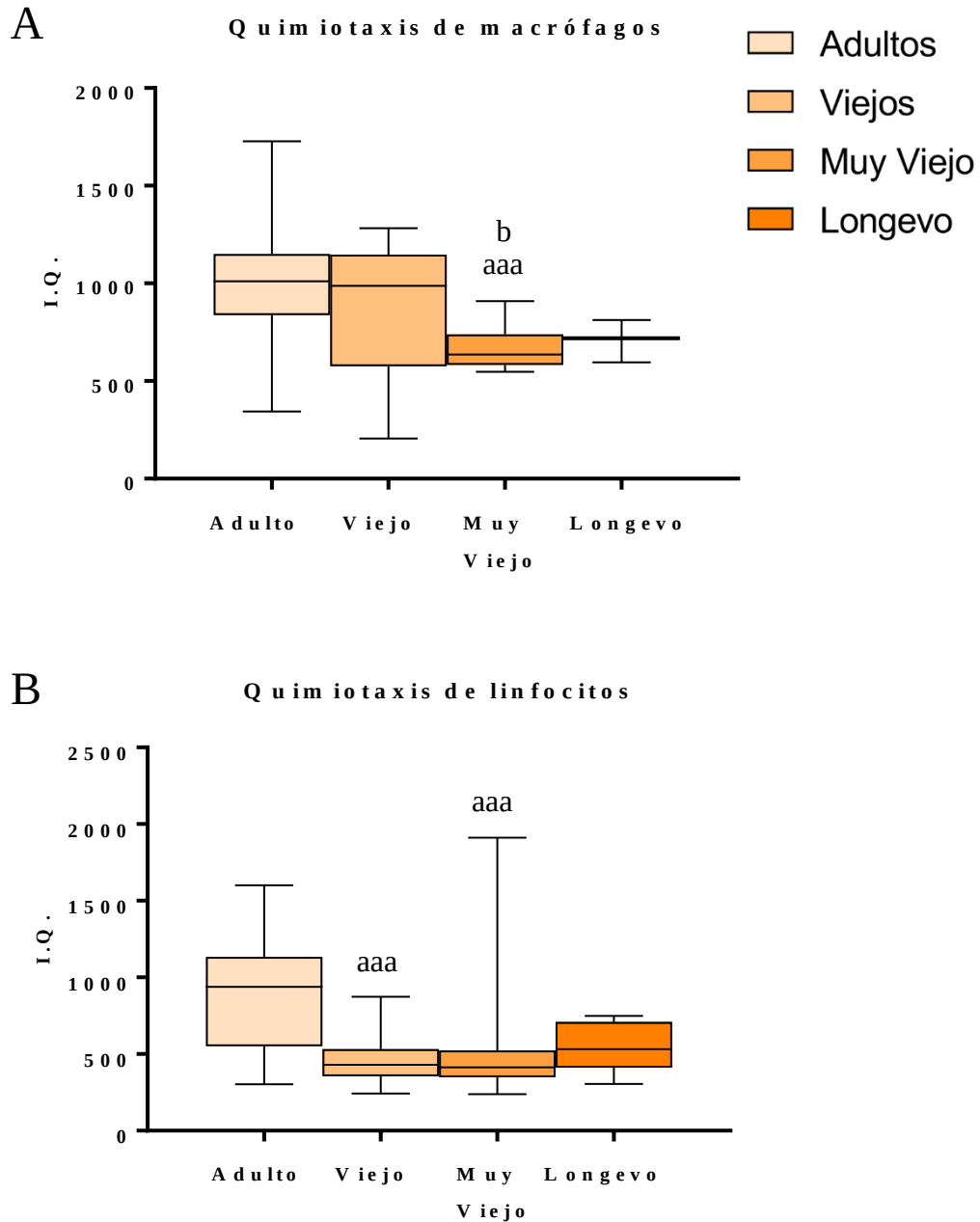


Figura 22. Índices de quimiotaxis (I.Q.) de macrófagos (A) y linfocitos (B) peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo. *aaa* $p < 0,001$ respecto a la edad adulta, *b* $p < 0,05$ respecto a la edad vieja.

1.2.1.1. Funciones inmunitarias analizadas en grupos de ratones, a cada edad, según la supervivencia de los animales a medio y largo plazo

Capacidad quimiotáctica

Los resultados de la capacidad de quimiotaxis de macrófagos (**Figura 23**), separando para cada edad en función de la supervivencia de los animales, han mostrado una quimiotaxis significativamente menor en los ratones muy viejos que no sobrevivieron hasta la edad longeva en comparación con los que sí alcanzaban las 120 semanas ($p < 0,001$).

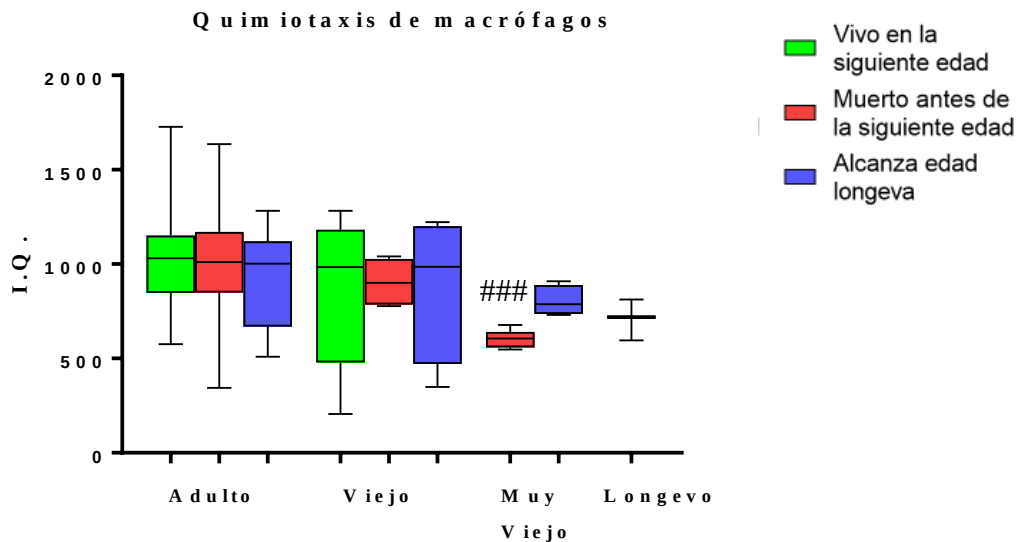


Figura 23. Índice de quimiotaxis (I.Q.) de macrófagos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo. ### $p < 0,001$ respecto al grupo de ratones que sobrevivieron hasta la edad longeva.

En cuanto a la quimiotaxis de linfocitos (**Figura 24**), se observó una menor quimiotaxis en los ratones adultos que alcanzaron una longevidad extrema respecto a los que murieron antes de la siguiente medición ($p<0,05$). La quimiotaxis observada en los ratones que alcanzaron la edad longeva se mantiene sin cambios significativos durante todo el envejecimiento.

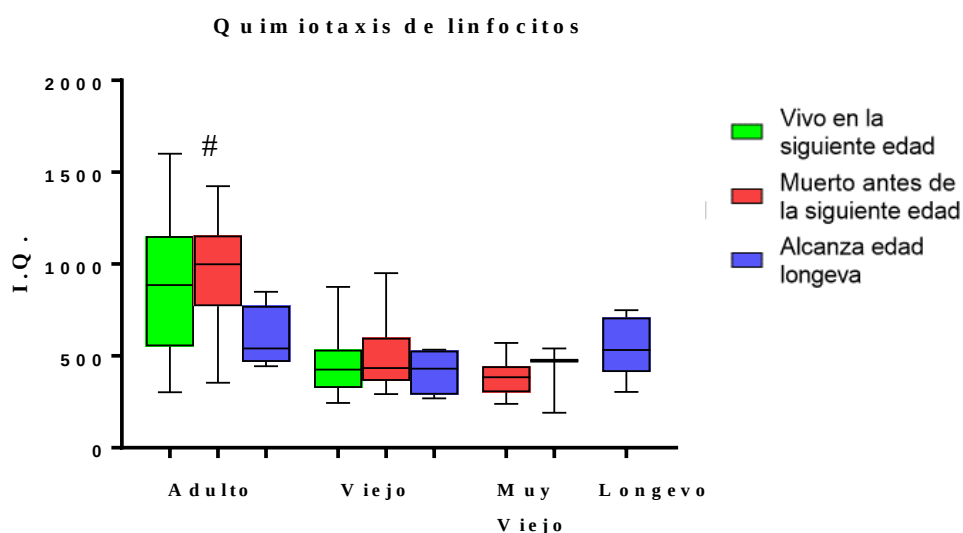


Figura 24. Índices de quimiotaxis (I.Q.) de linfocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.
$p<0,05$ respecto al grupo de ratones que sobrevivieron hasta la edad longeva.

Capacidad fagocítica

En relación a la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales, medida como el número total de bolas de látex que son capaces de fagocitar cien macrófagos, únicamente se observó un aumento significativo de los valores de esta función en los ratones que llegaron a longevos en relación a los correspondientes cuando eran muy viejos ($p < 0,05$) (**Figura 25**).

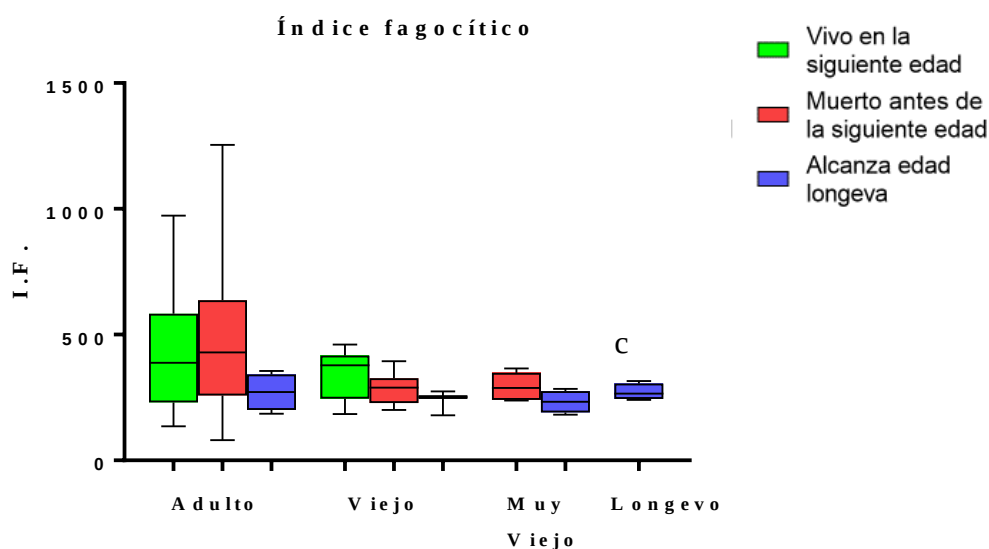


Figura 25. Índice fagocítico (I.F.) de macrófagos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo. *c* $p < 0,05$ respecto al grupo de ratones muy viejos que alcanzan la edad longeva.

Sin embargo, si se mide la capacidad fagocítica como el porcentaje de macrófagos capaces de ingerir por lo menos una partícula de látex (eficacia fagocítica), se pierde la diferencia significativa anteriormente descrita, apareciendo en la edad vieja, entre la de los ratones que llegan a longevos y los que sobreviven únicamente hasta la siguiente edad ($p < 0,05$) (Figura 26).

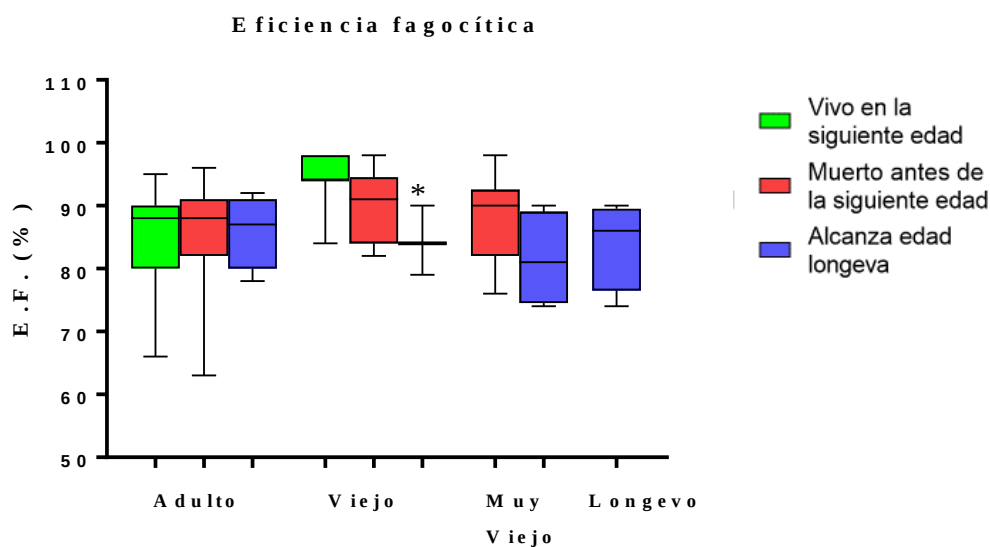


Figura 26. Eficacia fagocítica (E.F.) de macrófagos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

* $p < 0,05$ respecto al grupo de ratones que alcanzan la siguiente edad.

Capacidad citotóxica NK

La actividad citotóxica NK no mostró diferencias significativas ni en las diferentes edades analizadas (**Tabla 11**), ni cuando se segregaron los datos de cada edad en función de la supervivencia de los ratones (**Figura 27**).

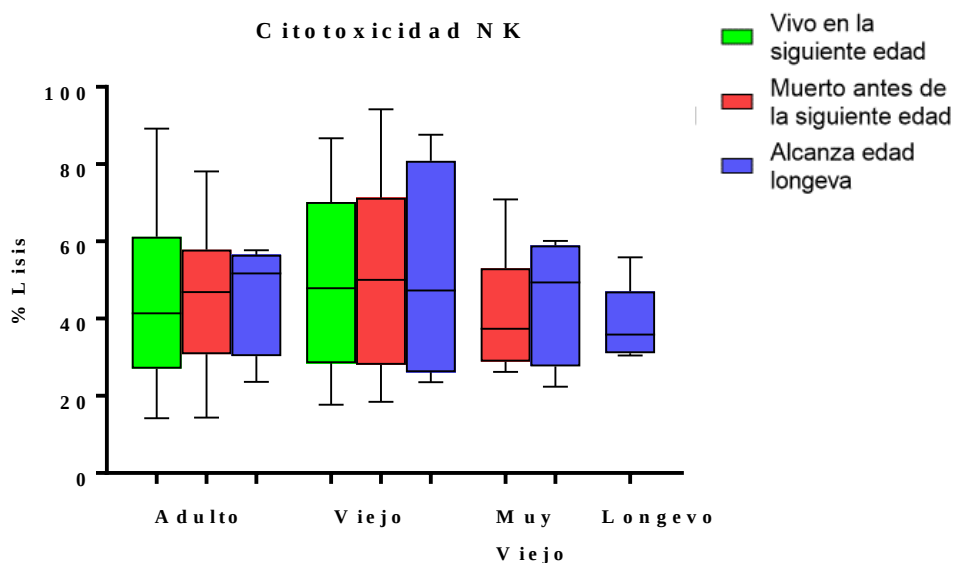


Figura 27. Actividad citotóxica NK (% de lisis) en leucocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

Capacidad linfoproliferativa

Respecto a la capacidad proliferativa de los linfocitos, medida como cantidad absoluta de radiactividad por incorporación de timidina tritiada, en cuentas por minuto (c.p.m.), la linfoproliferación en condiciones basales (en ausencia de estimulación mitótica) mostró menores valores de cpm en los linfocitos de ratones viejos que mueren antes de la siguiente edad, comparado con los ratones que sobreviven ($p < 0,05$) (Figura 28).

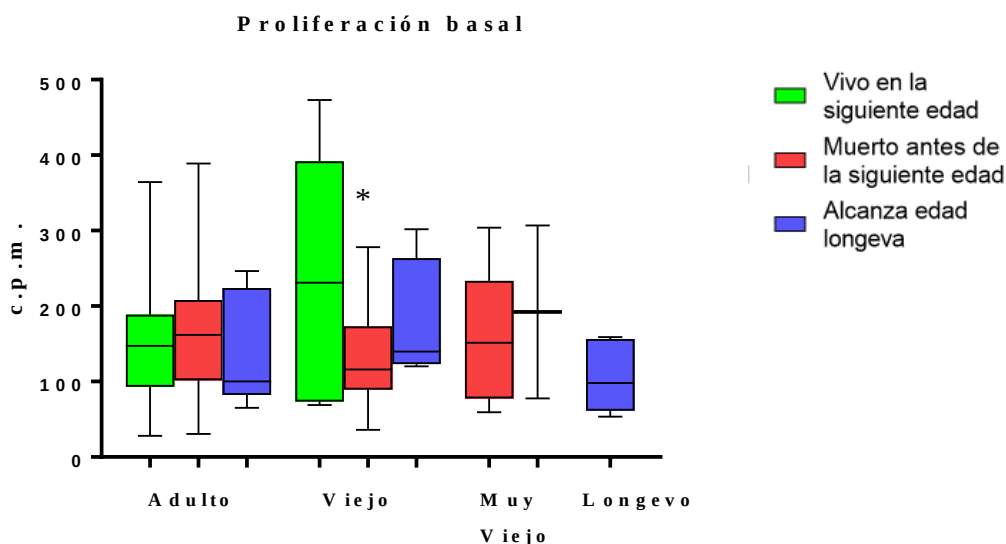


Figura 28. Proliferación basal (cpm) de linfocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

* $p < 0,05$ respecto al grupo de ratones que sobrevivieron hasta la siguiente edad.

La proliferación de linfocitos en presencia del mitógeno concanavalina A (ConA), expresada en c.p.m. no muestra diferencias significativas entre ningún grupo (**Figura 29**).

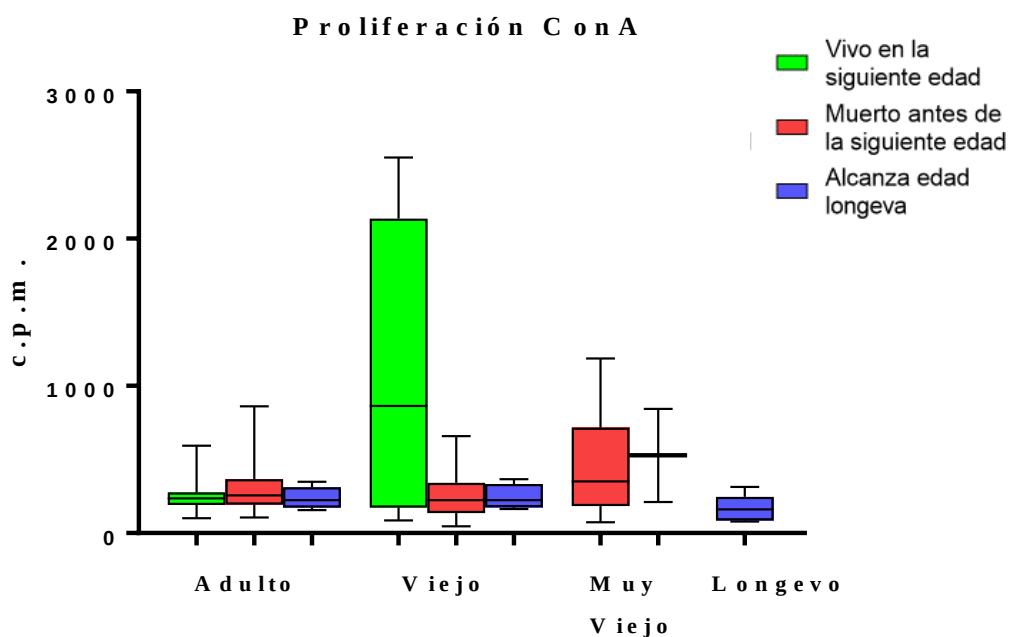


Figura 29. Proliferación en presencia de ConA (c.p.m.) de linfocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

En el caso de la proliferación de linfocitos en presencia de lipopolisacárido (LPS), se detectaron menores valores ($p < 0,05$) en los ratones longevos en comparación con los que mostraron cuando eran adultos (**Figura 30**).

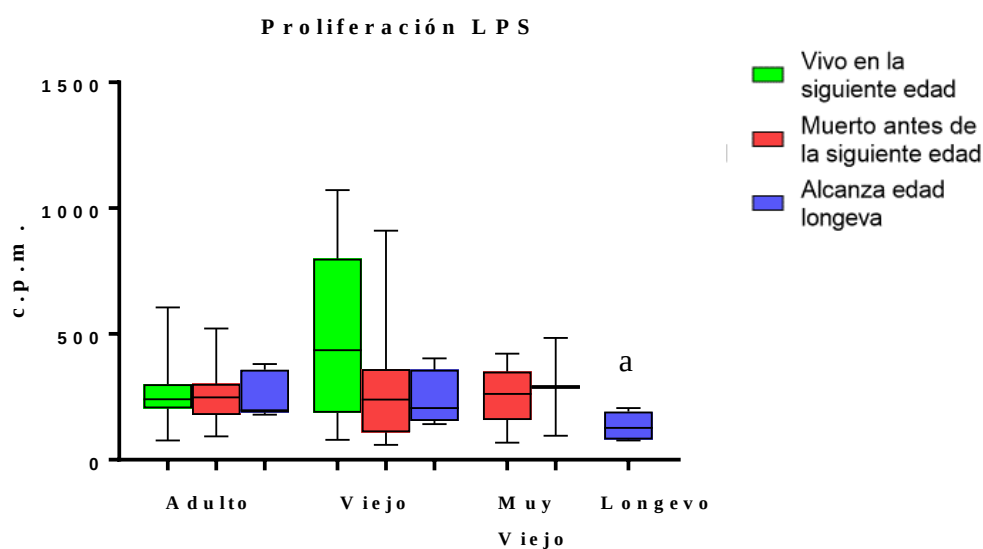


Figura 30. Proliferación en presencia de LPS (c.p.m.) de linfocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo. *a* $p < 0,05$ respecto al grupo de ratones adultos que alcanzaron la edad longeva.

Respecto a los porcentajes de estimulación en las proliferaciones de linfocitos en presencia de mitógenos (calculadas respecto a la proliferación basal), en el caso de la ConA (**Figura 31**), se observaron aumentos significativos en los valores de ratones muy viejos que llegan a longevos en comparación con la edad vieja ($p<0,01$). Sin embargo, se tienen valores menores en los viejos que alcanzan la edad longeva en relación a los de los viejos que sobreviven sólo hasta la siguiente edad ($p<0,05$).

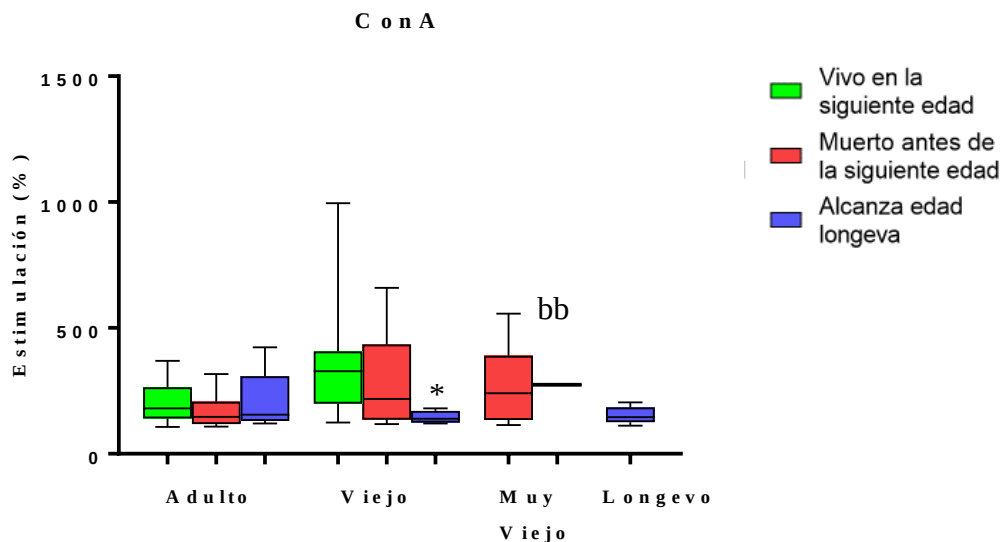


Figura 31. Estimulación de la proliferación (%), en presencia de ConA, de los linfocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.
 * $p<0,05$ respecto al grupo de ratones que alcanzaron la siguiente edad.
 bb $p<0,01$ respecto al grupo de ratones viejos que alcanzaron la edad longeva.

Los resultados de la estimulación linfoproliferativa en presencia de LPS (**Figura 32**), muestran una disminución significativa ($p < 0,05$) en los valores de los ratones longevos en comparación con los que tenían cuando eran adultos.

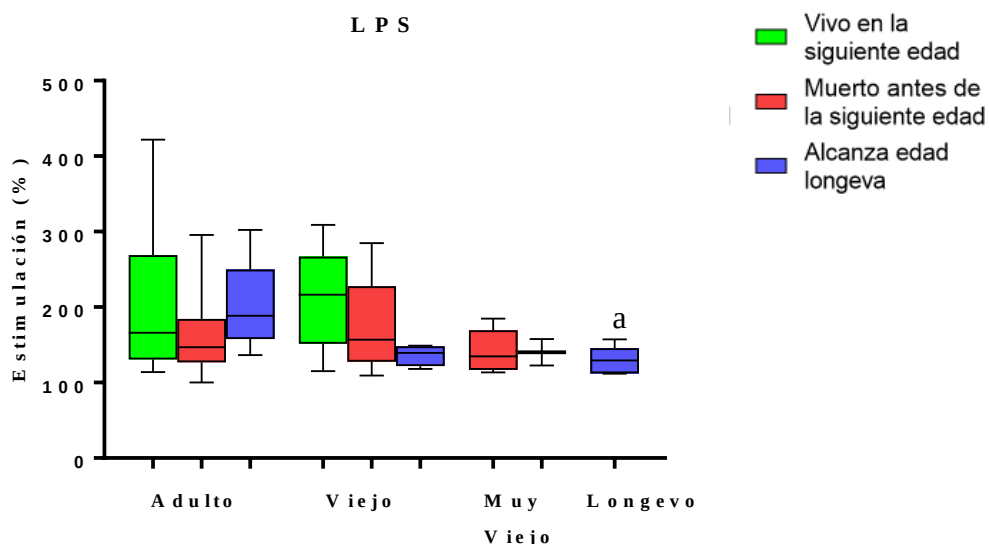


Figura 32. Estimulación de la proliferación (%), en presencia de LPS, de los linfocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), separados en cada edad por su supervivencia hasta la siguiente en que fueron analizados. La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo. **a** $p < 0,05$ respecto al grupo de ratones adultos que alcanzaron la edad longeva.

1.2.2. Estado oxidativo

Los resultados en leucocitos peritoneales de ratones macho obtenidos, en relación con las actividades de enzimas antioxidantes (glutación peroxidasa, GPx y glutación reductasa, GR), de las concentraciones de oxidantes (glutación oxidado, GSSG) y antioxidantes (glutación reducido, GSH), así como del cociente de ambos (GSSG/GSH) y las concentraciones de daño oxidativo a lípidos valorado como malondialdehído (MDA), se detallan para cada una de las edades consideradas: adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas) en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Parámetros de estrés oxidativo en leucocitos peritoneales de ratones macho, medidos a la edad adulta, vieja, muy vieja y longeva

Edad	Parámetro	N	Media	EE
Adulta	Actividad glutatión peroxidasa (U/mg proteínas)	65	101,1	± 8,4
	Actividad glutatión reductasa (U/mg proteínas)	64	32,2	± 2,9
	Glutatión reducido (GSH) (nmol/mg proteína)	52	8,1	± 1,0
	Glutatión oxidado (GSSG) (nmol/mg proteína)	52	7,0	± 0,6
	Cociente GSSG/GSH	52	1,3	± 0,2
	Malondialdehído (MDA) (nmol/mg proteína)	63	7,3	± 1,1
Vieja	Actividad glutatión peroxidasa (U/mg proteínas)	32	256,5	± 34,1 ^{aaa}
	Actividad glutatión reductasa (U/mg proteínas)	32	54,7	± 8,3
	Glutatión reducido (GSH) (nmol/mg proteína)	25	5,3	± 0,8
	Glutatión oxidado (GSSG) (nmol/mg proteína)	25	8,4	± 0,9
	Cociente GSSG/GSH	25	2,2	± 0,4 ^a
	Malondialdehído (MDA) (nmol/mg proteína)	29	11,6	± 1,3 ^{aa}
Muy Vieja	Actividad glutatión peroxidasa (U/mg proteínas)	13	88,3	± 19,0 ^{bb}
	Actividad glutatión reductasa (U/mg proteínas)	12	42,9	± 15,5
	Glutatión reducido (GSH) (nmol/mg proteína)	11	3,9	± 0,5
	Glutatión oxidado (GSSG) (nmol/mg proteína)	11	3,1	± 0,8 ^{a bb}
	Cociente GSSG/GSH	11	1,0	± 0,3 ^b
	Malondialdehído (MDA) (nmol/mg proteína)	14	2,3	± 0,6 ^{a bbb}
Longeva	Actividad glutatión peroxidasa (U/mg proteínas)	3	52,6	± 26,2 ^b
	Actividad glutatión reductasa (U/mg proteínas)	3	56,7	± 26,8
	Glutatión reducido (GSH) (nmol/mg proteína)	5	2,8	± 1,0 ^{a bbb}
	Glutatión oxidado (GSSG) (nmol/mg proteína)	5	4,6	± 2,2
	Cociente GSSG/GSH	5	2,6	± 1,4
	Malondialdehído (MDA)	5	0,9	± 0,1 ^a

Los datos representan la media aritmética ± error estándar (EE) de los valores obtenidos a cada edad: adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas).

N: número de animales utilizados en la medición.

a $p < 0,05$; **aa** $p < 0,01$; **aaa** $p < 0,001$ comparado con el valor correspondiente medido a la edad adulta.

b $p < 0,05$; **bb** $p < 0,01$; **bbb** $p < 0,001$ comparado con el valor correspondiente medido a la edad vieja.

Aquellos parámetros en los que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas se han representado en las **Figura 33** **Figura 37**.

En la actividad de la GPx (**Figura 33**) se observa un aumento de la misma en la edad vieja respecto a las otras edades ($p < 0,001$ respecto a la edad adulta, $p < 0,01$ respecto a la muy vieja y $p < 0,05$ respecto a la longeva).

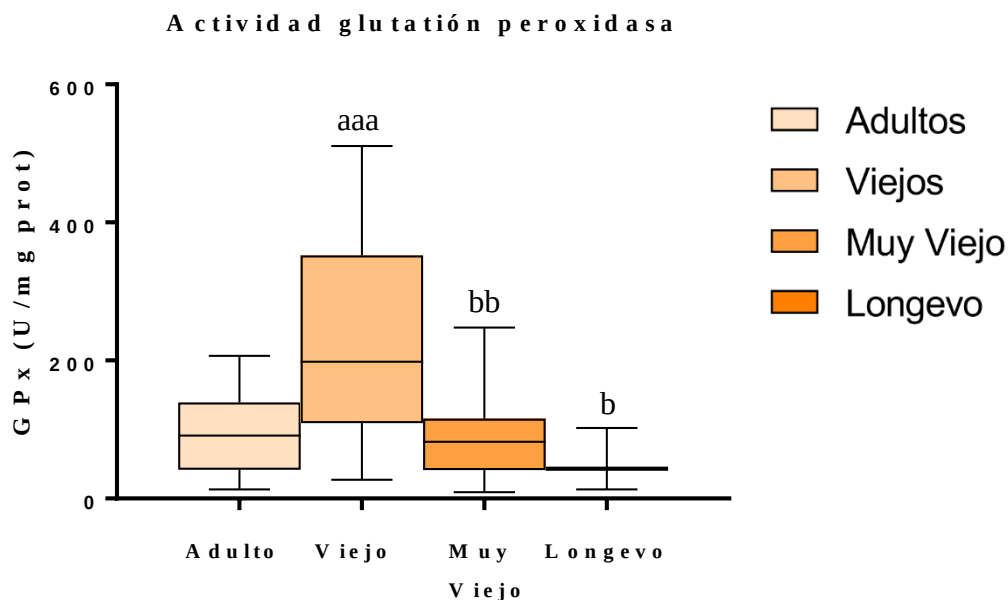


Figura 33. Actividad de la enzima glutati ó n p eroxidasa (GPx) (U/mg proteína) en leucocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo. **aaa** $p < 0,001$ respecto a los valores de la edad adulta **b** $p < 0,05$; **bb** $p < 0,01$ respecto a los valores de la edad vieja.

Los resultados obtenidos en las concentraciones de glutatión reducido (GSH) (**Figura 34**), muestran la tendencia a ir disminuyendo progresivamente con el avance de la edad. Sin embargo, únicamente se observó significación estadística en la disminución de esas concentraciones en individuos longevos respecto a los adultos ($p<0,05$) y respecto a los viejos ($p<0,001$).

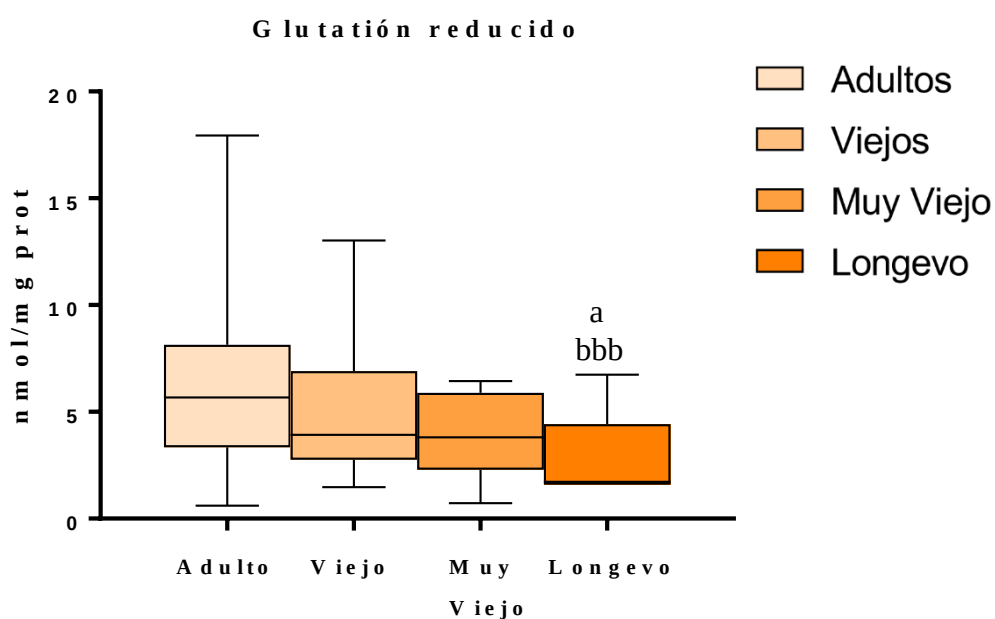


Figura 34. Concentraciones de glutatión reducido (GSH) (nmol/mg proteína) en leucocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.
a $p<0,05$ respecto a los valores de la edad adulta
bbb $p<0,001$ respecto a los valores de la edad vieja.

En las concentraciones de glutatión oxidado (GSSG) (**Figura 35**) se observó una disminución significativa a la edad muy vieja respecto a la edad adulta ($p<0,05$) y respecto a la vieja ($p<0,01$).

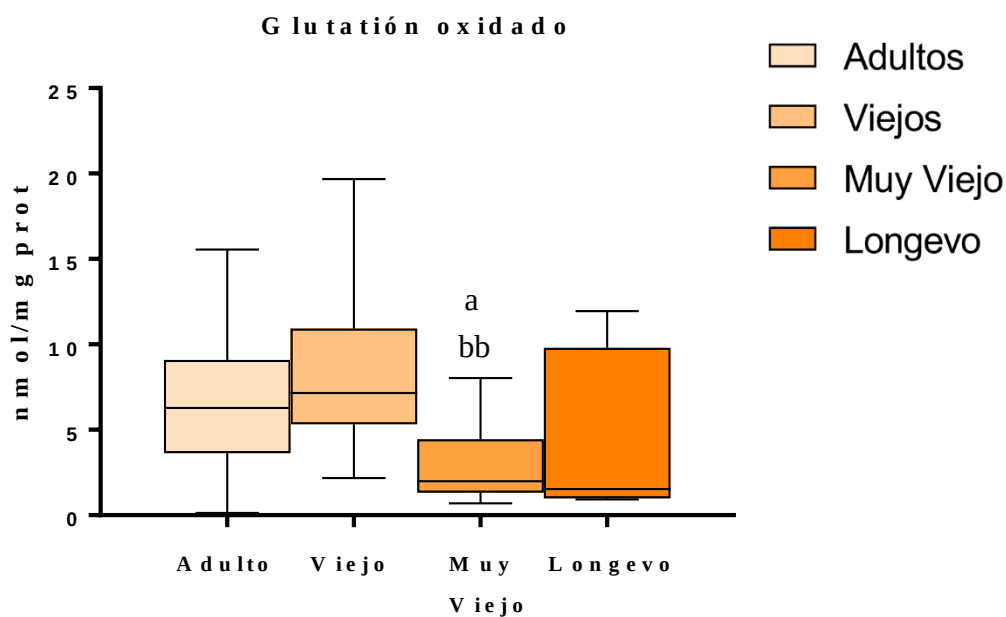


Figura 35. Concentraciones de glutatión oxidado (GSSG) (nmol/mg proteína) en leucocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.
a $p<0,05$ respecto a los valores de la edad adulta
bb $p<0,01$ respecto a los valores de la edad vieja.

Los resultados obtenidos al calcular el cociente redox (GSSG/GSH), un buen indicador del estado de estrés oxidativo (**Figura 36**), muestran una gran dispersión a todas las edades. Las diferencias estadísticamente significativas se detectaron en el aumento de los valores de ese cociente en los ratones viejos ($p < 0,05$) respecto a los mismos cuando eran adultos y muy viejos.

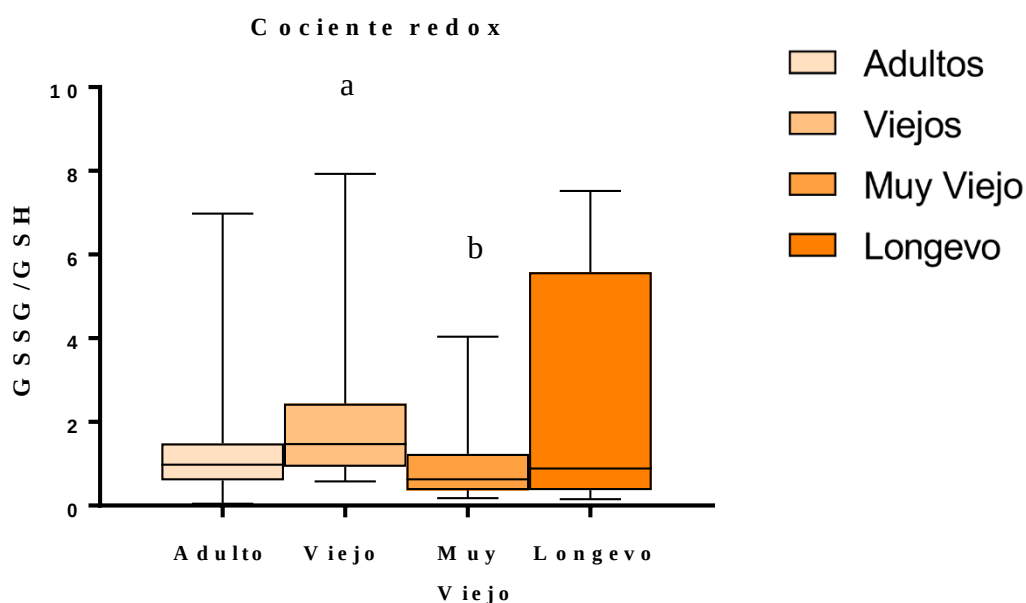


Figura 36. Cociente redox (GSSG/GSH) en leucocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

a $p < 0,05$ respecto a los valores de la edad adulta

b $p < 0,05$ respecto a los valores de la edad vieja.

Las concentraciones de malondialdehído (MDA) (**Figura 37**), muestran un aumento significativo ($p<0,01$) en los ratones cuando son viejos respecto a las que tienen en la edad adulta. No obstante, a edades muy viejas y longevas, se observó una disminución significativa en comparación con la edad adulta ($p<0,05$). Asimismo, esta disminución también fue significativa en los muy viejos ($p<0,001$) en relación a los viejos.

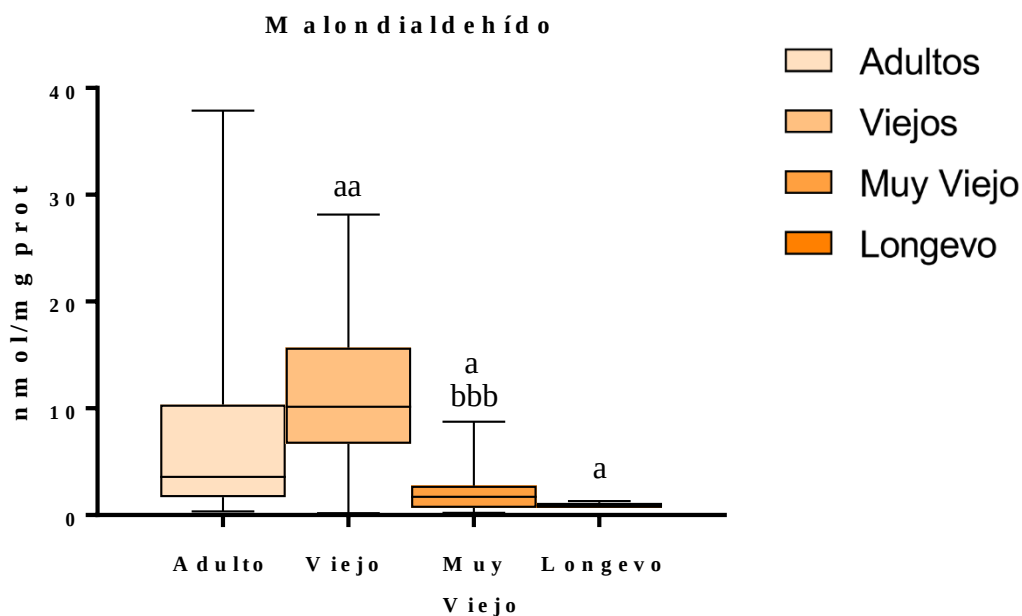


Figura 37. Concentraciones de malondialdehído (MDA) (nmol/mg proteína) en leucocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.
a $p<0,05$ **aa** $p<0,01$ respecto a los valores de la edad adulta
bbb $p<0,001$ respecto a los valores de la edad vieja.

1.2.2.1. Cambios en parámetros redox analizados a cada edad en grupos de ratones según la supervivencia de los animales a medio y largo plazo

Actividad de glutatión peroxidasa y reductasa (GPx y GR)

Los resultados obtenidos de la actividad de las enzimas GPx y GR en leucocitos peritoneales de ratones macho, separando para cada edad en función de la supervivencia de los animales (**Figura 38Figura 39**), muestran que en el caso de la actividad GPx (**Figura 38**), la dispersión tan alta en los datos hace desaparecer las diferencias significativas anteriormente descritas (**Tabla 12**). En la GR, en la cual no había diferencias significativas entre ninguna de las edades (**Tabla 12**), al subdividir estos datos considerando la supervivencia hasta la siguiente edad (**Figura 39**), se aprecia unos valores mayores en los individuos viejos que alcanzan la edad longeva respecto a los de los animales que sobreviven hasta la edad muy vieja ($p<0,05$).

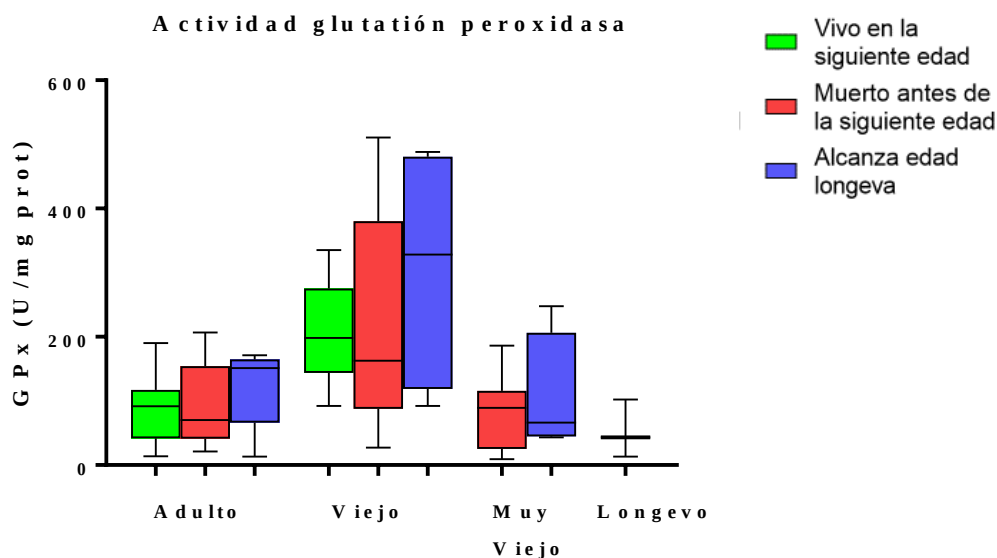


Figura 38. Actividad GPx (U/mg proteína) de leucocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

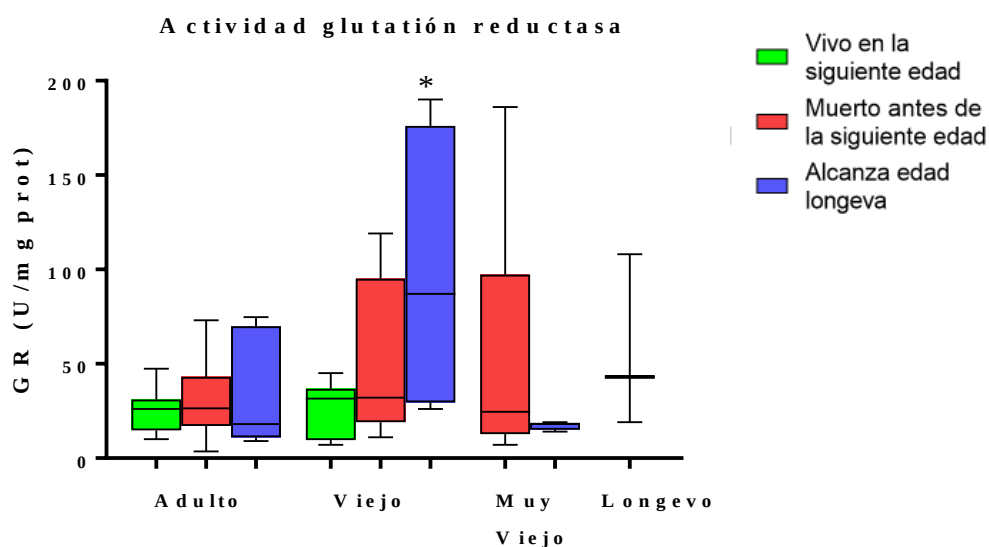


Figura 39. Actividad GR (U/mg proteína) de leucocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

* $p < 0,05$ respecto al grupo de ratones que alcanzan la siguiente edad.

Contenido de glutatión

Los resultados obtenidos en lo referente a la concentración de glutatión reducido (GSH) (**Figura 40**), muestran como en la edad vieja, los ratones que llegaron a longevos tienen valores menores que cuando eran adultos ($p < 0,05$).

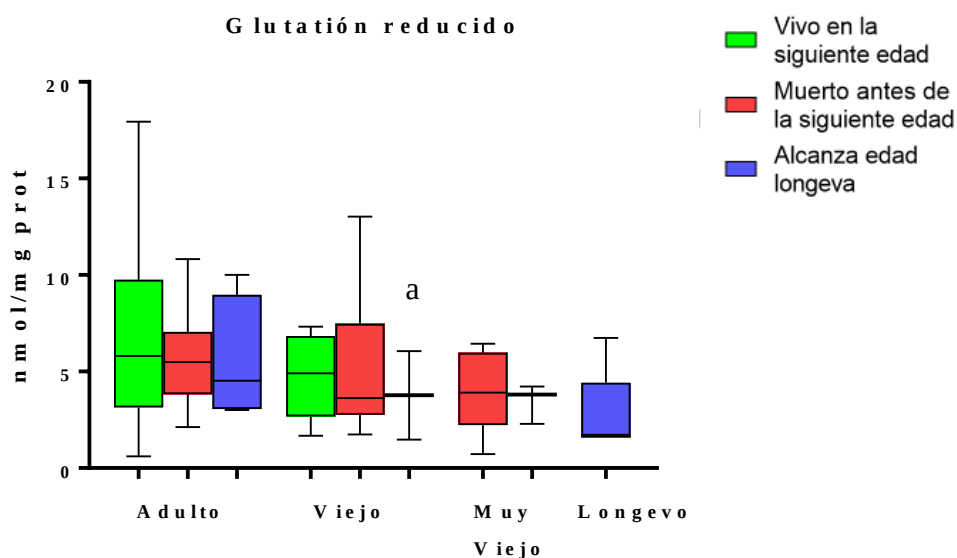


Figura 40. Concentración de GSH (nmol/mg proteína) en leucocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.
a $p < 0,05$ respecto al grupo de ratones, cuando eran adultos, que alcanzaron la edad longeva.

Las concentraciones de glutatión en su forma oxidada (GSSG) (**Figura 41**) en los ratones muy viejos que llegaron a longevos fue significativamente menor que la de este grupo cuando eran adultos ($p<0,05$) y viejos ($p<0,01$).

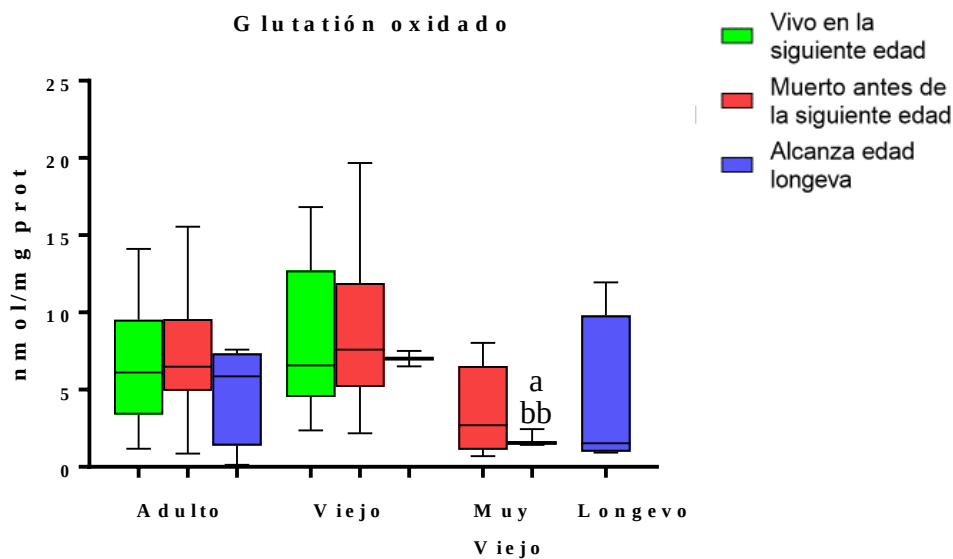


Figura 41. Concentración de GSSG (nmol/mg proteína) en leucocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

a $p<0,05$ respecto al grupo de ratones adultos que alcanzaron la edad longeva.

bb $p<0,01$ respecto al grupo de ratones viejos que alcanzaron la edad longeva.

En el cociente GSSG/GSH los resultados (**Figura 42**) muestran valores muy dispersos, por lo que ya no se aprecian las diferencias significativas que se habían observado sin la segregación de los grupos (**Tabla 12**).

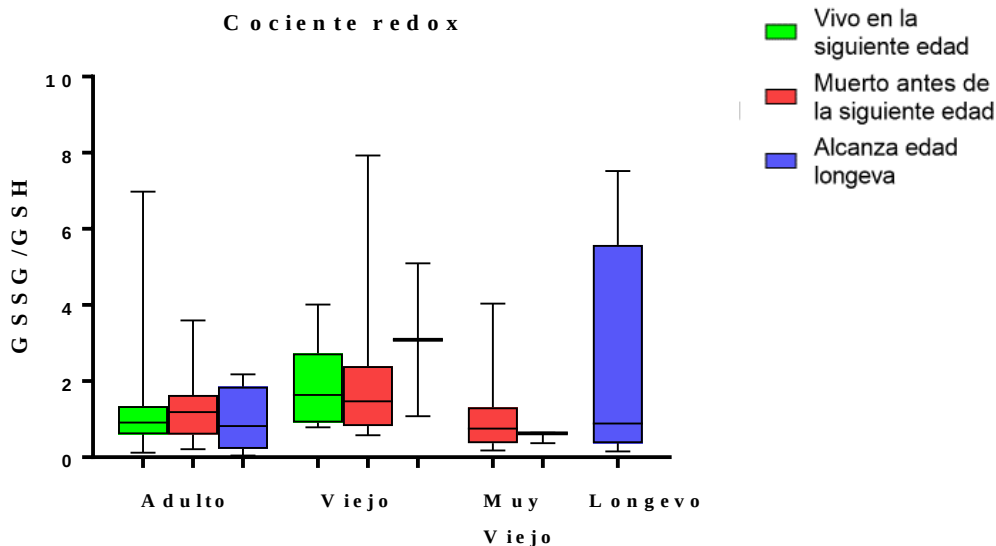


Figura 42. Cocientes GSSG/GSH en leucocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

Peroxidación Lipídica (MDA)

En cuanto a las concentraciones de malondialdehído (MDA), los resultados mostrados en la (**Figura 43**) indican unos valores menores en células de ratones adultos que mueren antes de la siguiente toma, comparados con los que alcanzan la edad longeva ($p<0,01$). Además, se pueden apreciar valores mayores de MDA a la edad adulta en los ratones que llegan hasta longevos comparados con los que sobreviven hasta la siguiente edad ($p<0,05$). Asimismo, en la edad vieja, los ratones que mueren antes de la siguiente toma tienen menores concentraciones de MDA que los de aquellos que sobreviven hasta la edad muy vieja ($p<0,05$).

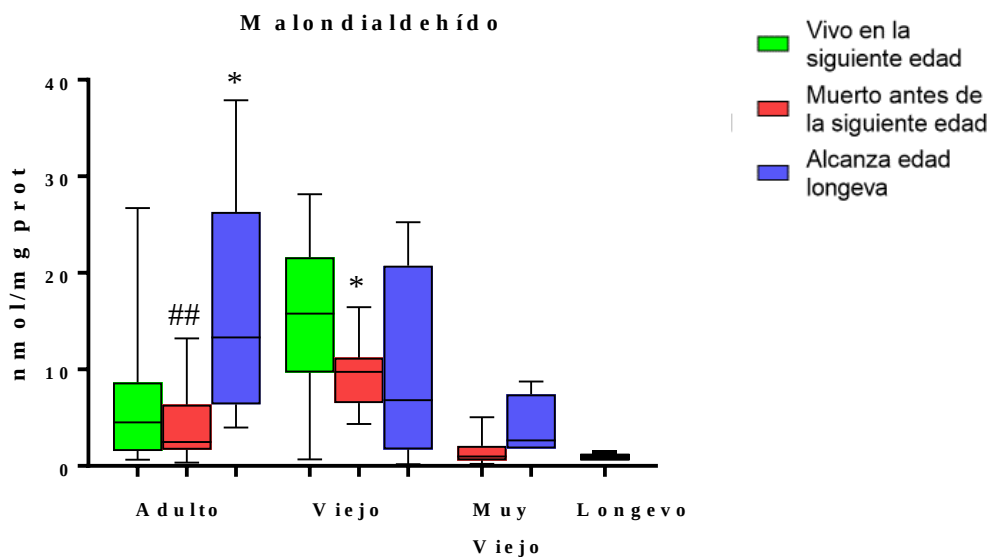


Figura 43. Concentración de MDA (nmol/ mg de proteína) en leucocitos peritoneales de ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). La barra central representa la mediana, los extremos de las cajas los cuartiles primero y tercero y los bigotes delimitan el valor máximo y mínimo.

* $p<0,05$ respecto al grupo de ratones que alcanzaron la siguiente edad.

$p<0,01$ respecto al grupo de ratones que alcanzaron la edad longeva.

2. Desarrollo de modelos matemáticos predictivos de la longevidad para ratones adultos de la cepa ICR-CD1.

2.1. Capacidad predictiva de parámetros bioquímicos, inmunitarios y oxidativos a lo largo de la edad en ratones macho

En base a los resultados obtenidos en el estudio longitudinal, se quiso averiguar si alguno de los parámetros de bioquímica sanguínea, de función inmunitaria y estrés oxidativo tenía capacidad predictiva de la longevidad que iba a mostrar un ratón. Para comprobarlo se correlacionaron estos parámetros de cada ratón, a las distintas edades, con la longevidad que alcanzaba, obteniéndose los valores de coeficiente de correlación de Pearson que se describen en este apartado.

2.1.1. Bioquímica sanguínea

Los valores de las concentraciones de glucosa, colesterol y triglicéridos sanguíneos en los ratones a las edades adulta (40 semanas), vieja (72 semanas) y muy vieja (96 semanas), no mostraron correlaciones significativas con la edad (en semanas) que alcanzaban los ratones (Tabla 13 y Figura 44).

Tabla 13. Valores del coeficiente de correlación de Pearson, significación y tamaño muestral a partir de los parámetros de bioquímica sanguínea a cada una de las edades de los ratones correlacionados con la edad que alcanzan

Edad	Parámetro	Correlación de Pearson	Significación	N
Adulta	Glucosa	0,226	0,082	60
	Colesterol	-0,242	0,069	57
	Triglicéridos	0,112	0,396	60
Vieja	Glucosa	0,133	0,207	31
	Colesterol	0,228	0,264	26
	Triglicéridos	-0,287	0,094	30
Muy Vieja	Glucosa	-0,025	0,931	14
	Colesterol	0,093	0,799	10
	Triglicéridos	0,303	0,314	13

Ningún parámetro bioquímico medido en sangre de los ratones correlacionó significativamente con la edad que alcanzaban, siguiendo con un criterio de $p < 0,05$. Los únicos coeficientes de correlación de Pearson que alcanzaron una significación $p < 0,1$ fueron los niveles de glucosa ($p = 0,082$) y de colesterol ($p = 0,062$), ambos medidos a la edad adulta.

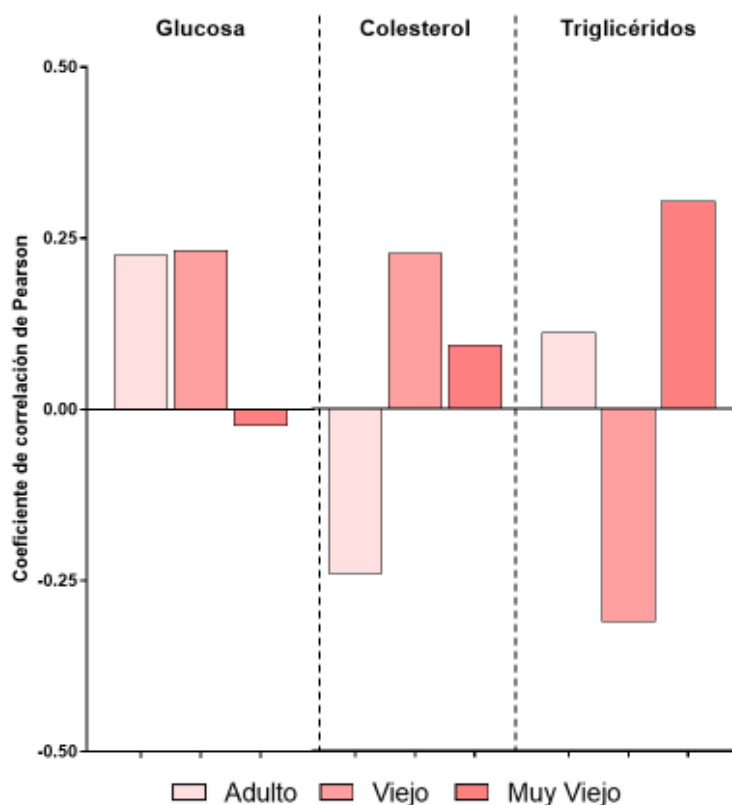


Figura 44. Coeficientes de correlación de Pearson para glucosa, colesterol y triglicéridos sanguíneos, parámetros bioquímicos medidos en ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas) y muy vieja (96 semanas), respecto a la longevidad que alcanzan los animales.

2.1.2. Función inmunitaria

Respecto a la funcionalidad inmunitaria que mostraron los leucocitos peritoneales de ratones macho extraídos a cada edad, al correlacionar los valores de los diferentes parámetros analizados con la longevidad que alcanzaron los animales, se obtuvieron los

siguientes resultados de coeficientes de correlación de Pearson para las funciones innatas (Tabla 14 y Figura 45) y para las adaptativas (Tabla 15 y Figura 46).

Los coeficientes de correlación de Pearson, para las funciones innatas (citotoxicidad NK, quimiotaxis de linfocitos y macrófagos, índice fagocítico y eficacia fagocítica), con la significación de dicha correlación y el tamaño muestral (N), a las edades adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas) frente a la longevidad que alcanza cada individuo, se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Coeficientes de correlación de Pearson en funciones inmunitarias innatas a las distintas edades estudiadas

Edad	Parámetro	Correlación de Pearson	Significación	N
Adulta	Quimiotaxis de macrófagos	-0,119	0,365	60
	Quimiotaxis de linfocitos	-0,159	0,217	62
	Índice fagocítico	-0,116	0,368	62
	Eficacia fagocítica	0,062	0,634	62
	Citotoxicidad NK	-0,014	0,916	60
Vieja	Quimiotaxis de macrófagos	0,166	0,364	32
	Quimiotaxis de linfocitos	-0,129	0,476	33
	Índice fagocítico	-0,058	0,802	21
	Eficacia fagocítica	-0,194	0,401	21
	Citotoxicidad NK	0,032	0,856	34
Muy vieja	Quimiotaxis de macrófagos	0,904***	0,000	13
	Quimiotaxis de linfocitos	0,287	0,365	12
	Índice fagocítico	-0,776**	0,002	13
	Eficacia fagocítica	-0,677*	0,011	13
	Citotoxicidad NK	0,129	0,661	14
Longeva	Quimiotaxis de macrófagos	-0,123	0,877	4
	Quimiotaxis de linfocitos	-0,774	0,124	5
	Índice fagocítico	-0,593	0,407	4
	Eficacia fagocítica	-0,929	0,071	4
	Citotoxicidad NK	-0,181	0,771	5
Significación de la correlación, frente a la longevidad que alcanza cada individuo, y tamaño muestral (N) de cada una de las funciones inmunitarias innatas (citotoxicidad NK, quimiotaxis de linfocitos y de macrófagos, índice fagocítico y eficacia fagocítica de macrófagos), medidas a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.				

Se observó que las funciones inmunitarias innatas de quimiotaxis de macrófagos ($p < 0,000$), índice ($p < 0,002$) y eficacia fagocítica ($p < 0,011$) son significativamente predictivas únicamente en la edad muy vieja de 96 semanas y, hasta esa edad, todas las

funciones tienen significaciones en sus correlaciones superiores a $p > 0,1$. Además, incluso a la edad longeva, el único parámetro inmunitario que alcanza un valor de $p < 0,1$ es la eficacia fagocítica ($p < 0,071$) (Figura 45).

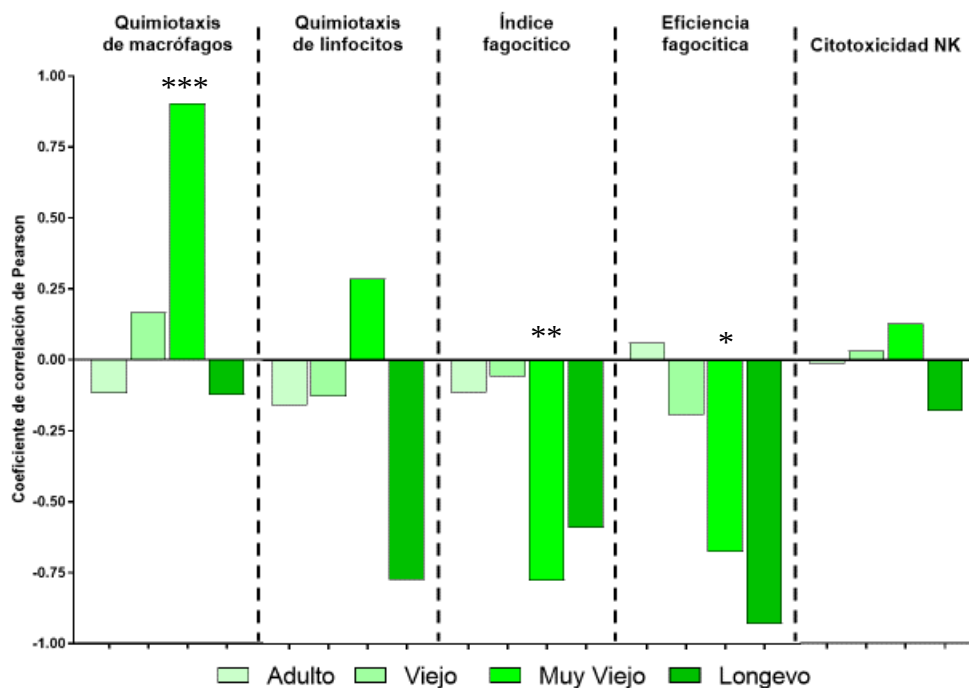


Figura 45. Coeficientes de correlación de Pearson para la citotoxicidad NK, quimiotaxis de linfocitos, de macrófagos, índice fagocítico y eficacia fagocítica de macrófagos. Parámetros medidos en ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), respecto a la esperanza de vida que alcanzan los animales

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Los resultados obtenidos respecto al coeficiente de correlación de Pearson, en el caso de las funciones adaptativas se muestran en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Coeficiente de correlación de Pearson, en las funciones inmunitarias adaptativas, en cada edad estudiada

Edad	Parámetro	Correlación de Pearson	Significación	N
Adulta	Proliferación basal	-0,059	0,649	62
	Proliferación ConA	-0,181	0,158	62
	Proliferación LPS	0,005	0,968	62
	Estimulación proliferativa (ConA)	-0,105	0,417	62
	Estimulación proliferativa (LPS)	0,129	0,316	62
Vieja	Proliferación basal	-0,042	0,818	33
	Proliferación ConA	-0,112	0,534	33
	Proliferación LPS	-0,091	0,616	33
	Estimulación proliferativa (ConA)	-0,312	0,077	33
	Estimulación proliferativa (LPS)	-0,232	0,193	33
Muy Vieja	Proliferación basal	0,370	0,236	12
	Proliferación ConA	0,327	0,299	12
	Proliferación LPS	0,331	0,294	12
	Estimulación proliferativa (ConA)	0,086	0,791	12
	Estimulación proliferativa (LPS)	-0,172	0,593	12
Longeva	Proliferación basal	0,817	0,091	5
	Proliferación ConA	0,390	0,516	5
	Proliferación LPS	0,682	0,204	5
	Estimulación proliferativa (ConA)	-0,393	0,513	5
	Estimulación proliferativa (LPS)	-0,508	0,382	5

Significación de la correlación, frente a la longevidad que alcanza cada individuo, y tamaño muestral (N) de cada una de las funciones inmunitarias adaptativas (proliferación de linfocitos basal, en presencia de ConA, LPS, estimulación de la respuesta proliferativa por ConA y por LPS), medidas a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas).

Estas funciones inmunitarias adaptativas no alcanzaron ningún valor de significación $p < 0,05$ y únicamente dos de ellas llegaron a un nivel de significación $p < 0,1$ (porcentaje de estimulación con ConA en linfocitos de ratones viejos, $p = 0,077$ y proliferación basal en ratones longevos, $p = 0,091$) (**Figura 46**).

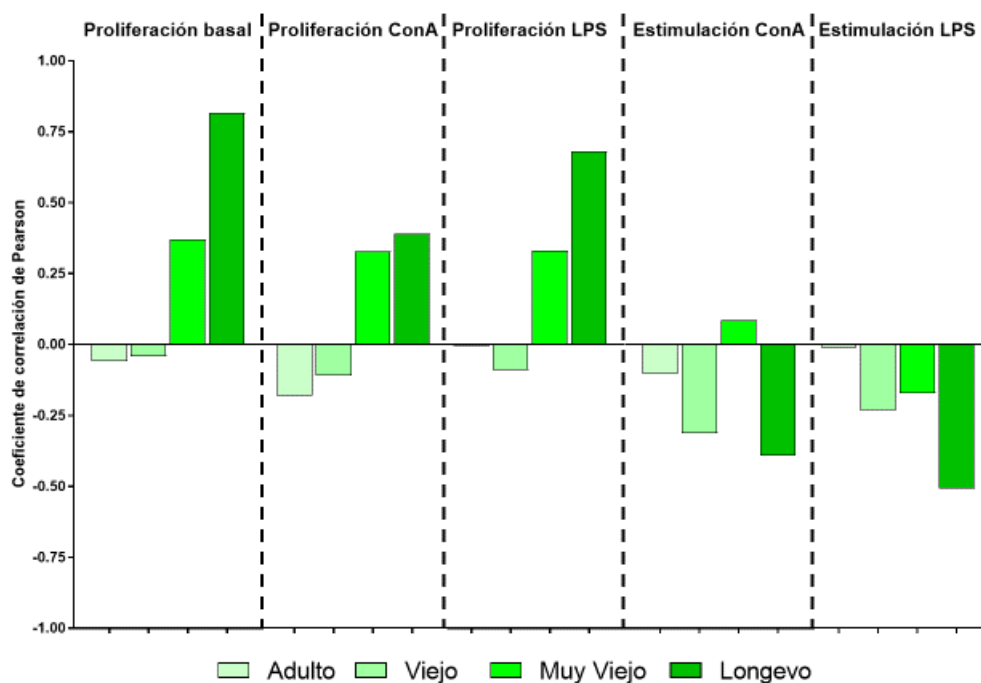


Figura 46. Coeficientes de correlación de Pearson para la proliferación basal de linfocitos, la proliferación en presencia de ConA y LPS, así como la estimulación proliferativa frente a ConA y LPS. Parámetros medidos en ratones macho a la edad adulta, vieja, muy vieja y longeva, respecto a la esperanza de vida que alcanzan los animales.

2.1.3. Estado oxidativo

Los valores de los parámetros de estrés oxidativo obtenidos fueron correlacionados con la edad en semanas que alcanzaba cada uno de los ratones macho del estudio longitudinal. Los coeficientes de correlación de Pearson correspondientes a cada comparación se representan en la **Tabla 16** y en la **Figura 47**.

Tabla 16. Coeficientes de correlación de Pearson en los parámetros de estado de estrés oxidativo en cada edad estudiada

Edad	Parámetro	Correlación de Pearson	Significación	N
Adulta	GPx	0,049	0,699	65
	GR	0,068	0,595	64
	GSH	-0,114	0,420	52
	GSSG	-0,223	0,112	52
	GSSG/GSH	-0,067	0,638	52
	MDA	0,263*	0,037	63
Vieja	GPx	0,110	0,551	32
	GR	0,131	0,476	32
	GSH	-0,243	0,243	25
	GSSG	-0,088	0,677	25
	GSSG/GSH	0,063	0,766	25
	MDA	0,117	0,547	29
Muy Vieja	GPx	0,380	0,200	13
	GR	-0,264	0,408	12
	GSH	-0,264	0,432	11
	GSSG	-0,361	0,275	11
	GSSG/GSH	-0,116	0,735	11
	MDA	0,279	0,334	14
Longeva	GPx	0,943	0,216	3
	GR	-0,254	0,837	3
	GSH	-0,323	0,596	5
	GSSG	-0,603	0,282	5
	GSSG/GSH	-0,526	0,362	5
	MDA	-0,466	0,429	5

Significación de la correlación, frente a la longevidad que alcanza cada ratón, y tamaño muestral (N) de cada uno de los parámetros de estado de estrés oxidativo (glutación peroxidasa, GPx, glutación reductasa, GR, glutación reducido, GSH, glutación oxidado, GSSG, cociente GSSG/GSH y malondialdehído, MDA), medidos a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas).

** $p < 0,05$.*

Los resultados muestran que sólo se obtuvo significación en la correlación positiva entre la cantidad de MDA en leucocitos peritoneales de ratones adultos y la longevidad que alcanzan. En los demás parámetros el valor de la significación de la correlación fue $p > 0,1$ (**Figura 47**).

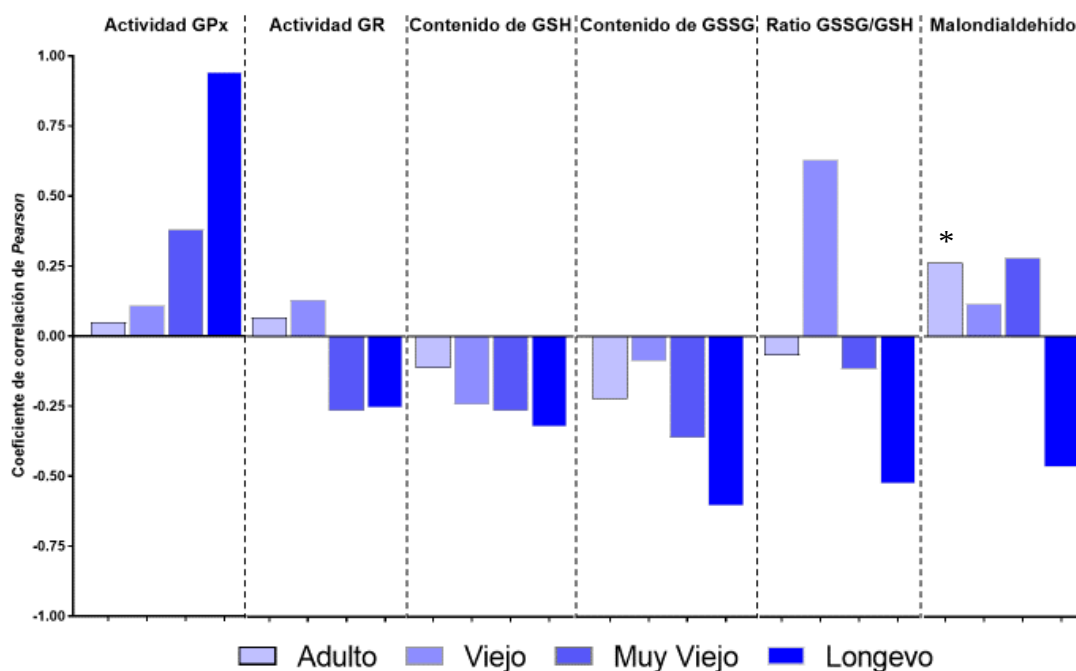


Figura 47. Coeficientes de correlación de Pearson para parámetros de estrés oxidativo medidos en ratones macho a la edad adulta (40 semanas), vieja (72 semanas), muy vieja (96 semanas) y longeva (120 semanas), respecto a la esperanza de vida que alcanzan los animales. * $p < 0,05$.

2.2. Construcción de modelos matemáticos de predicción de la longevidad en función de parámetros bioquímicos, inmunitarios y redox

Con los valores recogidos de cada parámetro en la edad adulta en ratones macho, se desarrollaron modelos matemáticos (correspondientes a la bioquímica sanguínea, función inmunitaria y estado oxidativo) mediante el método de regresión lineal múltiple por “paso adelante” usando la longevidad observada como variable objetivo o variable dependiente y todas las demás como variables independientes. Mediante este método se selecciona un primer parámetro según resulte más predictivo de la longevidad y posteriormente se

añaden nuevos parámetros en combinación lineal si mejoran el ajuste del modelo a la longevidad observada de los ratones. Adicionalmente, se generó un cuarto modelo considerando todas las variables medidas. Así, estos modelos matemáticos permiten calcular la longevidad individual que se estima a la edad adulta a cada ratón.

2.2.1. Modelo de bioquímica sanguínea

En relación con las variables bioquímicas, el primer parámetro que se seleccionó fue la concentración sanguínea de colesterol medida en la edad adulta. Este modelo de una variable era capaz de explicar la varianza de la longevidad en un 10,9%. Al añadir la concentración de triglicéridos en sangre como una segunda variable predictiva, el nuevo modelo llegaba a explicar un 14,5% de la varianza vista en los datos de longevidad de los ratones (Tabla 17).

Tabla 17. Modelo matemático de predicción de longevidad basado en datos de bioquímica sanguínea.

Pasos	1 variable	2 variables
R^2	13,2%	19,0%
R^2 Ajustado	10,9%	14,5%
Constante ($\hat{\beta}_0$)	111,3(13,5)***	101,3(14,6)***
Colesterol ($\hat{\beta}_1$)	-0,19(0,08)*	-0,17(0,08)*
Triglicéridos ($\hat{\beta}_2$)	-	0,06(0,03)

Se representa cada variable adicional introducida en el modelo y las filas contienen los valores de la R^2 y R^2 ajustada de cada set de variables consideradas y los coeficientes para cada variable con su error estándar entre paréntesis.

* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$.

El método de la regresión lineal múltiple seleccionó únicamente dos de las tres posibles variables (glucosa, colesterol y triglicéridos) para el modelo de predicción de la longevidad a partir de datos bioquímicos recogidos, ya que la adición de la tercera variable no mejoraba el ajuste del modelo a la longevidad. Por tanto, la ecuación obtenida para estimar la longevidad en ratones macho adultos fue la que se detalla en la **Ecuación 4**.

Ecuación 4:

$$\text{Longevidad estimada} = 101,3 - 0,17 * \text{Col} + 0,06 * \text{Tg}$$

Donde:

- *Col* – Concentración de colesterol en sangre (mg/dL).
- *Tg* – Concentración de triglicéridos en sangre (mg/dL).

Esta ecuación explica la varianza en la longevidad en un 14,5% (R^2 ajustada=0,145), con un coeficiente de correlación de *Pearson* de 0,321 y una significación de $p < 0,05$ (**Figura 48**).

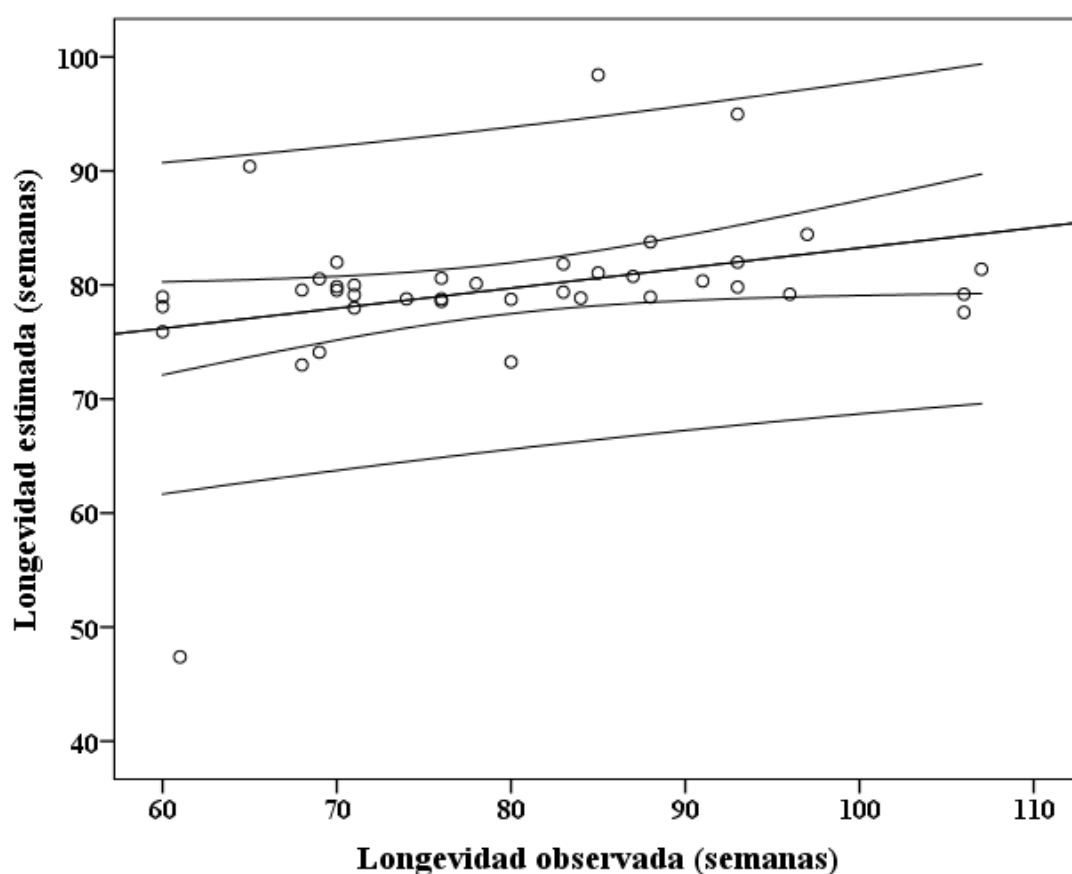


Figura 48. Diagrama de dispersión entre la longevidad observada (eje X) y la longevidad estimada (eje Y) por la fórmula predicción de longevidad con datos de bioquímica sanguínea en los ratones macho adultos. La línea central representa la regresión del modelo, las líneas adyacentes el intervalo de confianza medio al 95% y las siguientes el intervalo de confianza individual al 95%. Coeficiente de correlación de *Pearson* de 0,321 ($p < 0,05$)

2.2.2. Modelo de función inmunitaria

Empleando los datos obtenidos en las funciones inmunitarias estudiadas en ratones macho adultos (40 semanas), se generó un modelo predictivo de la longevidad de cada ratón.

El parámetro más predictivo por sí solo y el primero que se seleccionó fue la capacidad de quimiotaxis de los linfocitos, dando lugar a una explicación de la varianza observada en la longevidad del 18,7%. Esta explicación de la varianza ascendía al 19,7% al añadir una segunda variable (proliferación basal), mientras que, con el porcentaje de estimulación de la proliferación de linfocitos en respuesta a ConA como tercera variable, la explicación de la varianza disminuye a un 19,4% de la R^2 ajustada. Sin embargo, al adicionar el valor absoluto de proliferación con ConA, se volvía a aumentar la explicación de la varianza hasta un 22,7% de la longevidad observada en el lote de ratones macho (Tabla 18).

Tabla 18. Modelo matemático de predicción de longevidad basado en datos de función inmunitaria

Pasos	1 variable	2 variables	3 variables	4 variables
R^2	20,9%	24,0%	25,9%	31,0%
R^2 Ajustada	18,7%	19,7%	19,4%	22,7%
Constante ($\widehat{\beta}_0$)	102,3(7,3)***	108,8(9,1)***	113,6(10,5)**	127,2(13,4)***
Quimiotaxis de linfocitos ($\widehat{\beta}_1$)	-0,02(0,01)**	-0,02(0,01)**	-0,02(0,01)*	-0,02(0,01)*
Proliferación basal ($\widehat{\beta}_2$)	-	-0,04(0,03)	-0,05(0,04)	-0,15(0,07)*
Estimulación ConA ($\widehat{\beta}_3$)	-	-	-0,03(0,03)	-0,09(0,05)
Proliferación ConA ($\widehat{\beta}_4$)	-	-	-	0,05(0,03)

Se representa cada variable adicional introducida en el modelo y las filas contienen los valores de la R^2 y R^2 ajustada de cada set de variables consideradas y los coeficientes para cada variable con su error estándar entre paréntesis.

** $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$.*

La incorporación de más variables al modelo no supuso una mejora de la R^2 ajustada, por lo que se seleccionó el modelo de cuatro variables para la estimación de la longevidad a partir de datos de función inmunitaria. De esta forma, la ecuación obtenida

para estimar la longevidad en ratones macho adultos fue la que se detalla en la **Ecuación 5**.

Ecuación 5:

$$\text{Longevidad estimada} = 127,2 - 0,02 * QL - 0,15 * LB - 0,09 * \%C + 0,5 * LC$$

Donde:

- QL – Índice quimiotáctico de linfocitos.
- LB – Valor absoluto de proliferación basal de linfocitos.
- $\%C$ – Porcentaje de proliferación con ConA respecto a la proliferación basal.
- LC – Valor absoluto de proliferación de linfocitos estimulados con ConA.

Esta ecuación explica un 22,7% (R^2 ajustada=0,227) de la varianza observada en la longevidad, con un coeficiente de correlación de *Pearson* de 0,556 y una significación de $p < 0,001$ (**Figura 49**).

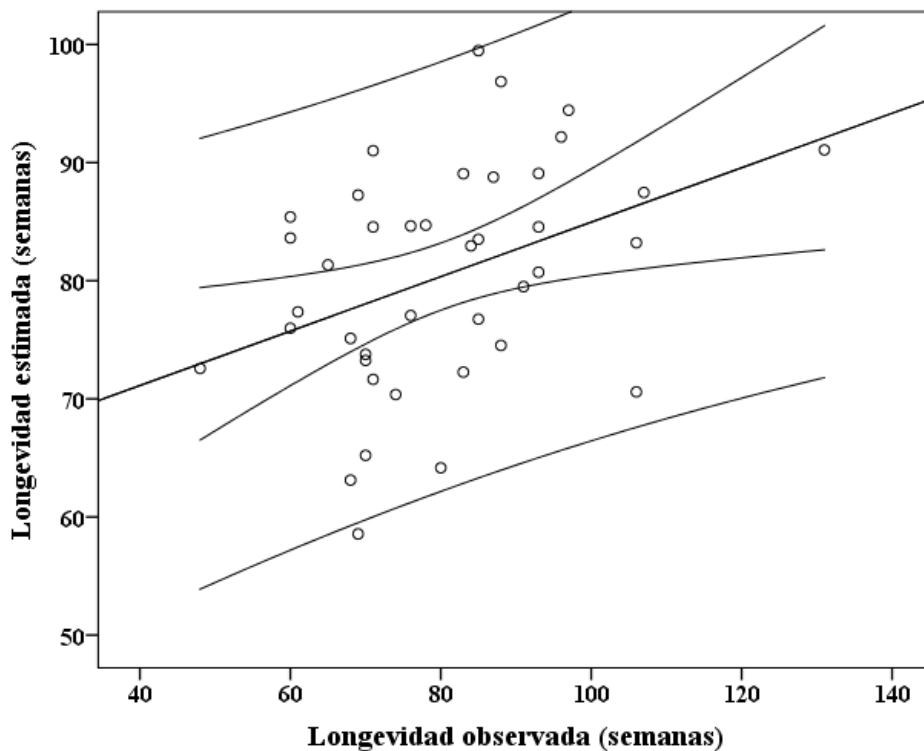


Figura 49. Diagrama de dispersión entre la longevidad observada (eje X) y la longevidad estimada (eje Y) por la fórmula predicción de longevidad con datos de función inmunitaria en los ratones macho adultos. La línea central representa la regresión del modelo, las líneas adyacentes el intervalo de confianza medio al 95% y las siguientes el intervalo de confianza individual al 95%. Ambas variables presentan un coeficiente de correlación de *Pearson* de 0,556 ($p < 0,001$)

2.2.3. Modelo de estado Redox

Procediendo como se ha indicado para los otros modelos, se generó uno con los valores obtenidos en los parámetros de estrés oxidativo cuando los ratones eran adultos (40 semanas), para la predicción de la longevidad.

El parámetro más predictivo de la longevidad fue la concentración de MDA presente en los leucocitos peritoneales que, por sí misma, explicaba un 22,2% de la varianza en la longevidad observada. Al introducir la actividad GR normalizada como segunda variable, la varianza se consiguió explicar en un 33,3%. La tercera variable adicionada fue la concentración de GSSG, que aumentaba la explicación de la varianza hasta un 37,7% y concentración del GSH la aumentaba al 40,2%. Por último, la adición de la otra enzima antioxidante estudiada (GPx) incrementó la explicación de la varianza en la longevidad hasta un 41,0% (**Tabla 19**).

Tabla 19. Modelo matemático de predicción de longevidad basado en datos de parámetros de estrés oxidativo

Pasos	1 variable	2 variables	3 variables	4 variables	5 variables
R²	24,7%	37,6%	43,8%	47,9%	50,5%
R² Ajustada	22,2%	33,3%	37,7%	40,2%	41,0%
Constante ($\widehat{\beta}_0$)	750,8(3,3)***	840,3(4,6)***	910,1(5,9)***	870,3(6,4)***	890,7(6,7)***
MDA ($\widehat{\beta}_1$)	0,74(0,23)**	0,78(0,22)**	0,76(0,21)**	0,80(0,21)**	0,85(0,21)***
GR ($\widehat{\beta}_2$)	-	0,114(0,24)*	-0,28(0,11)*	-0,23(0,11)	-0,17(0,12)
GSSG ($\widehat{\beta}_3$)	-	-	-0,90(0,51)	-10,27(0,56)*	-10,24(0,56)*
GSH ($\widehat{\beta}_4$)	-	-	-	0,60(0,41)	0,57(0,41)
GPx ($\widehat{\beta}_5$)	-	-	-	-	-0,04(0,04)

Se representa cada variable adicional introducida en el modelo y las filas contienen los valores de la R² y R² ajustada de cada set de variables consideradas y los coeficientes para cada variable con su error estándar entre paréntesis.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$.

Se seleccionó el modelo de cinco variables como modelo de estado oxidativo para la estimación de la longevidad en ratones macho adultos que se detalla en la **Ecuación 6**.

Ecuación 6:

$$\text{Longevidad estimada} = 89,7 + 0,85 \times \text{MDA} - 0,17 \times \text{GR} - 1,24 \times \text{GSSG} + 0,57 \times \text{GSH} - 0,04 \times \text{GPx}$$

Donde:

- *MDA* – Concentración de malondialdehído (ng/mg).
- *GR* – Actividad de glutatión reductasa (U/mg).
- *GSH* – Concentración de glutatión reducido (nmol/mg).
- *GSSG* – Concentración de glutatión oxidado (nmol/mg).
- *GPx* – Actividad de glutatión peroxidasa (U/mg).

Este modelo predice un 41,0% (R^2 ajustada = 0,410) la varianza en los valores de la longevidad, con un coeficiente de correlación de *Pearson* de 0,711 con una significación de $p < 0,001$ (**Figura 50**).

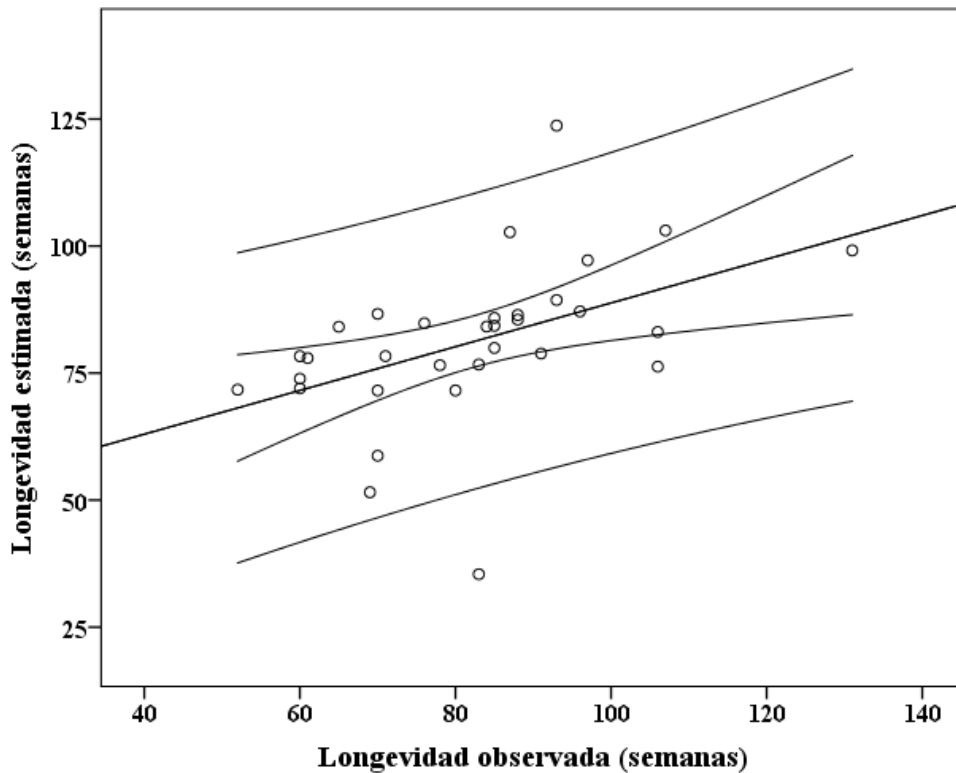


Figura 50. Diagrama de dispersión entre la longevidad observada (eje X) y la longevidad estimada (eje Y) por la fórmula predicción de longevidad con datos de estado redox en los ratones macho adultos. La línea central representa la regresión del modelo, las líneas adyacentes el intervalo de confianza medio al 95% y las siguientes el intervalo de confianza individual al 95%. Coeficiente de correlación de Pearson de 0,711 ($p < 0,001$)

2.2.4. Modelo combinado

Por último, se realizó un modelo en el que se tuvieron en cuenta la totalidad de las variables consideradas en esta cohorte de ratones (bioquímicas, inmunitarias y de estado redox), generando así un “modelo combinado”. Este modelo consideró el colesterol en sangre como la primera variable, explicando así un porcentaje de la varianza del 9,6%. La segunda variable en incorporarse fue la actividad enzimática glutatión peroxidasa (GPx), que incrementó la varianza explicada hasta el 23,5%. Añadiendo el índice quimiotáctico de linfocitos se aumentó la proporción de la varianza que explicaba el modelo hasta un 33,1%. La cuarta variable en incorporarse fue la capacidad de proliferación de los linfocitos en presencia de LPS, aumentando así la R^2 ajustada hasta

un 39,6% y la quinta variable (GSH) al 43,9%. La última variable en ser introducida por el modelo fue el índice fagocítico y aumentó la explicación de la varianza observada en la longevidad hasta un 48,6% (**Tabla 20**).

Tabla 20. Modelo matemático combinado de predicción de longevidad basado en todos los parámetros analizados en el estudio longitudinal de ratones macho

Pasos	1 variable	2 variables	3 variables	4 variables	5 variables	6 variables
R²	12,8%	29,0%	40,3%	48,2%	54,0%	59,6%
R² Ajustada	9,6%	23,5%	33,1%	39,6%	43,9%	48,6%
Constante (β_0)	111,3(15,2)***	126,6(15,3)***	135,2(14,8)***	124,9(15,1)***	123,9(14,6)***	129,3(14,3)***
Colesterol (β_1)	-0,18(0,09)	-0,23(0,09)*	-0,19(0,08)*	-0,17(0,08)*	-0,18(0,08)*	0,23(0,08)**
GPx (β_2)	-	-0,08(0,03)*	-0,09(0,03)**	-0,10(0,03)**	-0,10(0,03)**	-0,09(0,03)**
Quimiotaxis de linfocitos (β_3)	-	-	-0,02(0,01)*	-0,02(0,01)*	-0,02(0,01)**	-0,01(0,01)*
Estimulación LPS (β_4)	-	-	-	-0,06(0,03)	-0,06(0,03)*	-0,07(0,03)*
GSH (β_5)	-	-	-	-	0,51(0,30)	0,63(0,30)*
Índice fagocítico (β_6)	-	-	-	-	-	-0,01(0,01)

Se representa cada variable adicional introducida en el modelo y las filas contienen los valores de la R² y R² ajustada de cada set de variables consideradas y los coeficientes para cada variable con su error estándar entre paréntesis.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$.

Así, se seleccionó el modelo de seis variables para la estimación de la longevidad a partir de datos de bioquímica sanguínea, función inmunitaria y estado redox. La ecuación obtenida para estimar la longevidad en ratones macho adultos fue la que se detalla en la

Ecuación 7:

Ecuación 7: Longevidad estimada $= 129,3 - 0,23 \times Col - 0,09 \times GPx - 0,01 \times QL - 0,07 \times L\% - 0,63 \times GSH - 0,01 \times IF$

Donde:

- *Col* – Concentración de colesterol en sangre (mg/dL).
- *GPx* – Actividad de glutatión peroxidasa (U/mg).
- *QL* – Índice quimiotáctico de linfocitos
- *L%* – Capacidad LPS (%)
- *GSH* – Contenido de glutatión reducido (nmol/mg prot).
- *IF* – Índice fagocítico.

Usando la longevidad estimada por el modelo combinado, capaz de explicar un 48,6% de la varianza observada en la longevidad (R^2 ajustada=0,486), y correlacionándolo con la longevidad observada, se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0,772 y una significación de $p < 0,001$ (**Figura 51**).

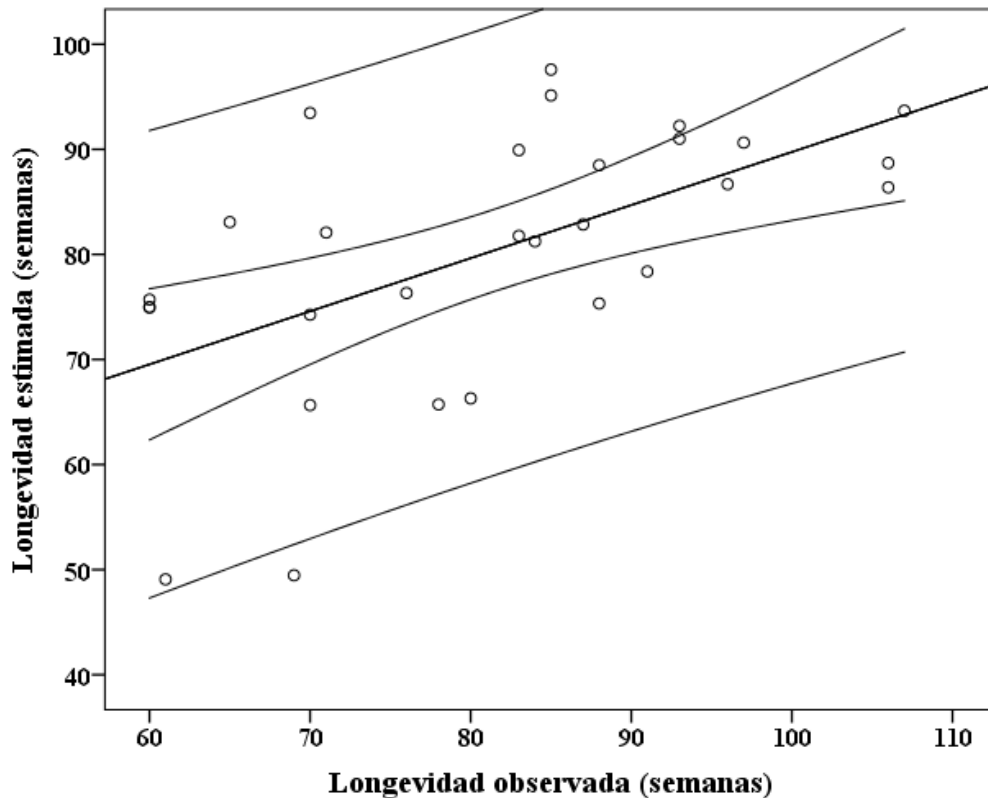


Figura 51. Diagrama de dispersión entre la longevidad observada (eje X) y la longevidad estimada (eje Y) por la fórmula predicción de longevidad con datos combinados en los ratones macho adultos. La línea central representa la regresión del modelo, las líneas adyacentes el intervalo de confianza medio al 95% y las siguientes el intervalo de confianza individual al 95%. Coeficiente de correlación de Pearson de 0,772 ($p < 0,001$).

2.3. Respuesta conductual en machos y hembras

Como ya se ha comentado, el comportamiento en ratones muestra un claro dimorfismo sexual. En estudios previos de nuestro laboratorio se desarrolló un modelo predictivo de longevidad en ratones hembra de la cepa ICR-CD1 con parámetros a la edad adulta (40 semanas) (Martínez de Toda *et al.*, 2019c). En la presente tesis se analizó la conducta mostrada por una nueva cohorte de ratones hembra (N=45), replicando el experimento antes comentado, realizando las pruebas conductuales del laberinto en T, el

laberinto en cruz elevado (EPM) y el tablero con agujeros (HB), para validar el modelo predictivo de la longevidad. Asimismo, se empleó una cohorte de ratones macho (N=43) para estudiar las respuestas conductuales en este sexo y aplicabilidad en los machos del modelo conductual previamente publicado en hembras, y comprobar si es o no necesario generar un modelo específico para cada sexo.

2.3.1. Longevidad de hembras y machos

Se compararon las longevidades que alcanzaron las cohortes de ratones de ambos sexos, obteniéndose un rango de 42 a 132 semanas (media $\pm$ desviación estándar de 78 ± 24 semanas) para los ratones hembra y entre 48 a 115 semanas (media $\pm$ desviación estándar de 79 ± 15 semanas) para los machos. Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos en una prueba de Mantel-Cox (**Figura 52**).

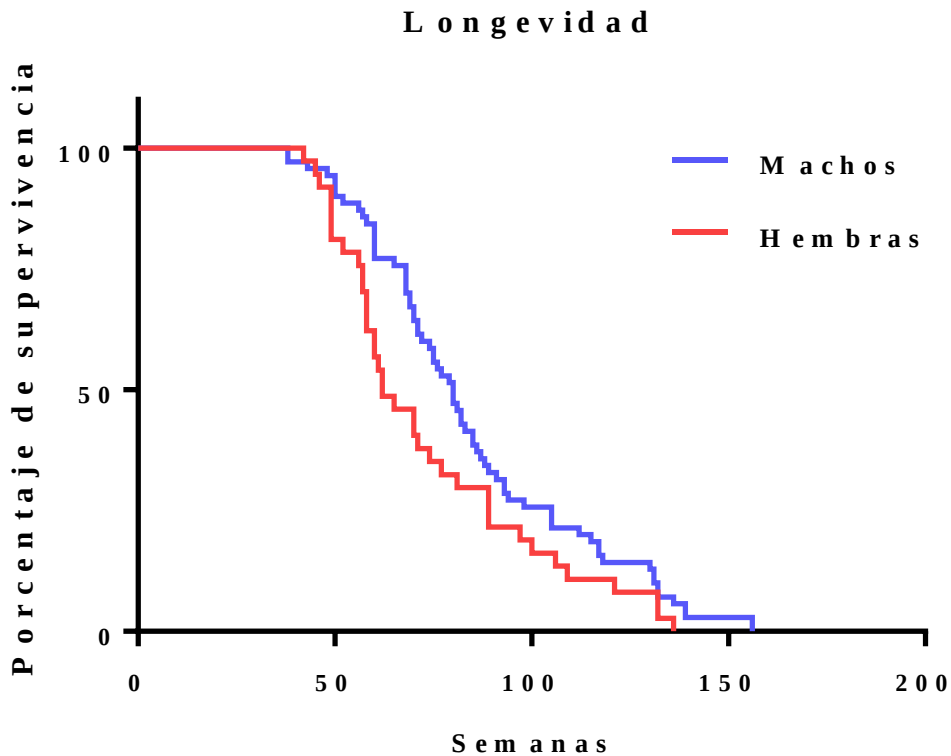


Figura 52. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para hembras (N=45) y machos (N=43) de los ratones a los que se les realizaron las pruebas conductuales. No se detectaron diferencias significativas entre ambos sexos en la prueba Mantel-Cox $\chi^2=3,544$, $p=0,0597$

2.3.2. Conducta exploratoria en machos y hembras

Los resultados obtenidos en la conducta exploratoria, tanto horizontal como vertical, en el HB, que presentan machos y hembras se muestran en la **Figura 53**. En la exploración horizontal se observó que las hembras realizaban una deambulaci3n significativamente superior a los machos en las zonas internas del tablero ($p<0,05$, **Figura 53A**), pero no en la regi3n externa del mismo ($p=0,206$, **Figura 53B**), ni en el n3mero total de casillas recorridas (deambulaci3n total, $p=0,646$, **Tabla 21**). Con respecto a la exploraci3n vertical, representada por el n3mero (**Figura 53C**) y duraci3n (**Figura 53D**) de *rearings* sin apoyo (posiciones en las que el animal se yergue sobre las patas traseras con una inclinaci3n del tronco m3nima de 45° respecto al suelo sin requerir de apoyar las patas delanteras sobre ninguna pared), los ratones macho mostraron tanto mayor repetici3n

como duración total en esa posición que las hembras ($p<0,001$ y $p<0,05$, respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos en relación a la exploración dirigida, representada por el número y duración de *head-dippings* que realizaban los ratones (número de veces y tiempo que los ratones introducían la cabeza en el interior de cualquiera de los agujeros, que contenían tapones blancos de plástico) (Tabla 21).

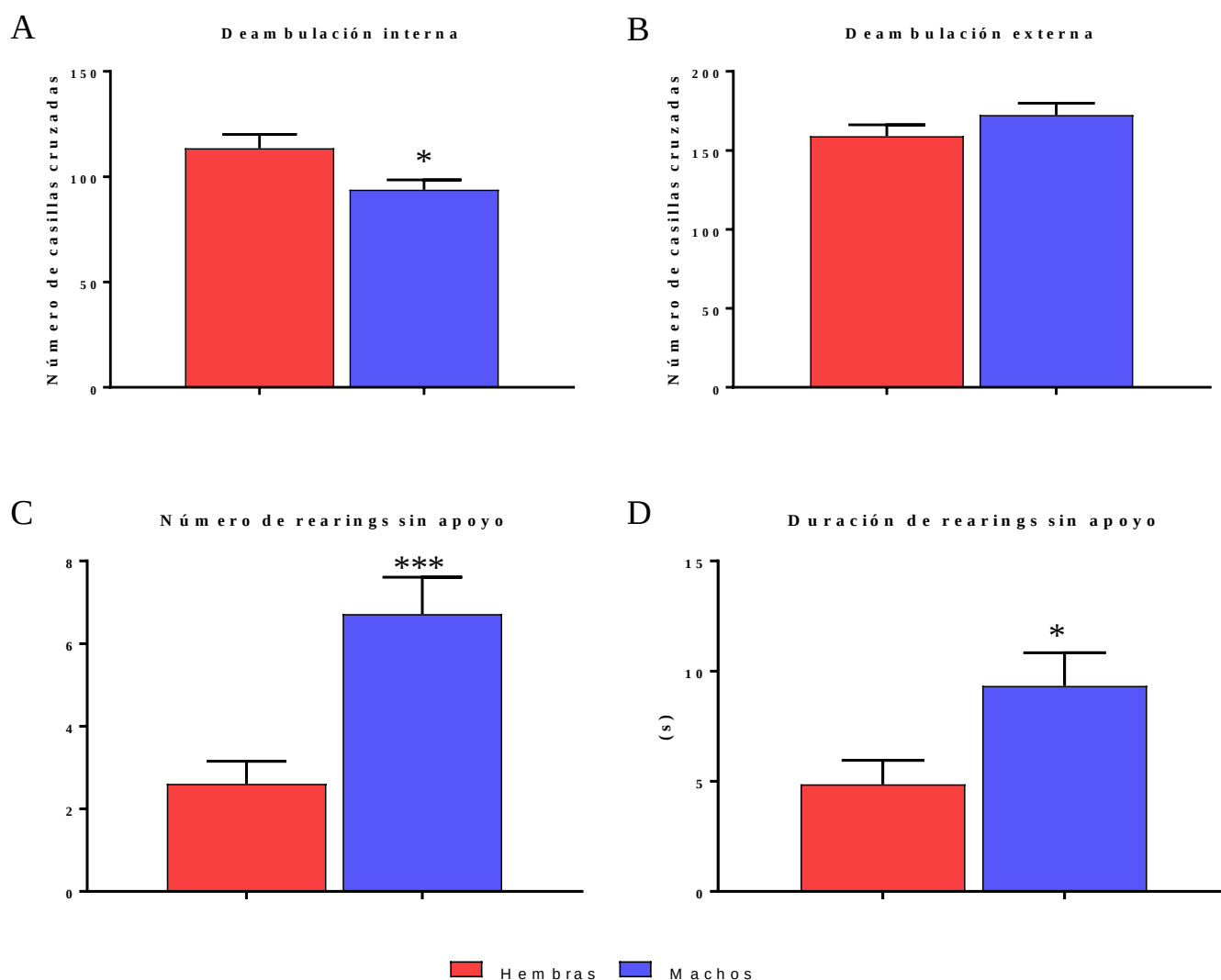


Figura 53. Parámetros conductuales relacionados con la exploración entre ratones hembra (N=45) y macho (N=43) a la edad adulta en la prueba del tablero con agujeros. A) Número de cuadrados interiores cruzados; B) Número de cuadrados exteriores cruzados; C) Número de rearings sin apoyo y D) Duración de las posiciones de rearings sin apoyo. Los resultados se muestran como la media de los valores obtenidos en cada parámetro y el error estándar. * $p<0,05$ * $p<0,001$ respecto al correspondiente valor en hembras**

En la **Tabla 21** se muestran aquellas variables conductuales en las que no se observaron diferencias entre ambos sexos.

Tabla 21. Parámetros conductuales de exploración en los que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ratones macho y hembra adultos ICR-CD1.				
Parámetro	Machos (N=43)		Hembras (N=45)	
	Media	EE	Media	EE
Deambulación total (casillas cruzadas)	266	± 10	273	± 9
Nº de rearings con apoyo (n)	25,8	± 1,5	21,4	± 1,8
Nº de head-dippings (n)	17,3	± 0,8	18,2	± 0,9
Duración total de head-dippings (s)	50,4	± 3,5	56,6	± 4,8
Duración total de groomings (s)	6,0	± 0,9	7,0	± 0,9
Tiempo en BC (s)	125,7	± 5,6	143,8	± 9,6
Tiempo en BA (s)	91,6	± 5,6	104,8	± 10,4
Nº de entradas en BC (n)	11,4	± 0,5	10,5	± 0,6
Nº de entradas en BA (n)	8,7	± 0,7	7,7	± 0,7
<i>Los datos son las medias ± el error estándar (EE) de los valores obtenidos para cada uno de los parámetros en machos (N=43) y hembras (N=45).</i>				
<i>BC: Brazos cerrados; BA: Brazos abiertos; n: número; s: segundos</i>				

2.3.3. Conducta de ansiedad en machos y hembras

En respuestas conductuales relacionadas con el estado de ansiedad también se encontraron diferencias entre machos y hembras (**Figura 54**). En primer lugar, la locomoción interna y externa se obtuvieron como porcentaje, dividiendo el número de cuadrados cruzados internos o externos por el total de cuadrados cruzados en el HB. Se observó que en los ratones hembra había un mayor porcentaje de locomoción interna y menor locomoción externa que en los machos ($p<0,001$, **Figura 54A** y **Figura 54B**, respectivamente). En relación con el número de *groomings* en el HB, éstos fueron más abundantes en las hembras en comparación con los machos ($p<0,001$, **Figura 54C**), pero no hubo diferencias estadísticamente significativas en el tiempo total de duración de los *groomings* (**Tabla 21**). En cuanto a los *rearings* con apoyo en la pared en el HB, los machos pasaron más tiempo que las hembras en esa posición ($p<0,001$, **Figura 54D**), pero no hubo diferencias estadísticamente significativas en el número total de esos *rearings* que realizó cada sexo (**Tabla 21**).

Adicionalmente, los ratones macho tardaron en promedio significativamente más tiempo en llegar a la intersección entre ambos brazos del laberinto en T que las hembras ($p<0,05$, **Figura 54E**).

Respecto a los resultados obtenidos en el EPM, los ratones macho pasaron más tiempo en la plataforma central (PC) que las hembras ($p<0,001$, **Figura 54F**), mientras que no se observaron diferencias significativas con relación al tiempo o número de entradas en los brazos abiertos (BA) ni en los brazos cerrados (BC) (**Tabla 21**).

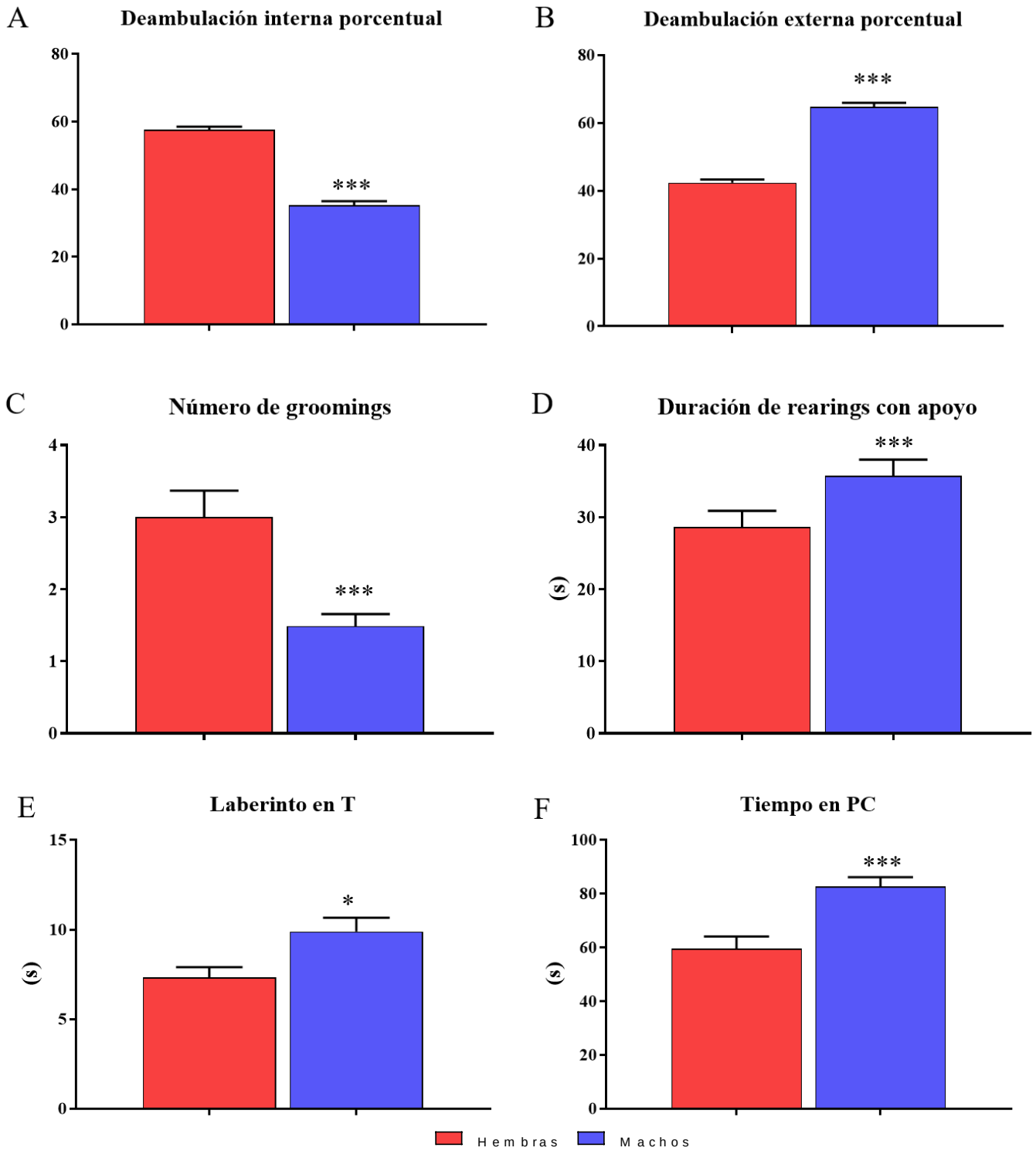


Figura 54. Comparación de parámetros relacionados con la conducta de ansiedad en ratones hembra (N=45) y macho (N=43) adultos de la cepa ICR-CD1. A) Porcentaje de deambulación interna y B) Porcentaje de locomoción externa en el tablero con agujeros (HB). C) Número de groomings en el HB. D) Duración total de rearings con apoyo en el HB. E) Tiempo que tarda en llegar a la intersección del laberinto en T. F) Tiempo de permanencia en la plataforma central (PC) del laberinto en cruz elevado (EPM). Los resultados se muestran como la media de los valores obtenidos en cada parámetro y el error estándar.

*** $p < 0,001$ * $p < 0,05$.

2.3.4. Capacidad predictiva de parámetros conductuales en ratones macho y hembra a la edad adulta

2.3.1.2. de los datos conductuales recogidos en ratones ICR-CD1 de ambos sexos a la edad adulta, y con el fin de determinar si alguno de los parámetros conductuales era capaz de predecir la esperanza de vida, se correlacionaron los valores obtenidos de cada uno de esos parámetros con la longevidad que alcanzaba el correspondiente individuo, obteniéndose los siguientes valores de coeficiente de correlación de Pearson, que se indican a continuación según sean conductas exploratorias o relacionadas con la ansiedad.

2.3.4.1. Parámetros conductuales de exploración

Los datos obtenidos en los parámetros conductuales, relacionados con la capacidad exploratoria que presentaron los ratones, se correlacionaron con la longevidad alcanzada por cada individuo y se halló el coeficiente de correlación de Pearson, como se muestra en la **Tabla 22** y en la **Figura 55**.

En hembras, las variables exploratorias que resultaron significativamente predictivas fueron la deambulación total ($p < 0,001$) y la deambulación interna en valor absoluto ($p < 0,001$), ambas de manera positiva. Mientras que en machos la deambulación total no correlaciona significativamente con la longevidad, pero sí la deambulación en zonas internas del tablero, también de manera positiva ($p < 0,001$).

Las posiciones en las que el animal se yergue sobre las patas traseras con una inclinación del tronco mínima de 45° respecto al suelo (*rearings*) se contabilizaron como número de veces y como tiempo total que permanecía en dicha posición sin requerir de apoyar las patas delanteras sobre ninguna pared. Ninguno de estos parámetros dio resultados significativos en cuanto al coeficiente de correlación de *Pearson* en ningún sexo.

Ni el número de rearings sin apoyo, ni el tiempo de los mismos dio resultados significativos en cuanto al coeficiente de correlación de Pearson en ningún sexo. Adicionalmente, en la medida de exploración dirigida, en el HB, ni en el número de veces ni el tiempo que los ratones hacían *head-dippings*, se obtuvo ninguna correlación significativa con la edad (Tabla 22 y Figura 55).

Tabla 22. Correlaciones entre los valores de los parámetros de la conducta de exploración realizados en la prueba del tablero con agujeros (HB) por ratones hembra y macho a la edad adulta (40 semanas)

Parámetro	Hembras (N=45)		Machos (N=43)	
	Correlación de Pearson	Significación	Correlación de Pearson	Significación
Deambulación total	0,592 ***	0,000	0,228	0,179
Deambulación Externa	0,037	0,826	-0,058	0,712
Deambulación Interna	0,818 ***	0,000	0,581 ***	0,000
Nº rearings sin apoyo	-0,146	0,382	0,134	0,390
Tiempo rearings sin apoyo	0,154	0,357	0,068	0,666
Nº head-dippings	-0,058	0,731	-0,067	0,667
Tiempo head-dippings	-0,070	0,677	-0,005	0,975

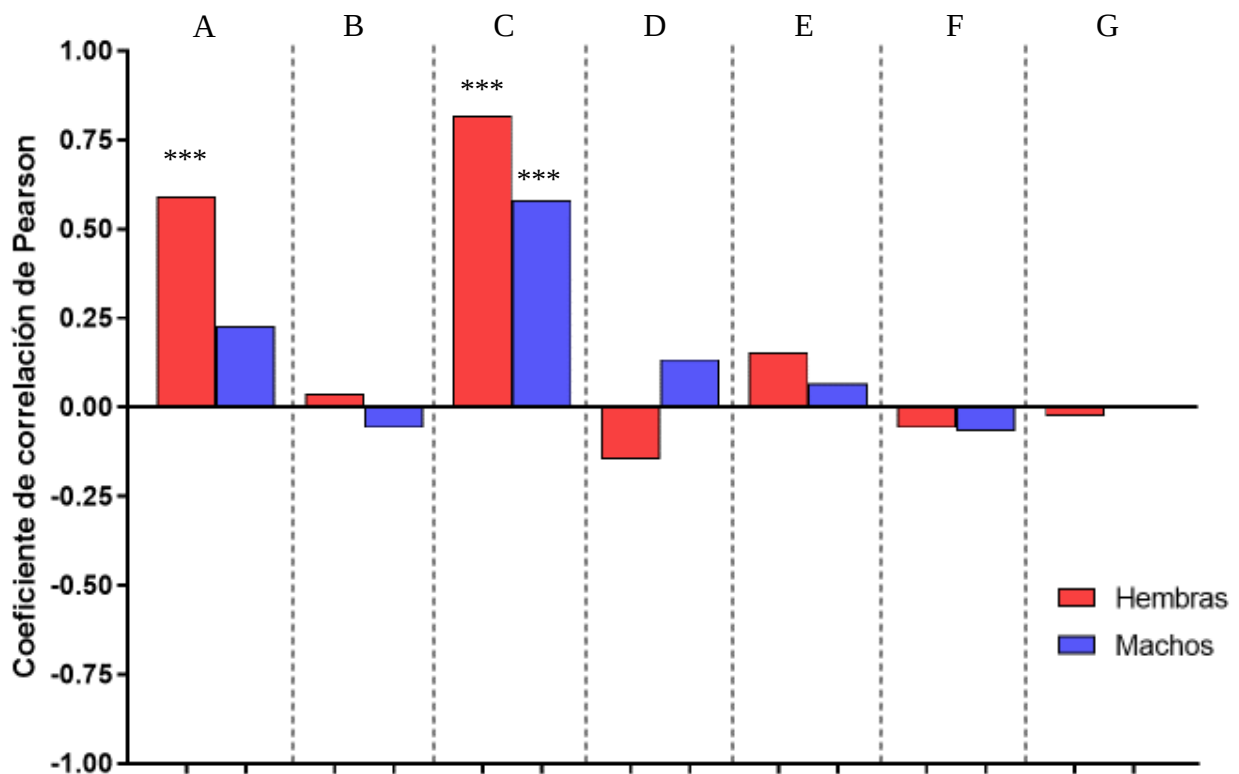


Figura 55. Coeficientes de correlación de Pearson y sus significaciones en parámetros de exploración en el HB para hembras (N=45) y machos (N=43). A) deambulación total, B) deambulación externa, C) deambulación interna, D) nº de rearings sin apoyo, E) duración total de rearings sin apoyo y F) nº de head-dippings y G) duración total de head-dippings. * $p < 0,001$ en la correlación de Pearson.**

2.3.4.2. Parámetros conductuales relacionados con la ansiedad

Las conductas de tipo ansiedad medidas en el EPM se representan en la **Tabla 23** y en la **Figura 56**. Las variables más predictivas en hembras fueron el tiempo que pasan los ratones en los brazos abiertos (BA) ($p < 0,001$) del EPM obteniéndose una correlación positiva y el tiempo y número de entradas ($p < 0,05$) en brazos cerrados (BC), esta vez con correlación negativa. Mientras que en machos las dos variables que correlacionaron con la longevidad que alcanzaban fueron el tiempo transcurrido en los BC de manera negativa ($p < 0,05$) y el tiempo transcurrido en la PC del EPM de manera positiva ($p < 0,001$). Ni el tiempo transcurrido en BA, ni las entradas en BA, BC, o PC obtuvieron en una correlación significativa con la longevidad.

Tabla 23. Correlaciones entre los valores de los parámetros conductuales de ansiedad realizados por ratones hembra y macho a la edad adulta (40 semanas) en el laberinto en cruz elevado (EPM)

Parámetro	Hembras (N = 45)		Machos (N=43)	
	Correlación de Pearson	Significación	Correlación de Pearson	Significación
Tiempo en BA	0,470 **	0,001	-0,105	0,501
Nº de entradas en BA	0,186	0,263	0,029	0,854
Tiempo en BC	-0,590 ***	0,000	-0,309 *	0,044
Nº de entradas en BC	-0,330 *	0,043	0,104	0,506
Tiempo en PC	0,131	0,026	0,668 ***	0,000
Nº de entradas en PC	0,069	0,682	0,135	0,389

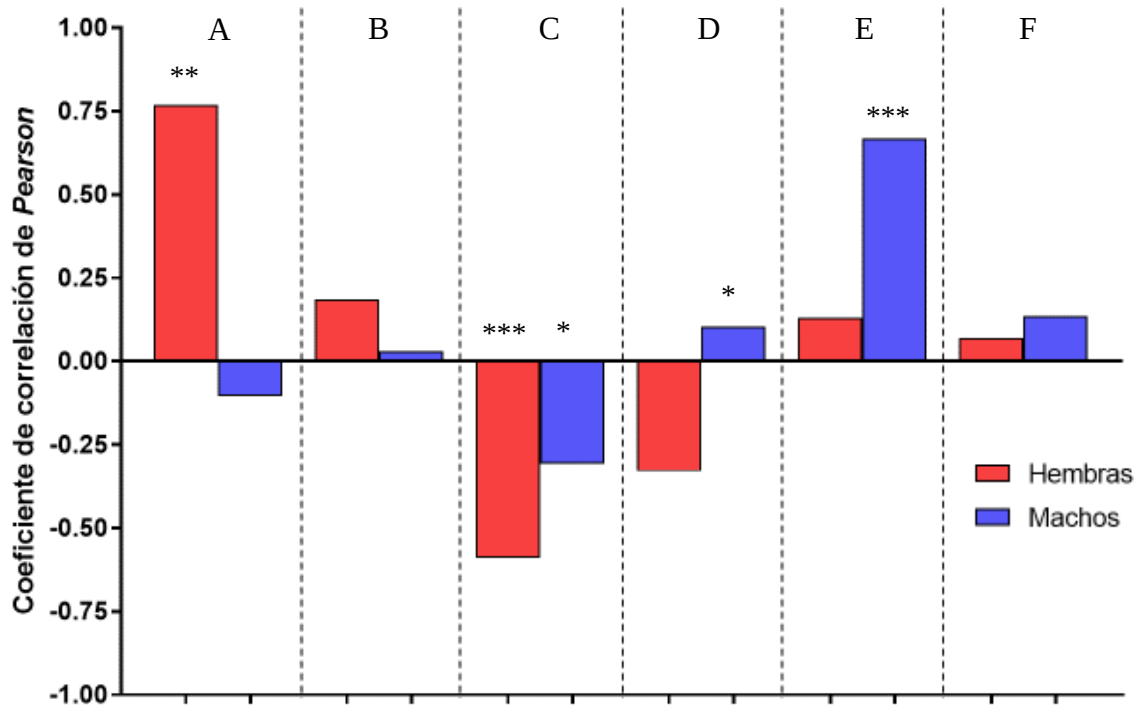


Figura 56. Coeficientes de correlación de Pearson y sus significaciones en parámetros conductuales de ansiedad en el laberinto en cruz elevado (EPM) para hembras (N=45) y machos (N=43). **A)** Tiempo en brazos abiertos (BA), **B)** n° de entradas en BA, **C)** tiempo en brazos cerrados (BC), **D)** n° de entradas en BC, **E)** tiempo en plataforma central PC y **F)** n° de entradas en la PC.
 * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Respecto a otros parámetros de conductas de ansiedad medidas en el laberinto en T y en el HB (**Tabla 24** y la **Figura 57**), no se observó una correlación significativa con la longevidad, en ninguno de los sexos, en el caso de los tiempos necesarios para atravesar la intersección del laberinto en T, y en los *rearings* realizados contra la pared, al igual que los realizados sin apoyo. Sin embargo, en los porcentajes de deambulación externa e interna sí se dio una correlación negativa y positiva, respectivamente ($p < 0,001$) en machos, mientras que no se observó correlación significativa en el caso de las hembras. En cuanto a las posturas de *grooming*, tanto el número como el tiempo total que empleaban en esa conducta, mostraron correlación significativa y negativa en ambos casos en ratones macho ($p < 0,05$).

Tabla 24. Correlaciones entre los valores de los parámetros conductuales de ansiedad realizados por ratones hembra y macho a la edad adulta (40 semanas) en el laberinto en T (LT) y el tablero con agujeros (HB)

Parámetro	Hembras (N = 45)		Machos (N=43)	
	Correlación de Pearson	Significación	Correlación de Pearson	Significación
Tiempo de cruce en LT	-0,146	0,380	0,209	0,179
Deambulación Externa %	-0,139	0,363	-0,581 ***	0,000
Deambulación Interna %	0,139	0,363	0,581 ***	0,000
Nº rearings con apoyo	-0,050	0,764	-0,110	0,484
Tiempo rearings con apoyo	0,011	0,946	-0,221	0,155
Nº Grooming	-0,033	0,843	-0,343 *	0,024
Tiempo Grooming	0,050	0,766	-0,381 *	0,012

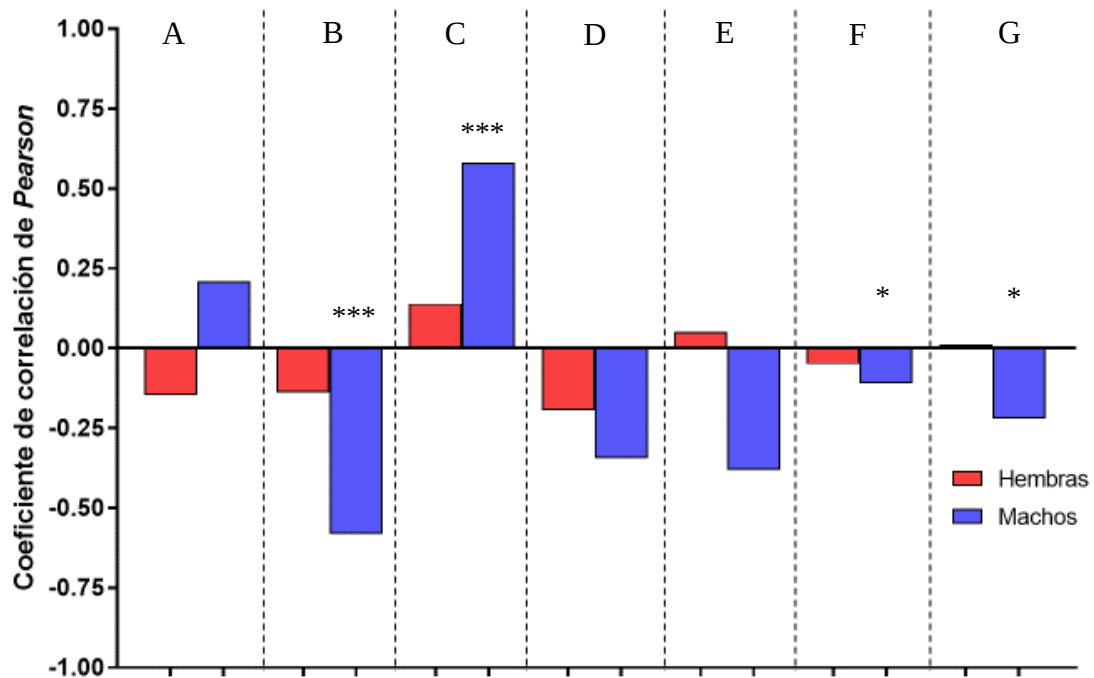


Figura 57. Coeficientes de correlación de Pearson y sus significaciones en parámetros conductuales de ansiedad para hembras (N=45) y machos (N=43) en el laberinto en T (LT) y el tablero con agujeros (HB). A) Tiempo en cruzar la intersección del LT, B) deambulación porcentual externa en HB, C) deambulación porcentual interna en HB, D) nº de rearings con apoyo E) duración de rearings con apoyo F) nº de groomings, G) duración de groomings.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

2.3.5. Construcción de un modelo matemático de predicción de la longevidad en función de parámetros conductuales en ratones macho

2.3.5.1. Validación del modelo matemático de hembras en una nueva cohorte de hembras y aplicabilidad en una cohorte de machos.

Con los datos conductuales de una nueva cohorte de hembras empleada en la presente tesis (N=45), se procedió a la validación del modelo previamente desarrollado en hembras adultas (40 semanas) (Martínez de Toda *et al.*, 2019c, **Ecuación 8**), obteniéndose un coeficiente de correlación de *Pearson* de 0,774 ($p < 0,001$) (**Figura 58**).

Ecuación 8:
Longevidad estimada = $11,833 + 0,378 \times (\text{Deambulaci3n interna}) + 0,202 \times (\text{Tiempo en BA})$.

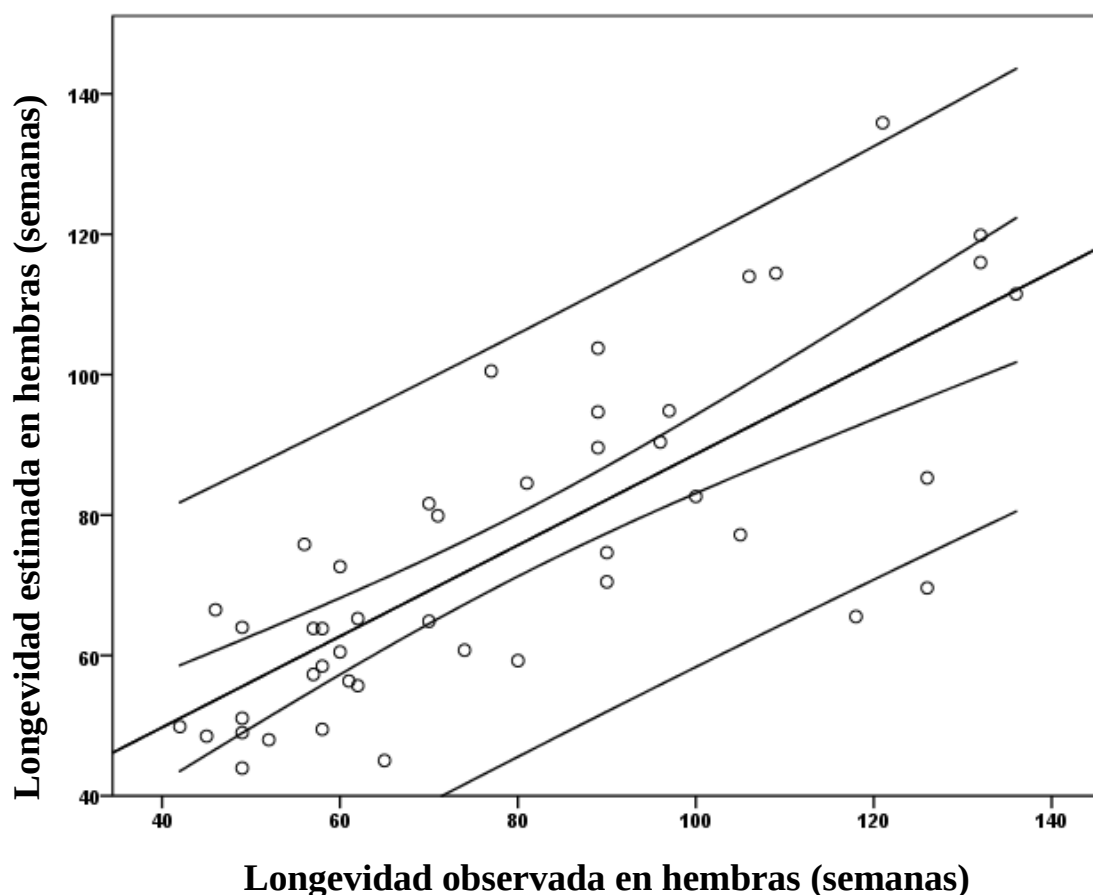


Figura 58. Gráfico de dispersión de las correlaciones entre la longevidad observada y la estimada al aplicar el modelo matemático generado previamente (Martínez de Toda *et al.*, 2019c) en ratones hembra a los datos de la nueva cohorte de ratones hembra (validación). La línea central representa la regresión del modelo, las líneas adyacentes el intervalo de confianza medio al 95% y las siguientes el intervalo de confianza individual al 95%. La aplicación del modelo generado en hembras previamente publicado para comprobar la replicabilidad resultó en un coeficiente de correlación de Pearson de 0,774 ($p < 0,001$).

A continuación, se utilizó el mismo modelo generado en hembras (Martínez de Toda *et al.*, 2019c) con la cohorte de machos adultos (40 semanas) estudiada en esta tesis (N=43), obteniéndose un coeficiente de correlación de *Pearson* de 0,421 ($p < 0,05$) (Figura 59).

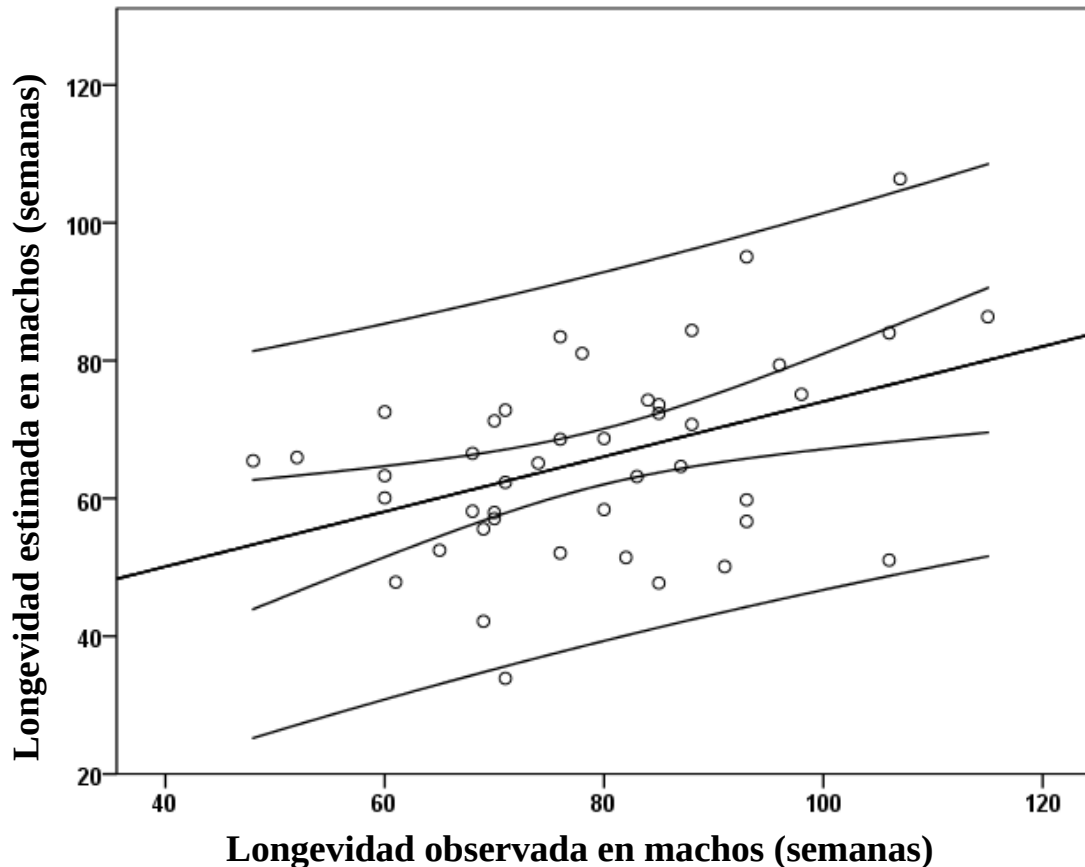


Figura 59. Gráfico de dispersión de las correlaciones entre la longevidad observada y la estimada al aplicar el modelo matemático generado previamente (Martínez de Toda *et al.*, 2019c) en ratones hembra a los datos de la cohorte de ratones macho. La línea central representa la regresión del modelo, las líneas adyacentes el intervalo de confianza medio al 95% y las siguientes el intervalo de confianza individual al 95%. La aplicación del modelo generado en hembras previamente publicado resultó en un coeficiente de correlación de *Pearson* de 0,421 ($p < 0,05$) para los ratones macho.

2.3.5.2. Modelo conductual

Viendo que la correlación del modelo previamente publicado en hembras (Martínez de Toda *et al.*, 2019c) arrojaba un coeficiente de correlación de *Pearson* de 0,421, se consideró generar un nuevo modelo con mejor aplicabilidad para machos con los datos conductuales obtenidos en la presente tesis.

Para ello, se realizó el procedimiento equivalente al empleado para la generación de los modelos bioquímico, inmunitario, redox y combinado. El primer parámetro que se seleccionó fue el tiempo que permaneció cada ratón en la PC del EPM (varianza explicada de 43,3%). La segunda variable introducida en el modelo fue la deambulación por la región interna del HB en forma porcentual, aumentando así la varianza hasta un 50,5%. Las variables tercera y cuarta fueron el número de *head-dippings* y *groomings* realizados también en el HB que incrementaron la varianza explicada hasta el 56,6% y 61,8%, respectivamente. La duración total en posición de *head-dipping* fue la quinta y última variable introducida en el modelo, aumentando así la varianza que conseguía explicar el modelo hasta el 63,6% (**Tabla 25**).

Tabla 25. Modelo matemático de predicción de longevidad basado en datos conductuales de ratones macho a la edad adulta

Pasos	1 variable	2 variables	3 variables	4 variables	5 variables
R²	44,7%	52,9%	59,7%	65,5%	67,9%
R² ajustada	43,3%	50,5%	56,6%	61,8%	63,6%
Constante ($\hat{\beta}_0$)	42,8(6,6)	29,1(8,0)	37,9(8,3)	49,3(9,0)	48,8(8,8)
Tiempo en la plataforma central ($\hat{\beta}_1$)	0,44(0,08)***	0,33(0,08)***	0,35(0,08)***	0,32(0,07)***	0,33(0,07)***
Deambulación interna (%) ($\hat{\beta}_2$)	-	0,64(0,24)*	0,74(0,23)**	0,75(0,22)***	0,77(0,21)***
Nº de <i>head-dippings</i> ($\hat{\beta}_3$)	-	-	-0,81(0,32)*	-1,00(0,31)**	-1,52(0,43)***
Nº de <i>groomings</i> ($\hat{\beta}_4$)	-	-	-	-3,53(1,40)*	-3,42(1,37)*
Duración de <i>head-dippings</i> ($\hat{\beta}_5$)	-	-	-	-	0,15(0,09)

Se representa cada variable adicional introducida en el modelo y las filas contienen los valores de la R^2 y R^2 ajustada de cada set de variables consideradas y los coeficientes para cada variable con su error estándar entre paréntesis.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$.

Se seleccionó el modelo de cinco variables para la estimación de la longevidad a partir de datos conductuales y, por tanto, la ecuación obtenida para estimar la longevidad en ratones macho adultos fue la que se detalla en la **Ecuación 9**.

Ecuación 9:

Longevidad estimada

$$= 48,8 + 0,33 \times tX + 0,77 \times DI\% - 1,52 \times nHD - 3,42 \times nG + 0,15 \times tHD$$

Donde:

- tX – Tiempo en la PC del EPM (s).
- $DI\%$ – Deambulaci3n interna en el HB (%).
- nHD – N° de *head-dippings*.
- nG – N° de *groomings*.
- tHD – Duraci3n de *head-dippings* (s).

Aunque el modelo previamente publicado en ratones hembra correlacione significativamente con los datos generados en machos, como se observa en la **Figura 59**, la correlaci3n que se establece mediante el nuevo modelo conductual generado en machos con los datos de ratones macho presenta un mayor coeficiente de correlaci3n de *Pearson* (0,820) y de manera altamente significativa ($p < 0,001$) (**Figura 60**). Con este modelo matemático se consigue una capacidad de predicci3n de la varianza observada en la longevidad de un 63,6% (R^2 ajustada = 0,636).

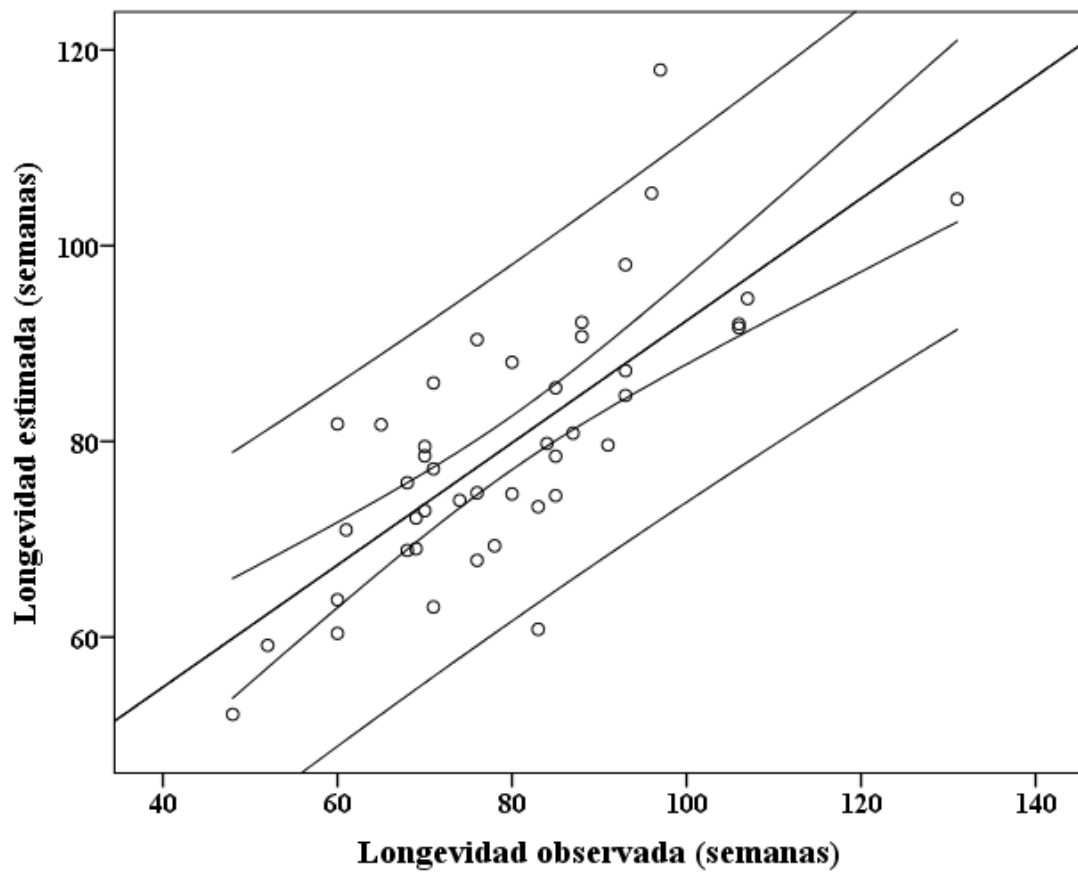


Figura 60. Diagrama de dispersión entre la longevidad observada (eje X) y la longevidad estimada (eje Y) por el nuevo modelo de predicción de longevidad con datos conductuales en los ratones macho adultos. La línea central representa la regresión del modelo, las líneas adyacentes el intervalo de confianza medio al 95% y las siguientes el intervalo de confianza individual al 95%. Coeficiente de correlación de Pearson de 0,820 ($p < 0,001$).

Por el contrario, la aplicación del nuevo modelo de machos a los datos de la nueva cohorte de hembras sólo obtuvo un coeficiente de correlación de 0,180 no significativo (Figura 61).

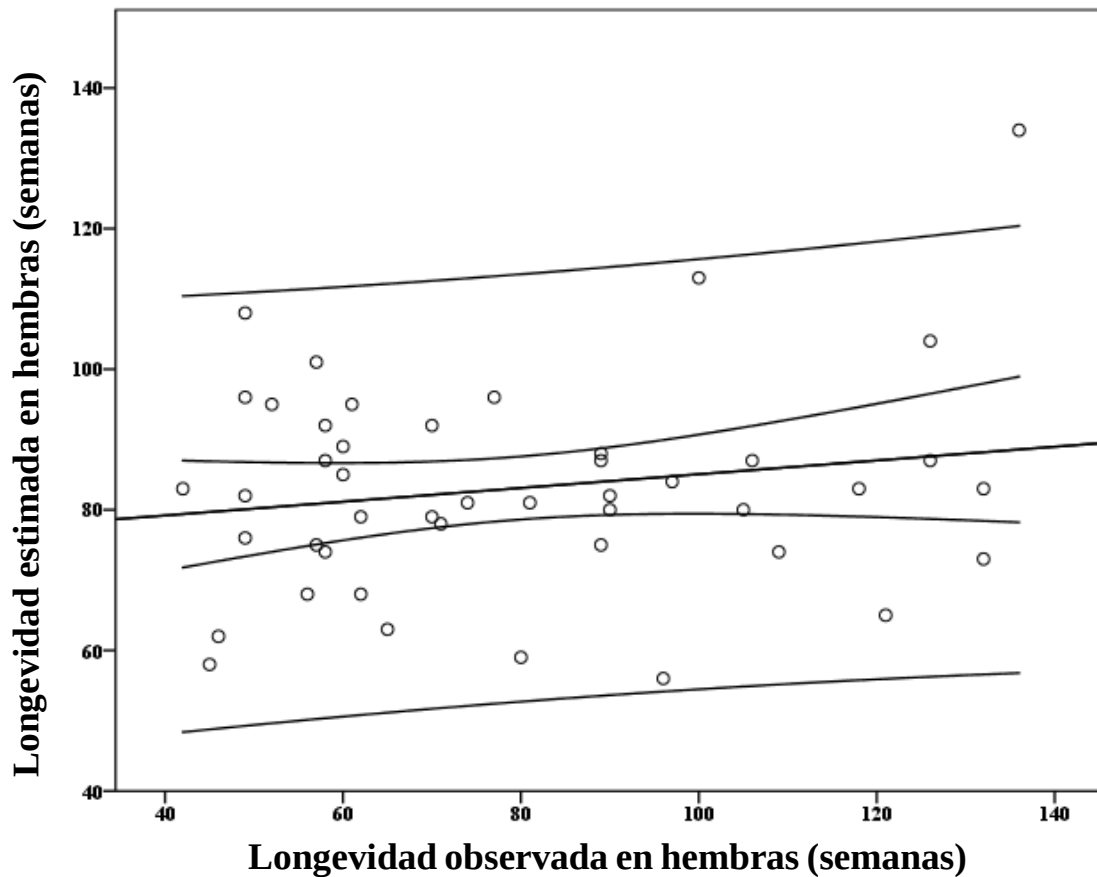


Figura 61. Gráfico de dispersión entre la longevidad observada (eje X) y la longevidad estimada (eje Y) por el nuevo modelo de predicción de longevidad de machos con datos conductuales de los ratones hembra adultos. La línea central representa la regresión del modelo, las líneas adyacentes el intervalo de confianza medio al 95% y las siguientes el intervalo de confianza individual al 95%. Coeficiente de correlación de Pearson de 0,180 ($p=0,238$)

3. Estudio de los parámetros genéticos “inserciones de ADNmt en el núcleo” y “frecuencia de MNs/NPBs” en linfocitos T peritoneales de ratones hembra de la cepa ICR-CD1 como posibles nuevos marcadores de edad biológica

En este apartado se exponen los resultados referentes a la detección y cuantificación de inserciones de fragmentos de ADN mitocondrial (ADNmt) en el genoma nuclear, así como las frecuencias de micronúcleos (MNs) y puentes nucleoplásmicos (NPBs) a lo largo del envejecimiento para su consideración como posibles nuevos marcadores de velocidad de envejecimiento (edad biológica). Estos parámetros se analizaron en suspensiones peritoneales enriquecidas en linfocitos T, obtenidas en una cohorte de hembras a las edades adulta (40 semanas), madura (56 semanas) y vieja (72 semanas).

3.1. Estudio de las inserciones de fragmentos de ADNmt en el genoma nuclear

3.1.1. Análisis de las secuencias amplificadas

Las secuencias centroméricas de ratón (MiSat y MaSat) y del fragmento de ADNmt (1841MT) amplificadas por PCR, se analizaron mediante la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST®) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). La secuencia MaSat amplificada mostró un 94% de identidad con la secuencia de 240pb “*Mouse satellite DNA sequence*” ID: V00846 disponible en GenBank. Por otra parte, la secuencia MiSat amplificada presentó un 100% de identidad con la secuencia “*Mouse centromeric minor satellite DNA (8)*” (ID: X14466.1) de 121pb. El análisis de la secuencia de ADNmt amplificada reveló un 100% de homología con una región de 1841pb del genoma mitocondrial de ratón (ID: KY018919.1). Esta secuencia se encuentra entre las posiciones 14189 a 16029 del genoma mitocondrial y comprende una región del lazo D, así como parte del gen del citocromo b, componente del complejo

III de la cadena respiratoria. El alineamiento de las tres secuencias determinó que no hay similitud entre la secuencia de ADNmt y ninguna de las secuencias centroméricas.

3.1.2. Detección en el genoma nuclear y localización cromosómica de la secuencia mitocondrial 1841MT

Se confirmó la presencia del fragmento mitocondrial 1841MT en el núcleo de linfocitos T mediante la técnica *FISH*. Esta secuencia colocalizó con regiones DAPI positivas que se corresponden con los cromocentros (asociación de centrómeros de distintos cromosomas) (**Figura 62**).

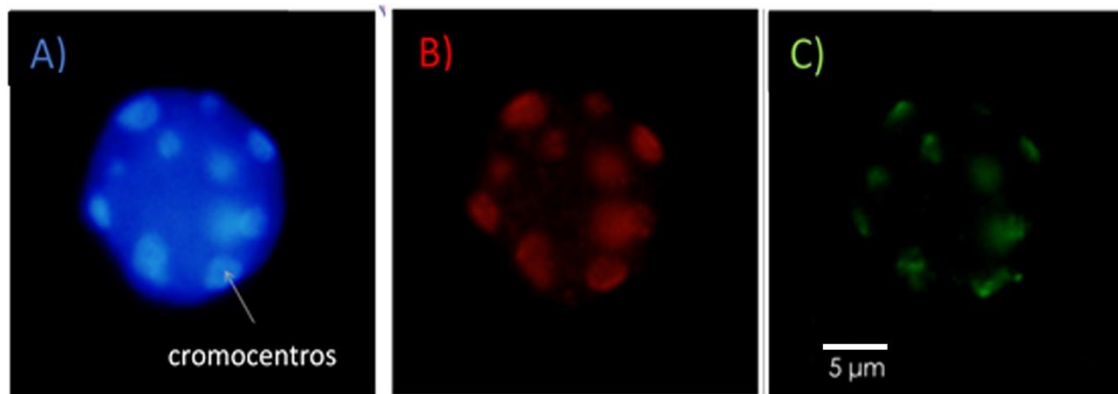


Figura 62. Imagen correspondiente a un linfocito mostrando el resultado de la *FISH* doble con las sondas para MiSat y 1841MT. A) DAPI, B) 1841MT (rojo), C) MiSat (verde).

Para determinar la localización cromosómica de este fragmento mitocondrial, se llevó a cabo una *FISH* doble utilizando combinaciones de dos en dos con las sondas 1841MT y centroméricas. La hibridación se realizó sobre cromosomas metafásicos de linfocitos T tratados con Colchicina. Los resultados revelaron la presencia de este fragmento en las regiones (peri)centroméricas de los 40 cromosomas telocéntricos de los ratones hembra (

Figura 63A₁₋₂), donde las secuencias Mi y MaSat ocupan dominios cromosómicos diferentes (

Figura 63B₁₋₂ y 63D₁₋₄), como ya se había descrito (Garagna *et al.*, 2002). Una posterior *FISH* doble en linfocitos T en el estadio de interfase, donde la cromatina se encuentra menos condensada, determinó que las secuencias 1841MT y MiSat están presentes en diferentes regiones del centrómero (

Figura 63C₁₋₄), mientras que 1841MT y MaSat colocalizan (

Figura 63E₁₋₄), si bien MaSat ocupa una región más amplia (ampliación

Figura 63E₂₋₃).

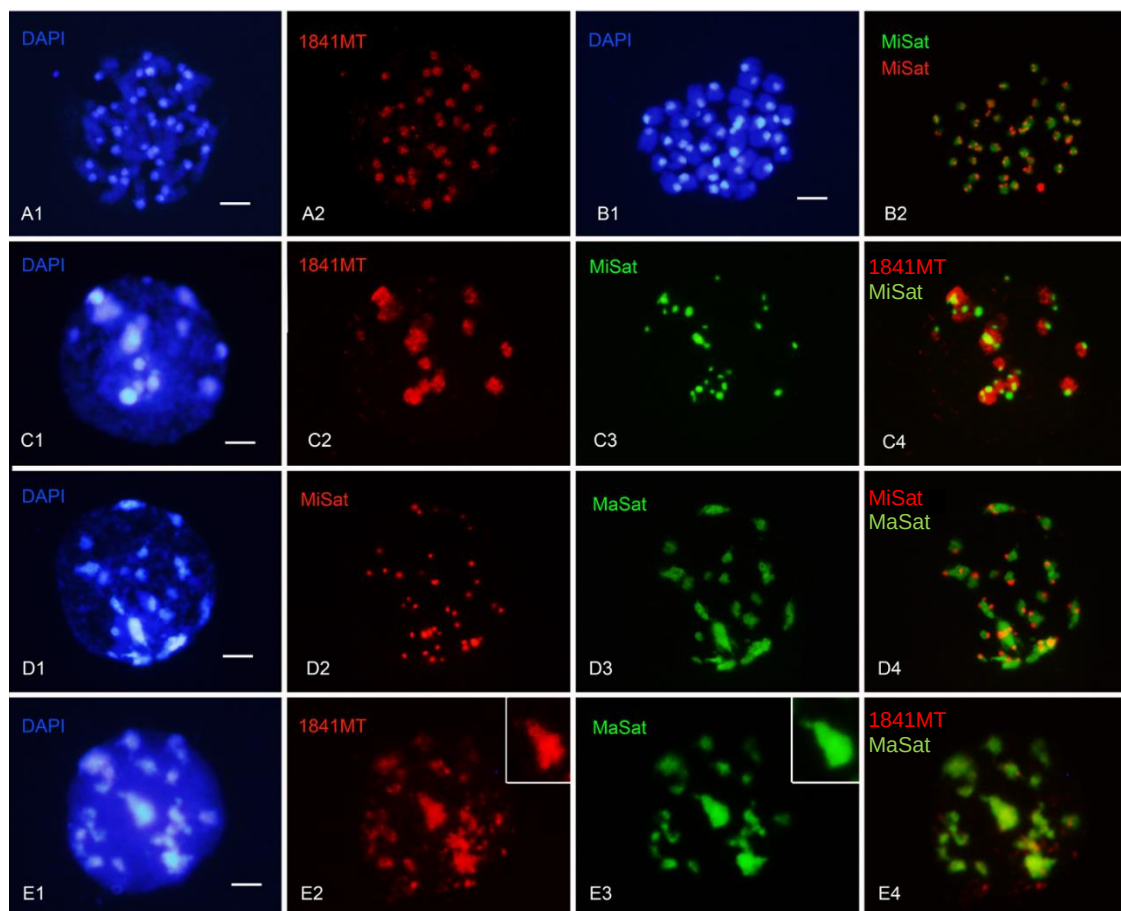


Figura 63. Imágenes correspondientes al resultado de la *FISH* doble en: (A y B) cromosomas metafásicos de linfocitos T tratados con colchicina, (C, D y E) linfocitos en interfase. Las sondas utilizadas se indican en cada imagen. Los núcleos se contratiñeron con DAPI. El fragmento mitocondrial 1841MT se encuentra en las regiones pericentroméricas de cada uno de los cromosomas, situado en un dominio diferente a MiSat y colocalizando con MaSat, si bien esta última secuencia ocupa una región más amplia. (la barra de aumento corresponde a 5 micras)

En la **Figura 64** se muestra un esquema con la posición relativa de las secuencias analizadas en las regiones (peri)centrómicas de los cromosomas de los linfocitos T del ratón.



Figura 64. Esquema de la distribución relativa de las secuencias cromosómicas centroméricas MiSat (verde), MaSat (naranja) y la posición en la que se insertan las secuencias de ADNmt 1841MT (rojo). El tamaño de las distintas regiones representadas es orientativo.

3.1.3. Cuantificación la secuencia de ADNmt en el núcleo de linfocitos T en las distintas edades

Para cuantificar las señales de ADNmt observadas en los núcleos de linfocitos T de la suspensión peritoneal de los ratones en las tres edades diferentes (adulto, maduro y viejo), se midió la fluorescencia total de las señales de hibridación de la sonda 1841MT por núcleo en un experimento cuantitativo de *FISH (Q-FISH)*. Teniendo en cuenta que el grado de compactación de la cromatina (y, por consiguiente, la intensidad de las señales) puede variar en cada célula, individuo o grupo de edad, y para llevar a cabo un análisis más preciso, se utilizó simultáneamente la sonda MiSat en el mismo experimento (**Figura 62**). La fluorescencia relativa de las señales de ADNmt por núcleo (FrMT) se calculó como la relación: fluorescencia total 1841MT/fluorescencia total MiSat.

Los resultados de FrMT obtenidos para cada una de las edades se muestran a continuación (**Tabla 26** y **Figura 65**).

Tabla 26. Cuantificación de fluorescencia relativa de 1841MT. Valores medios y error estándar de FrMT en los núcleos de linfocitos en las edades adulta (40 semanas), madura (56 semanas) y vieja (72 semanas).

Edad	Nº de células	Media	EE
Adulta	211	5,625	± 0,101
Madura	226	5,977	± 0,137
Vieja	251	6,674	± 0,183

Cada columna representa, respectivamente, el número de células analizadas, la media $\pm$ error estándar (EE) de la intensidad de fluorescencia de 1841MT normalizada por la señal de MiSat en el genoma nuclear de linfocitos T a cada edad analizada

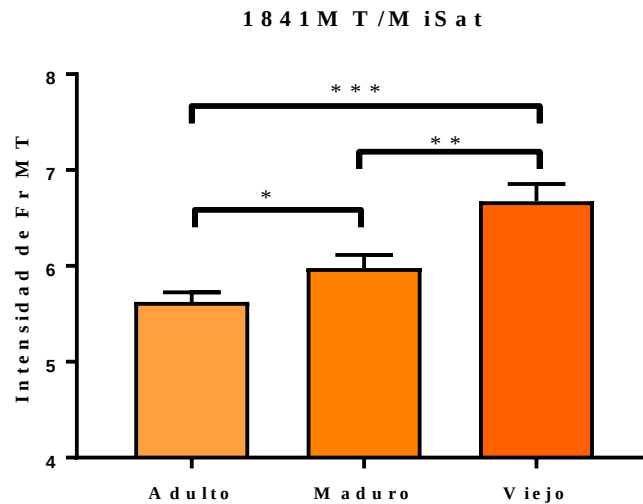


Figura 65. Relación de la intensidad de fluorescencia relativa 1841MT/MiSat en linfocitos T de suspensiones peritoneales pertenecientes a los ratones hembra analizados (N=5). Las columnas indican el valor de la media aritmética y las barras son el error estándar a las edades adulta (40 semanas) (N=211), madura (56 semanas) (N=226) y vieja (72 semanas) (N=251).

* $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$.

El análisis de los resultados reveló un aumento de la presencia de señales mitocondriales relacionado con la edad. Se encontraron diferencias significativas entre las edades adulta y madura ($p = 0,041$), madura y vieja ($p = 0,003$) y adulta y vieja ($p < 0,000$).

3.2. Análisis de la frecuencia de MNs y NPBs

Se utilizó el *CBMN assay* o *test* de MNs para analizar la frecuencia de MNs y NPBs en suspensiones celulares enriquecidas en linfocitos T procedentes del líquido peritoneal de ratones hembra tomado en las edades adulta (40 semanas), madura (56 semanas) y vieja (72 semanas).

3.2.1. Frecuencia de MNs y NPBs

El tratamiento con Cyt-B utilizado en el test de MNs permitió la obtención de células binucleadas donde fue posible detectar y cuantificar los indicadores de inestabilidad cromosómica y daño al ADN (MNs y NPBs, respectivamente) como puede observarse en la (**Figura 66**).

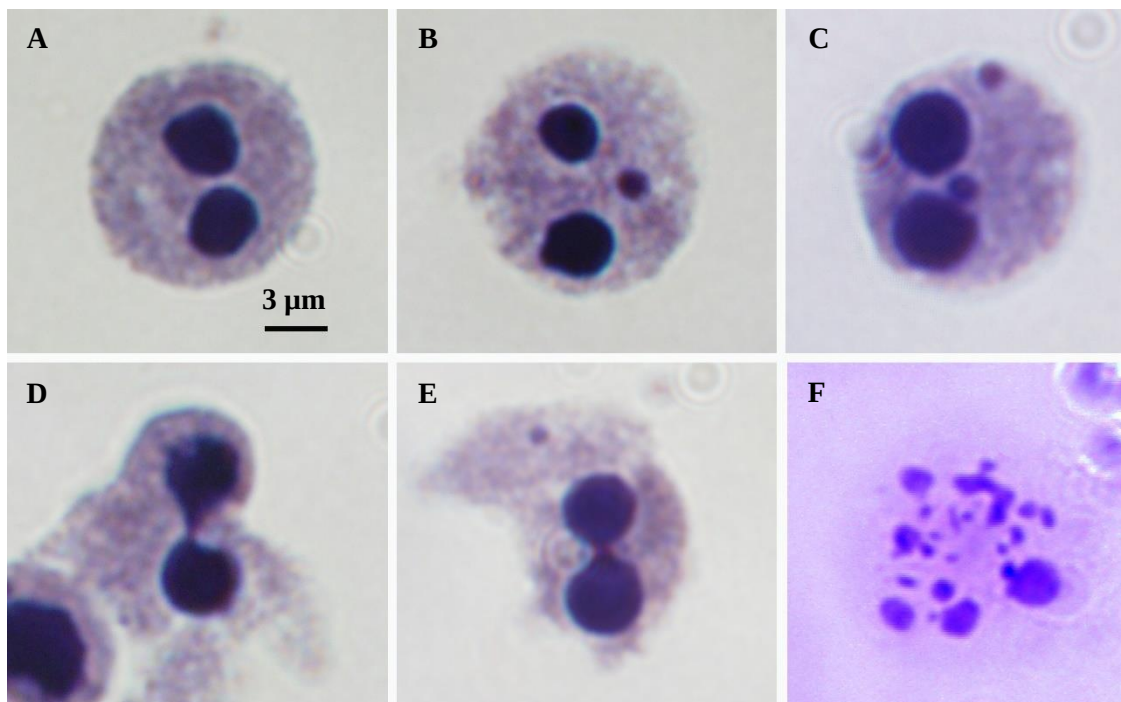


Figura 66. Imágenes de células teñidas con tinción hematoxilina-eosina en microscopio óptico de 40 aumentos. *A) Célula binucleada (BN) sin micronúcleos (MN), B) Célula BN con un MN, C) Célula BN con dos MNs, D) Célula BN con un puente nucleoplásmico (NPB), E) Célula BN con un MN y un NPB, F) Célula con signos citológicos de apoptosis tardía. La barra de aumento corresponde a 3 µm*

La frecuencia de MNs y de NPBs que presentaban estas células BNs en las tres edades adulta, madura y vieja se representan en las siguientes tabla y figura (**Tabla 27** y **Figura 67**):

Tabla 27. Frecuencia de BNs con MNs, MNs en BNs con MNs y NPBs a las diferentes edades ensayadas						
Edades	INDIVIDUOS (N=5)					MEDIA ± EE
f. BNs con MNs	1	2	3	4	5	
Adulta	0,34	0,37	0,36	0,45	0,44	0,40 ± 0,02
Madura	0,44	0,49	0,37	0,52	0,32	0,44 ± 0,03
Vieja	0,49	0,58	0,52	0,44	0,50	0,51 ± 0,02
f. MNs en BNs con MNs	1	2	3	4	5	MEDIA ± EE
Adulta	1,56	1,61	1,58	1,35	1,27	1,47 ± 0,07
Madura	1,47	1,40	1,41	1,44	1,42	1,43 ± 0,01
Vieja	1,71	1,24	1,50	1,48	1,50	1,49 ± 0,07
f. NPBs	1	2	3	4	5	MEDIA ± E.E.
Adulta	0,048	0,019	0,027	0,040	0,030	0,033 ± 0,005
Madura	0,038	0,058	0,018	0,009	0,120	0,049 ± 0,020
Vieja	0,114	0,066	0,050	0,073	0,063	0,073 ± 0,011

Media ± error estándar (EE) de las frecuencias a cada edad. Adulta (40 semanas), Madura (56 semanas), Vieja (72 semanas).

Se observó un aumento progresivo de la frecuencia de células BNs que presentaban uno o más MNs, asociado al aumento de la edad cronológica. Este aumento fue significativo entre las edades adulta y vieja ($p < 0,05$), mientras que la frecuencia de MNs en la edad madura fue intermedia.

Adicionalmente, para conocer si existían variaciones en cuanto al número de MNs por célula BN relacionadas con la edad, se analizó la frecuencia de MNs en células BNs con MNs. No se encontraron diferencias significativas.

Por otro lado, se observó una tendencia al aumento de la frecuencia de NPBs asociado a la edad, si bien ésta no fue significativa ($p = 0,49$).

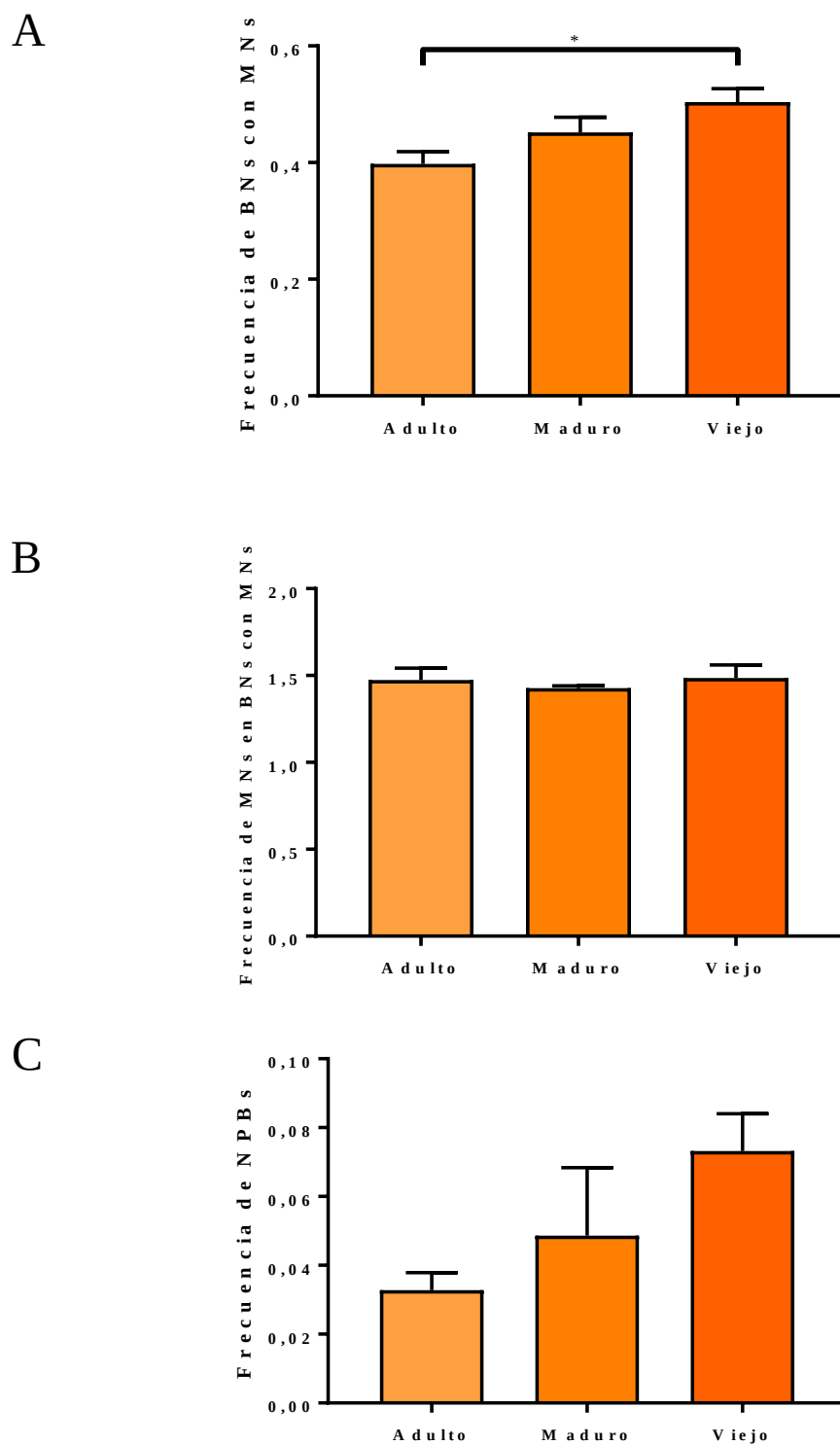


Figura 67. A) frecuencia de células binucleadas (BNs) con micronúcleos (MNs), B) frecuencia de MNs en BNs con MNs y C) frecuencia de puentes nucleoplásmicos (NPBs) en linfocitos T enriquecidos de suspensiones peritoneales de ratones hembra (N=5) a las edades adulta (40 semanas), madura (56 semanas) y vieja (72 semanas). Las columnas indican el valor de la media aritmética y las barras son el error estándar * $p < 0,05$.

3.2.2. Células en apoptosis

Se contabilizaron las células con signos de apoptosis tardía en cada uno de los individuos a cada una de las edades adulta (40 semanas), madura (56 semanas) y vieja (72 semanas). Los datos se reflejan en la **Tabla 28** y en la **Figura 68**.

Tabla 28. Frecuencia total de células en apoptosis tardía (f. apoptosis) en ratones hembra (N=5) a las edades adulta (40 semanas), madura (56 semanas) y vieja (72 semanas).

f. APOPTOSIS	INDIVIDUOS (N=5)					MEDIA $\pm$ E.E.
	1	2	3	4	5	
Adulta	0,007	0,002	0,007	0,005	-	0,005 $\pm$ 0,001
Madura	-	0,005	0,004	0,006	0,007	0,005 $\pm$ 0,001
Vieja	0,022	0,006	0,014	0,008	0,012	0,012 $\pm$ 0,003

Para los ratones estudiados, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de apoptosis entre las edades adulta y madura ($p=0,79$), pero sí al alcanzar la edad vieja comparando con la edad adulta o madura ($p<0,05$) (**Figura 68**).

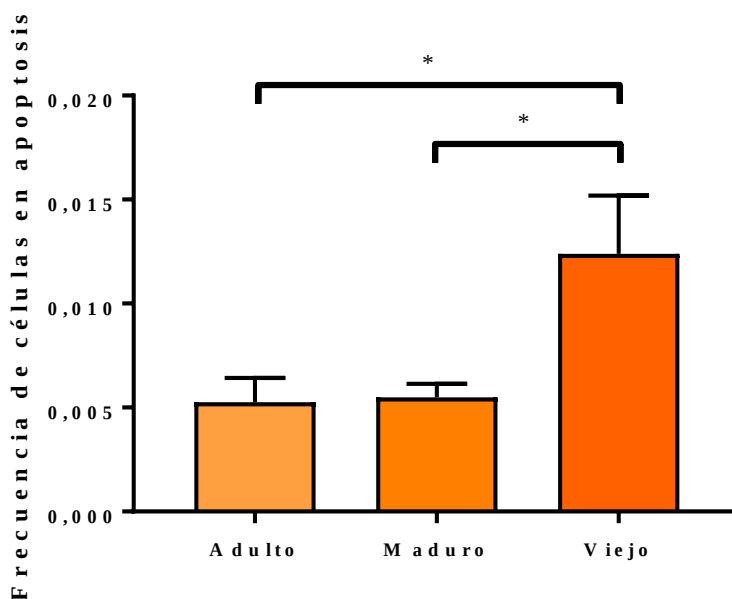


Figura 68. Frecuencia de células en apoptosis de linfocitos T enriquecidos de suspensiones peritoneales de ratones hembra a las edades adulta (40 semanas, N=4), madura (56 semanas, N=4) y vieja (72 semanas, N=5). Las columnas indican el valor de la media aritmética y las barras son el error estándar a las distintas edades. * $p<0,05$.

A continuación, se llevó a cabo un análisis de correlación con los parámetros analizados cuyo resultado se muestra en la **Tabla 29**, donde se muestran los coeficientes

de correlación de *Pearson* que se establecen entre los diferentes parámetros y el valor de la significación de estas correlaciones (** $p < 0,01$).

Tabla 29 *Correlaciones entre los valores de los parámetros de fluorescencia relativa de ADNmt en el ADNn (FrMT), frecuencia de células binucleadas (BNs) con micronúcleos (MNs), MNs en BNs con MNs, puentes nucleoplásmicos (NPB) y células con morfología de apoptosis tardía*

	Fr ADNmt	BNs con MNs	MNs en BNs con MNs	NPBs	Apoptosis
FrMT	1	0,683**	-0,350	-0,142	-0,112
BNs con MNs	-	1	-0,358	0,186	0,294
MNs en BNs con MNs	-	-	1	0,171	0,302
NPBs	-	-	-	1	0,405
Apoptosis	-	-	-	-	1

** $p < 0,01$

Se observó una correlación positiva significativa entre las variables “frecuencia relativa del fragmento mitocondrial 1841MT” con la “frecuencia de BNs con MNs” ($p < 0,005$) (**Figura 69**).

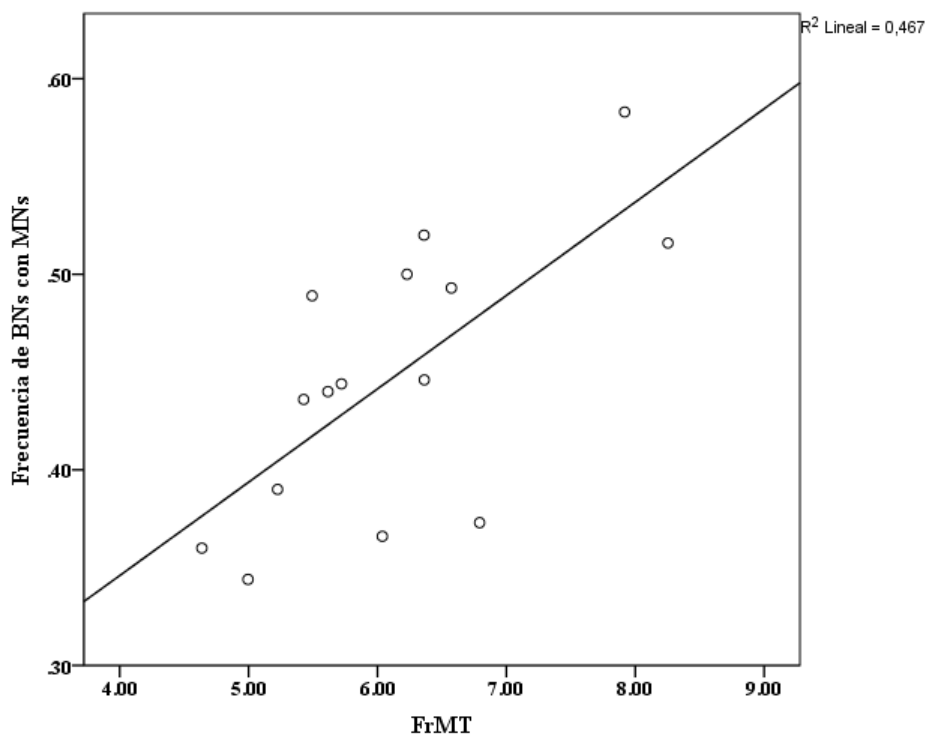
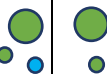


Figura 69 *Correlación positiva y significativa entre la intensidad de fluorescencia relativa del fragmento mitocondrial 1841MT (FrMT) y la frecuencia de células binucleadas (BNs) con micronúcleos (MNs) observada a las edades adulta (40 semanas, N=4), madura (56 semanas, N=4) y vieja (72 semanas, N=5) en ratones hembra.*

3.2.3. Frecuencia de MNs con secuencias centroméricas

Para averiguar el origen clastogénico o aneugénico de los MNs observados en las células BN, se llevó a cabo un experimento de *FISH* doble utilizando las sondas pancentroméricas de ratón y telomérica de vertebrados (**Figura 71**).

Los resultados obtenidos tras el recuento de más de 300 células binucleadas con MNs pertenecientes a los tres grupos de edad se muestran en la **Figura 70**. En ella se muestran los distintos tipos de células analizadas (el color verde indica señal de fluorescencia), así como el porcentaje del tipo de célula contabilizada respecto al total de células. El 97,1% de los MNs analizados mostraron señal centromérica (**Figura 70**).

Tipo									Total
Nº	8	151	1	3	80	6	40	20	309
%	2,6%	48,9%	0,3%	1,0%	25,9%	1,9%	12,9%	6,5%	100%
Figura 70. Se muestran los distintos tipos de células binucleadas con micronúcleos incluidas en el recuento (n=300). El color verde indica señal de fluorescencia correspondiente a la hibridación con la sonda pancentromérica. También se muestra la frecuencia de micronúcleos de cada configuración									

Además, en algunas células se observaron MNs con dos señales teloméricas (**Figura 71, C1-2**), indicando que los MNs observados están compuestos por cromosomas/cromátidas completos y no por fragmentos acéntricos, reforzando el resultado anterior.

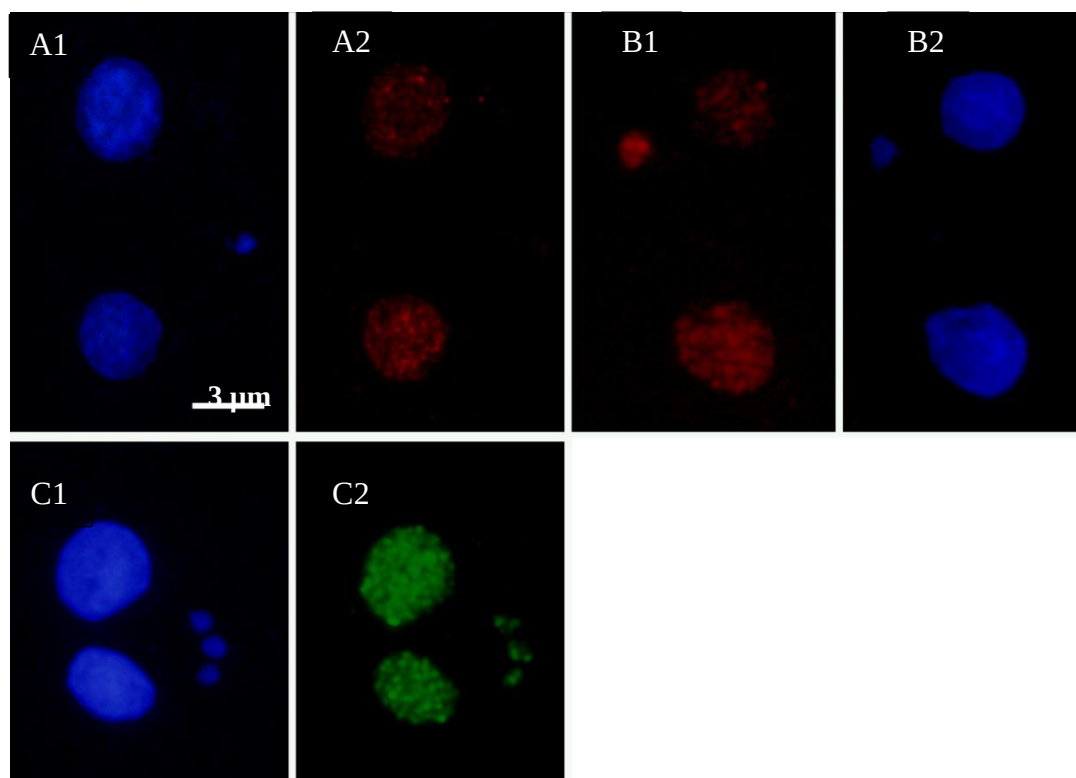


Figura 71. Imagen de células binucleadas (BN) con micronúcleos (MNs) teñidas por FISH con la sonda pancentromérica de ratón (rojo) y telomérica de vertebrados (verde). Los núcleos se contratiñieron con DAPI (azul). **A1-2)** Célula BN con un MN sin señal centromérica, **B1-2)** Célula BN con un MN con señales centroméricas, **C1-2)** Célula BN con tres MNs, en cada uno de los cuales se pueden observar dos señales teloméricas diferenciadas, indicando la presencia de cromátidas o cromosomas completos. La barra de aumento corresponde a 3 μm

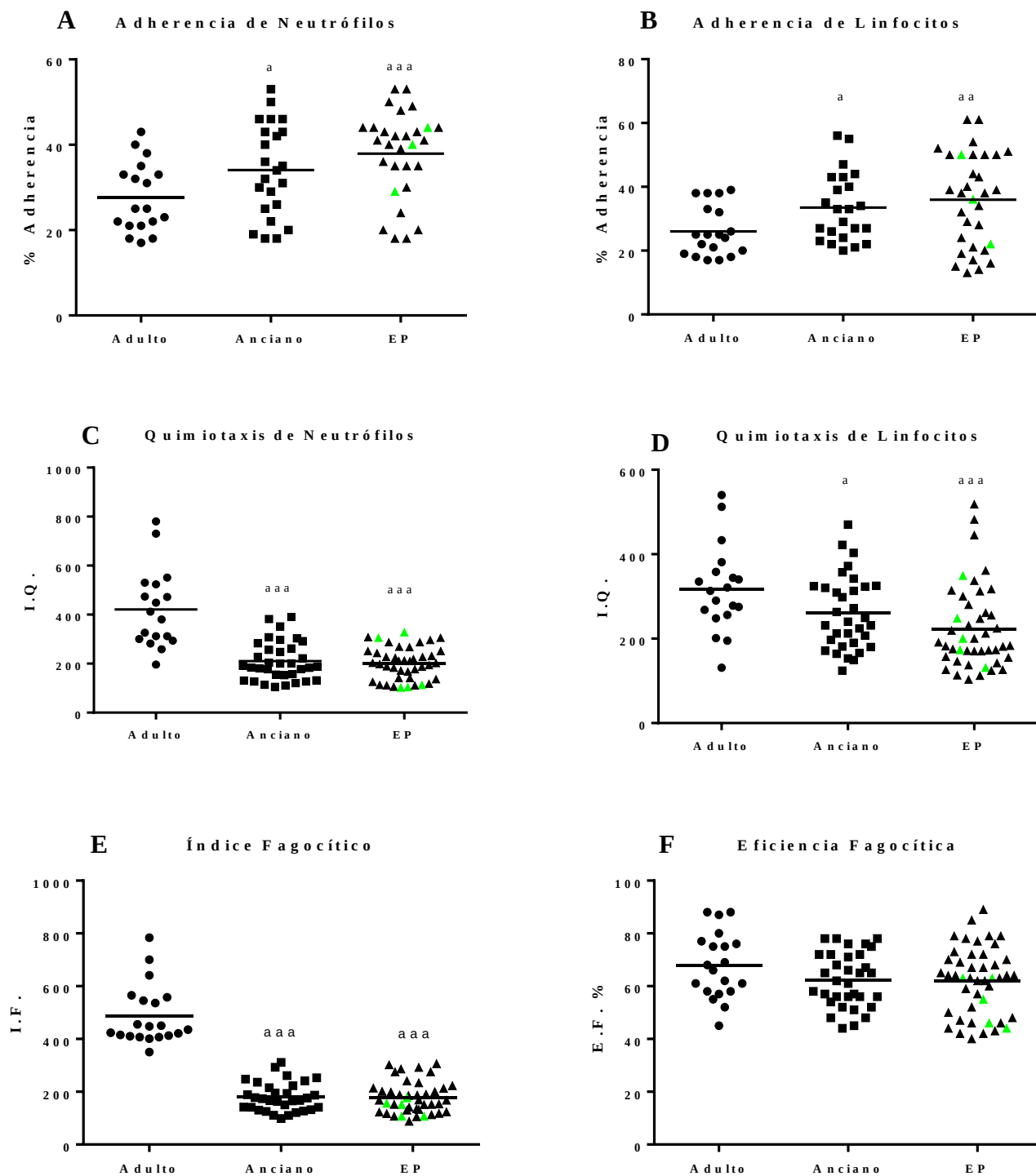
4. Función inmunitaria y estado oxidativo de células de sangre periférica humana en pacientes ancianos con enfermedad de Parkinson en fase temprana (fase II) y su comparación con individuos sanos de equivalente edad cronológica y con adultos sanos

4.1. Función inmunitaria

Se estudiaron diversas funciones inmunitarias en leucocitos humanos de sangre periférica en pacientes con enfermedad de *Parkinson* (EP) de estadio II (EP_{II}), así como en ancianos de equivalente edad cronológica y en adultos sanos para averiguar qué cambios en la función suponen un deterioro fisiológico esperable por la edad en la población sana y cuáles son específicos de la patología. De los 45 pacientes de EP_{II}, cinco de ellos estaban siendo tratados con el medicamento Levodopa y sus parámetros se incluyeron en los análisis, representando sus valores en las gráficas como puntos diferenciados en otro color, no obteniéndose ninguna diferencia significativa entre éstos y los pacientes no tratados en ninguno de los parámetros estudiados.

De forma general, todas las funciones analizadas en neutrófilos (adherencia, quimiotaxis y fagocitosis), la actividad citotóxica NK y las funciones de linfocitos (adherencia, quimiotaxis y proliferación tanto basal como estimulada), sufren alteraciones con el avance del envejecimiento. Así, en las personas mayores sanas, en comparación con las adultas, se observaron valores significativamente mayores de adherencia ($p < 0.001$ para neutrófilos **Figura 72A** y $p < 0,05$ para linfocitos **Figura 72B**) e inferiores de quimiotaxis ($p < 0,001$ para neutrófilos **Figura 72C** y $p < 0,05$ para linfocitos **Figura 72D**), fagocitosis ($p < 0,001$ para el I.F. **Figura 72E** y n.s. para la E.F. **Figura 72F**) y actividad NK ($p < 0,05$ **Figura 72G**).

En pacientes de EPII, al comparar con las personas sanas de igual edad cronológica, no se detectaron diferencias significativas en las funciones de inmunidad innata (adherencia, fagocitosis, quimiotaxis y actividad NK) (**Figura 72**). Lógicamente, la comparación en estas funciones entre EPII y adultos sanos sí arrojó diferencias estadísticamente significativas. Entre ellas, los pacientes de EPII comparados con adultos sanos muestran mayores valores de adherencia, tanto de neutrófilos ($p < 0,001$ **Figura 72A**) como de linfocitos ($p < 0,005$, **Figura 72B**), menores de quimiotaxis de neutrófilos ($p < 0,001$ **Figura 72C**) y de linfocitos ($p < 0,001$ **Figura 72D**), de índice fagocítico ($p < 0,001$ **Figura 72E**) y menor actividad citotóxica NK ($p < 0,005$ **Figura 72G**), pero igual eficacia fagocítica (**Figura 72F**).



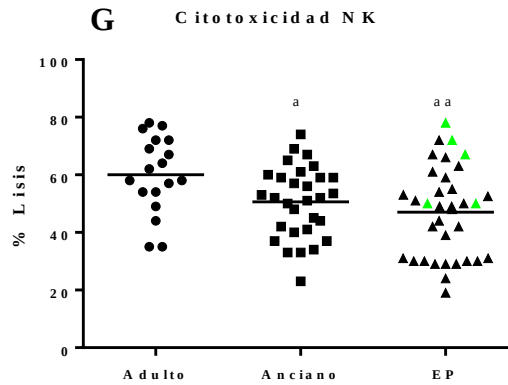


Figura 72. Parámetros de función inmunitaria en neutrófilos y linfocitos aislados de sangre periférica humana de adultos sanos, de ancianos sanos y pacientes ancianos de EP en fase II. A) Adherencia de neutrófilos; B) Adherencia de linfocitos; C) Índice de quimiotaxis (I.Q.) de neutrófilos; D) índice de quimiotaxis (I.Q.) de linfocitos; E) Índice fagocítico (I.F.) de neutrófilos; F) eficacia fagocítica (%) de neutrófilos y G) actividad citotóxica natural killer (NK) (% lisis). Los datos muestran la media aritmética (barra central) de los sujetos analizados por grupo (20 adultos, 34 ancianos y 45 pacientes con enfermedad de Parkinson en fase II, EPII). Cada punto representa la media de ensayos duplicados. Los puntos verdes representan los valores de los cinco pacientes de EPII tratados con levodopa.

a: $p < 0,05$, **aa:** $p < 0,01$, **aaa:** $p < 0,001$ respecto a los controles adultos.

En relación con la capacidad proliferativa de los linfocitos, en comparación con los valores de adultos, las personas ancianas sanas mostraron una mayor ($p < 0,001$) proliferación basal (en ausencia de mitógeno) (**Figura 73A**). No obstante, la respuesta proliferativa a los mitógenos (fitohemaglutinina, PHA y lipopolisacárido, LPS) de los linfocitos fue significativamente menor en los ancianos que en los adultos (PHA, $p < 0,001$; **Figura 73B** y LPS, $p < 0,05$; **Figura 73C**). Lo mismo sucedió en el porcentaje de estimulación proliferativa para PHA ($p < 0,05$; **Figura 73D**), y para LPS ($p < 0,05$; **Figura 73E**). Los pacientes EPII, que al igual que los ancianos sanos mostraron las mismas diferencias significativas con los adultos, también presentaron diferencias con los de su misma edad sanos en las funciones de inmunidad adaptativa estudiadas. Así, mientras que en los pacientes con EPII no se observaron diferencias en la proliferación basal respecto a los de los mayores sanos (n.s.; **Figura 73A**), sí que mostraron unos valores de linfoproliferación inferiores a los ancianos sanos en presencia de PHA ($p < 0,001$; **Figura 73B**) como de LPS ($p < 0,05$; **Figura 73C**), así como en la estimulación

porcentual de ambos mitógenos, si se considera la proliferación basal como el 100% ($p < 0,05$ PHA y LPS; **Figura 73D y E**).

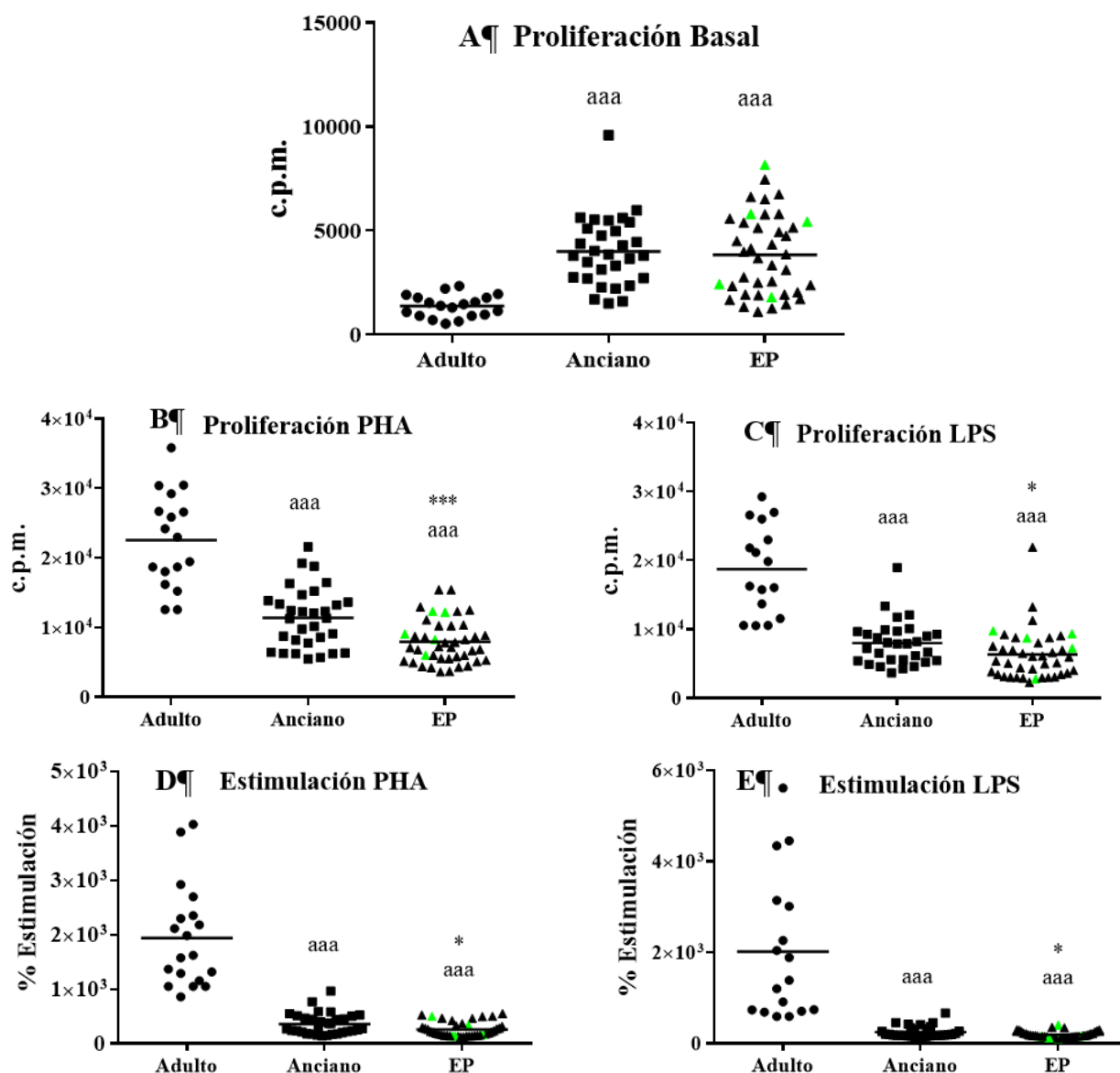


Figura 73. Proliferación (48 horas de estimulación) de células mononucleares de sangre periférica humana de adultos sanos, ancianos sanos y pacientes ancianos de EP en fase II (EPII), en A) condiciones basales, B) estimulada con fitohemaglutinina (PHA; $1 \mu\text{g/mL}$), C) con lipopolisacárido (LPS; $1 \mu\text{g/mL}$). En cuentas por minuto (c.p.m.) con PHA, con LPS, y como porcentaje de estimulación respecto a la condición basal con D) PHA y E) LPS. Los datos muestran la media aritmética (barra central) de los sujetos analizados por grupo (20 adultos, 34 ancianos y 45 EP). Cada punto representa la media de ensayos duplicados. Los puntos verdes representan los valores de los cinco pacientes de EPII tratados con levodopa.

a: $p < 0,05$, **aa:** $p < 0,01$, **aaa:** $p < 0,001$ respecto a los controles adultos, * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ respecto al valor en ancianos de similar edad cronológica.

4.2. Estrés Oxidativo

El análisis de los parámetros de estrés oxidativo en este experimento se llevó a cabo en células de sangre completa de todos los participantes, y por tanto las muestras contenían eritrocitos y células leucocíticas. Los resultados se muestran en la **Figura 74**. En las personas ancianas sanas, en comparación con las adultas, se observaron menores actividades de las enzimas antioxidantes, tanto de la glutatión peroxidasa (GPx; $p < 0,001$; **Figura 74A**) como de la glutatión reductasa (GR; $p < 0,01$; **Figura 74B**), así como menores concentraciones de glutatión reducido (GSH; $p < 0,01$; **Figura 74C**). Además, las personas ancianas presentaron mayores concentraciones de la forma oxidada del glutatión (GSSG; $p < 0,001$; **Figura 74D**), de peroxidación lipídica (Malondialdehído, MDA; $p < 0,05$; **Figura 74F**), y mayores cocientes GSSG/GSH ($p < 0,05$; **Figura 74F**), que los adultos sanos.

Los pacientes de EPII, además del deterioro típico de la edad, mostraron menor actividad GPx ($p < 0,01$; **Figura 74A**) y mayor actividad GR ($p < 0,05$; **Figura 74B**), así como mayores niveles de glutatión oxidado (GSSG; $p < 0,05$; **Figura 74D**) y de malondialdehído (MDA; $p < 0,001$; **Figura 74F**) de manera significativa respecto a sus controles cronológicos. En cambio, no se observaron diferencias significativas entre las cantidades de glutatión reducido (GSH; **Figura 74C**) o en el cociente redox (GSSG/GSH; **Figura 74E**) entre los pacientes de EPII y ancianos cronológicamente equivalentes.

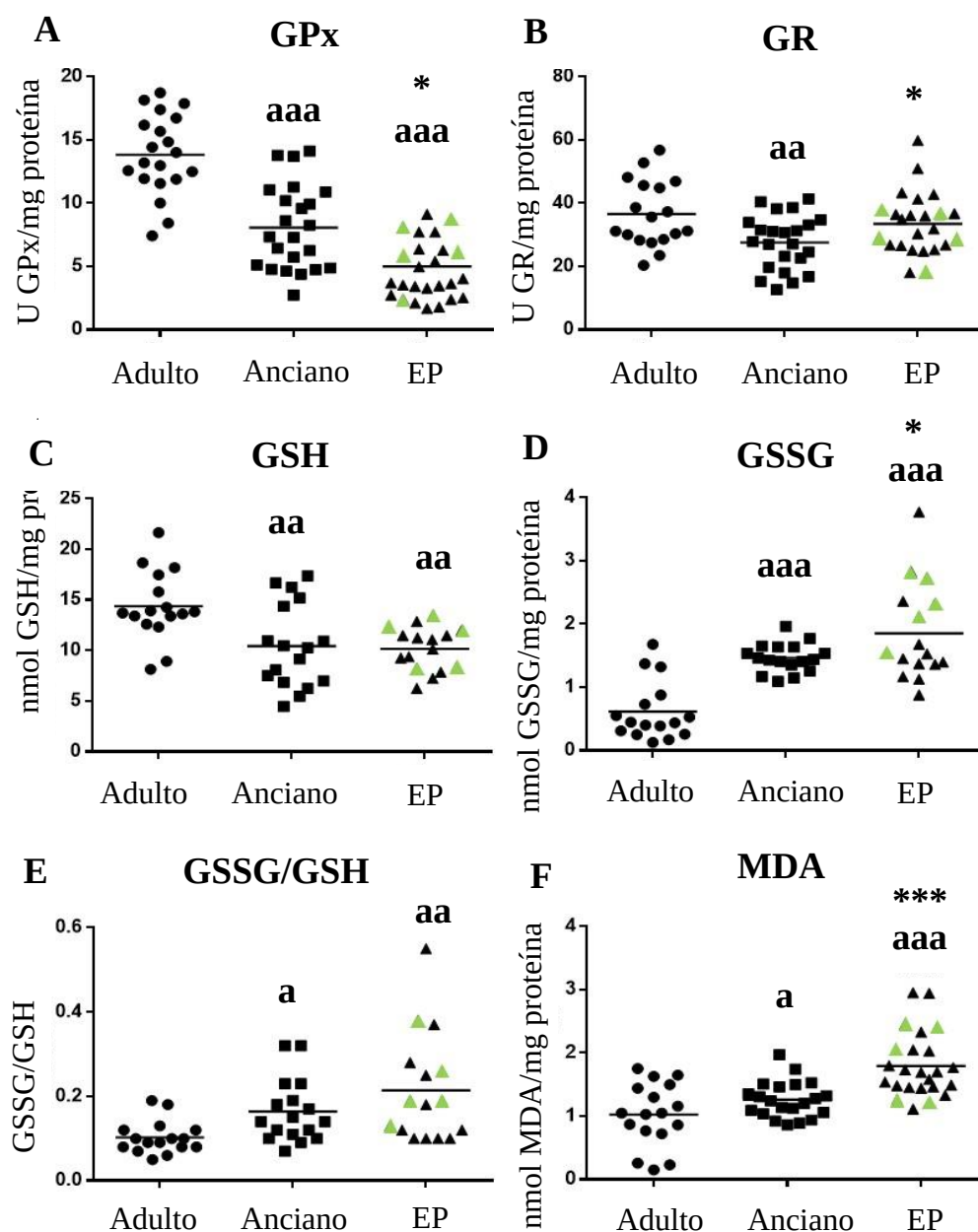


Figura 74. Parámetros de estrés oxidativo y peroxidación lipídica en células de sangre periférica completa (leucocitos y eritrocitos) de adultos sanos, ancianos sanos y pacientes ancianos con enfermedad de Parkinson en fase II (EPII). A) Actividad enzimática glutatión peroxidasa (GPx), B) glutatión reductasa (GR); C) concentraciones de glutatión reducido (GSH) y D) glutatión oxidado (GSSG); E) cociente GSSG/GSH; y F) concentración de malondialdehído intracelular (MDA). Los datos muestran la media aritmética (barra central) de los sujetos analizados por grupo (20 adultos, 23 ancianos y 26 EP). Cada punto representa la media de ensayos duplicados. Los puntos verdes representan los valores de los cinco pacientes de EPII tratados con levodopa.

a: $p < 0,05$, **aa:** $p < 0,01$, **aaa:** $p < 0,001$ respecto a los controles adultos

***** $p < 0,05$, ****** $p < 0,01$, ******* $p < 0,001$ respecto al valor en ancianos cronológicamente equivalentes.

DISCUSIÓN

1. Cambios en una serie de parámetros bioquímicos, de función inmunitaria, y estrés oxidativo en un estudio longitudinal a lo largo del envejecimiento, en ratones macho de la cepa ICR-CD1.

En este objetivo se buscó comprobar los cambios que podrían darse en una serie de parámetros a lo largo del envejecimiento de ratones macho, estudiados de forma individual y en un estudio longitudinal, para poder posteriormente relacionarlos con la longevidad que alcanza cada animal. Se eligieron parámetros bioquímicos de sangre periférica, muy frecuentemente analizados, como son las concentraciones de glucosa, colesterol y triglicéridos. De forma importante, se quiso estudiar cómo eran esos cambios en parámetros de función inmunitaria y estado redox, en leucocitos peritoneales de los ratones macho, dado que nuestro grupo tiene una amplia experiencia en analizar estos parámetros, en diseños similares, pero en ratones hembra (Martínez de Toda *et al.*, 2016, 2019b).

1.1. Bioquímica sanguínea

Los resultados obtenidos en la presente tesis al analizar en sangre de la cola de los ratones macho las concentraciones de glucosa, colesterol y triglicéridos coincidieron a la edad adulta con los publicados previamente por nuestro laboratorio en machos de esta misma cepa (Hunsche *et al.*, 2019). Si bien las concentraciones de **colesterol** no cambiaron al avanzar la edad, sí lo hicieron las de otros dos parámetros. Así, las concentraciones de **glucosa**, en comparación con las de la edad adulta (40 semanas), disminuyeron significativamente en individuos viejos (72 semanas), aumentando luego en la edad muy vieja (96 semanas) para asemejarse a la que se mostraba en la adulta, como ya se ha observado en otros trabajos (Leiter *et al.*, 1988). Esa disminución en la vejez de las concentraciones de glucosa es un hecho curioso, que no sucede en las

hembras, en las que la glucosa aumenta en los animales viejos (Hunsche *et al.*, 2019). Puede ser que el hecho de que los machos adultos de esta cepa tengan significativamente mayores concentraciones de glucosa que las hembras (Hunsche *et al.*, 2019), les haga tener un comportamiento opuesto al envejecer. En las concentraciones de **triglicéridos** se observó un comportamiento similar, con una disminución a la edad vieja respecto a la edad adulta. Curiosamente, en las hembras los valores de triglicéridos en la edad adulta son similares a los de los machos, y no aumentan al envejecer (Hunsche *et al.*, 2019)

Al segregar los datos distinguiendo entre los de los animales que sobrevivieron hasta la siguiente edad de medición, los que no sobrevivieron y los que llegaron a la edad longeva (120 semanas), se obtiene una información importante sobre lo que puede representar esos valores de los parámetros bioquímicos en la supervivencia de los ratones macho. Así, la concentración de glucosa era menor en los ratones adultos que murieron antes de la siguiente toma (en la vejez) que en los que sobrevivieron, y lo mismo sucede en la edad vieja. Estos resultados contrastan con los estudios publicados en humanos, que correlacionan una mayor glucemia con peores funcionalidades vasculares y cognitivas, y con mayor mortalidad a corto y largo plazo (Brunner *et al.*, 2006; Gentile *et al.*, 2006; Dahle *et al.*, 2009). En nuestro experimento, la glucosa en sangre no alcanzó niveles hipoglucémicos en ningún caso, por lo que resulta difícil considerar estas menores concentraciones como posible causa de la muerte de los ratones (Tooke *et al.*, 2019). Lo que sí es posible es que en los ratones macho esas menores concentraciones estén reflejando una mayor utilización de la glucosa al envejecer.

En el caso del colesterol se observó una dinámica inversa, ya que los ratones adultos con concentraciones más elevadas en sangre fueron los que no alcanzaron la edad vieja. Esto coincide con otros trabajos en los que se ha descrito un aumento de este parámetro a medida que avanza la edad, tanto en humanos como en ratones (Johnson & Stolzing,

2019; Seo *et al.*, 2019). Por tanto, a pesar de no hallarse diferencias entre las concentraciones detectadas en sangre de los ratones a lo largo del envejecimiento, al segregar de la manera que se ha hecho los datos se observa que las diferencias entre las concentraciones de colesterol en los ratones macho a la edad adulta podrían servir de un marcador temprano de mortalidad prematura en estos animales.

En los triglicéridos, en general, no se observaron diferencias en función de la supervivencia hasta la siguiente edad de medición, salvo en los muy viejos que llegaron a longevos. Éstos mostraron concentraciones mayores que aquellos muy viejos que no alcanzaron la longevidad. Aunque en humanos se ha comprobado que aparecen concentraciones más altas de triglicéridos al avanzar la edad, y estas mayores concentraciones se han asociado a un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Nordestgaard & Varbo, 2014; Johnson & Stolzing, 2019), en ratones no se han descrito esos cambios (Kuhla *et al.*, 2011). De nuevo resulta curioso que en la edad muy vieja unas concentraciones mayores de triglicéridos se den en aquellos animales que llegan a longevos, pareciendo representar un factor de protección o marcador de mejor salud.

Los resultados obtenidos en la presente tesis respecto a las concentraciones basales de glucosa, colesterol y triglicéridos, y las variaciones de cada uno de estos parámetros de bioquímica sanguínea durante el envejecimiento, apuntan a que existen unas características metabólicas propias de cada especie y sexo (Martignoni *et al.*, 2006). Como se ha indicado, si bien en el caso del colesterol hay una cierta concordancia con lo descrito en humanos, en los triglicéridos y en la glucosa sanguínea hay importantes diferencias.

1.2. Función inmunitaria

Las funciones inmunitarias de los leucocitos peritoneales de ratones macho ICR-CD1, con la excepción de la quimiotaxis, tanto de linfocitos como de macrófagos, no se modificaron a lo largo del envejecimiento. Esto supone una gran diferencia con lo que sucede en las hembras de esta misma cepa de ratones, en las que esas funciones sí cambian, disminuyendo, en general, al envejecer (Martínez de Toda *et al.*, 2016; Garrido *et al.*, 2018). Esa falta casi generalizada de diferencias significativas en las funciones inmunitarias a lo largo del envejecimiento de los ratones macho, así como la elevada dispersión en los valores obtenidos, podría explicarse, en parte, por los resultados encontrados al subdividir cada grupo de edad en función de su supervivencia o no hasta el momento de la siguiente toma de muestras.

De todas las funciones analizadas, la actividad citotóxica antitumoral NK es en la única en la que no se observó ningún cambio en el envejecimiento de los ratones macho, aunque se expresasen los resultados de forma segregada por supervivencia de los animales. Esto no es coincidente con lo obtenido en otros estudios previos en ratones, en ratas y en humanos, en los que se apreció una disminución de esta actividad en los individuos viejos tanto machos como hembras (De la Fuente *et al.*, 2004a; Martínez de Toda *et al.*, 2016; Cruces, 2018; Garrido, 2018; Garrido *et al.*, 2018). Tampoco es igual que lo obtenido en ratones hembra de esta misma cepa que al segregar los resultados por los supervivientes o no en la siguiente edad de estudio, se comprobó que sí se apreciaban diferencias en los valores de la actividad NK en la edad en que eran viejas o muy viejas (Martínez de Toda *et al.*, 2019d). No obstante, hay que destacar que en el trabajo de Martínez de Toda *et al.* (2019), de todas las funciones estudiadas, la actividad NK fue la que menos diferencias estadísticamente significativas mostró, y el único parámetro de

función inmunitaria que su valor en la edad adulta se asoció negativamente con la longevidad (Martínez de Toda *et al.*, 2019d).

1.2.1. Capacidad quimiotáctica

En los ratones macho de la presente tesis se observó una disminución de la quimiotaxis en la vejez (en los animales viejos y muy viejos, en el caso de los linfocitos y en los muy viejos en el de los macrófagos) con respecto a la edad adulta. La quimiotaxis no es una función muy frecuentemente estudiada en el marco de la inmunosenescencia, y la de linfocitos lo es todavía menos que la de macrófagos. No obstante, una disminución similar a esta de machos se ha observado también en células peritoneales de ratones hembra, como ha sido comprobado por nuestro grupo en trabajos previos (Martínez de Toda *et al.*, 2016). Igualmente, una disminución de la quimiotaxis al envejecer se ha comprobado también en leucocitos esplénicos y de ganglios axilares de ratas hembra (De la Fuente *et al.*, 2004a) y en células aisladas de sangre periférica humana (Fulop *et al.*, 2004; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2013; Maté, 2015; Martínez de Toda *et al.*, 2016).

El hecho de que en esta función los ratones que alcanzan elevada longevidad (120 semanas) no manifiesten diferencias con la edad adulta, ha sido también detectado en los ratones hembra (Arranz *et al.*, 2010a; Martínez de Toda *et al.*, 2016) y en la especie humana, en la que los centenarios muestran valores de esta función similares a los de los adultos y mayores que las de los ancianos (Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Martínez de Toda *et al.*, 2016).

Cuando se subdividen los resultados obtenidos en cada edad en base a la supervivencia, en la quimiotaxis de linfocitos se sigue apreciando el descenso en la edad vieja, pero además se detectó que aquellos ratones macho adultos que no alcanzaron la siguiente edad, tenían un índice de quimiotaxis significativamente superior a los que

alcanzaron edades longevas. Se observa, por tanto, un comportamiento contrario al de las hembras, pues en este sexo los animales que llegaron a longevos, en la edad adulta, mostraron una mayor quimiotaxis de sus linfocitos que aquellos que sobrevivieron sólo a la siguiente edad y mucho mayor que los que no sobrevivieron (Martínez de Toda *et al.*, 2019d). No obstante, en la quimiotaxis de macrófagos, cuando se segregan los datos por la supervivencia que alcanzan los animales, se aprecia que en la edad muy vieja (96 semanas), la disminución de esa quimiotaxis se debe a la del grupo que no alcanza la siguiente edad. Este hecho se detectó también en hembras a esa edad muy vieja, aunque en las hembras, a diferencia de en los machos, eso sucedió también en las otras edades (Martínez de Toda *et al.*, 2019d). De nuevo, en los machos hay un comportamiento distinto al de las hembras que se aprecia, en este caso, fundamentalmente en los linfocitos. Tales diferencias podrían estar detectando un hecho biológico diferencial en ambos sexos y que mostraría la necesidad de una menor quimiotaxis linfoide en la edad adulta para alcanzar mayor longevidad en los machos. No obstante, también esa menor quimiotaxis de linfocitos, contabilizada en los machos que llegan a longevos, podría ser consecuencia de una mayor capacidad de movilidad hacia el foco infeccioso en esos animales, lo cual haría que, en el tiempo de realización de la técnica, las células hayan podido atravesar el filtro de las cámaras de Boyden y estar en el compartimento inferior, no siendo contabilizadas en el filtro. Este hecho lo hemos podido detectar en algunos diseños experimentales, y resulta una limitación de la técnica empleada (resultados de nuestro grupo).

En un estudio en el que se realizó un seguimiento durante 7 años a algunos de los participantes ancianos de ambos sexos, se observó que la quimiotaxis mostraba un claro detrimento en aquellos individuos que no sobrevivieron al periodo de seguimiento, aun cuando en el momento inicial del estudio presentaron valores adecuados de esta función

inmunitaria (Niwa *et al.*, 1989). Aunque este estudio pudo reclutar participantes masculinos (78) y femeninos (88), no se hacen distinciones en relación al sexo de los individuos que sobreviven al periodo de seguimiento de 7 años, por lo que no se pueden sacar conclusiones acerca de las diferencias que se pudieran apreciar entre ambos sexos.

Un hecho destacable que indica de nuevo las diferencias entre sexos en esta función de quimiotaxis es el comportamiento de los animales que llegan a longevos (120 semanas). En los machos se observa un mantenimiento de los valores a lo largo de las edades muestreadas, mientras que en las hembras se aprecia una disminución en la vejez que posteriormente se recupera, en los muy viejos en el caso de los macrófagos y a mayor edad en el de los linfocitos (Martínez de Toda *et al.*, 2019d).

Adicionalmente, se observó que los centenarios que sobrevivían a una hospitalización poseían una función quimiotáctica de sus neutrófilos significativamente superior a la de los que no sobrevivieron a la misma, pudiéndose establecer una relación entre la quimiotaxis y la capacidad de supervivencia, en la que no se dieron diferencias entre hombres y mujeres (Martínez de Toda *et al.*, 2020).

En resumen, tanto los datos de la bibliografía como los obtenidos en esta tesis apuntan a que la quimiotaxis es una función que disminuye en la vejez tanto en ratones como en seres humanos. En los estudios longitudinales de ratones, los resultados indican que esta disminución de la quimiotaxis en las hembras se recupera en la edad muy vieja, tanto en los ratones que alcanzan la edad longeva como en los que no. Sin embargo, en los ratones macho sólo se da esta disminución de la quimiotaxis en los muy viejos que no alcanzan elevada longevidad, mientras que los que sobreviven hasta la edad longeva no presentan cambios en la capacidad quimiotáctica de los linfocitos ni de los macrófagos peritoneales.

1.2.2. Capacidad fagocítica

La capacidad fagocítica muestra una falta de cambios a lo largo del envejecimiento en los ratones macho, a diferencia de lo encontrado en las hembras en estudios longitudinales (Martínez de Toda *et al.*, 2016; Garrido *et al.*, 2018) y transversales (Arranz *et al.*, 2010a). En algunos estudios transversales realizados con ratones macho tampoco se observaron diferencias significativas entre las capacidades fagocíticas de los adultos jóvenes y de los viejos (Shaw *et al.*, 2013), mientras que en otros trabajos sí se aprecia una capacidad significativamente menor en la vejez en este sexo (Guayerbas & De la Fuente, 2003; Kaushal & Kansal, 2014).

En humanos, aunque en algunas publicaciones no se muestran diferencias en la fagocitosis con respecto al envejecimiento (Chan *et al.*, 1998), la gran mayoría de los estudios resultan bastante consistentes en detectar un menor índice y eficacia fagocítica en neutrófilos de sangre periférica de individuos ancianos en comparación con los adultos jóvenes (Wenisch *et al.*, 2000; Butcher *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2013; Maté, 2015; Martínez de Toda *et al.*, 2016). Sin embargo, en los nonagenarios y centenarios, tanto en mujeres como en hombres, la funcionalidad fagocítica de sus neutrófilos se muestra similar o incluso mejor que la que se tiene en la edad adulta (Maté, 2015; Martínez de Toda *et al.*, 2016).

A pesar de la mayor capacidad fagocítica que muestran individuos de edades longevas, esta función inmunitaria no presentaba capacidad predictiva de la supervivencia en el estudio que realizaron Niwa y colaboradores, en el que no se encontraron diferencias significativas entre los ancianos supervivientes y los no supervivientes durante un seguimiento de 7 años (Niwa *et al.*, 1989). Sin embargo, sí resultó indicativa de una mejor recuperación después de un periodo de hospitalización en pacientes centenarios,

observándose una mayor índice fagocítico en los supervivientes tras el ingreso en el hospital (Martínez de Toda *et al.*, 2020).

Cuando se segregan los datos de cada edad por la supervivencia de los animales, el índice fagocítico (IF) medido como el número total de bolas de látex que se ingieren por cada 100 macrófagos, muestra como única diferencia significativa, un aumento de esta capacidad en los ratones macho longevos, respecto a los mismos individuos a la edad muy vieja. Con esta salvedad los valores de fagocitosis en los ratones macho que llegan a gran longevidad están muy mantenidos a lo largo del proceso de envejecimiento. De nuevo, el comportamiento de esta función en los machos es diferente del observado en las hembras, en las que se aprecia una clara disminución del índice fagocítico al envejecer y un aumento en la edad longeva (Martínez de Toda *et al.*, 2016), así como una clara mayor fagocitosis en aquellos animales que sobreviven más tiempo y en los que llegan a longevos (Martínez de Toda *et al.*, 2019d).

Si se considera la capacidad fagocítica como la proporción de macrófagos que consumen alguna bola de látex (eficacia fagocítica, EF), la evolución es diferente a la antes mencionada para el IF. Se aprecia que, en general, los ratones macho que no alcanzan la edad longeva tienen eficiencias fagocíticas superiores a los que sí llegan a esa longevidad, al menos esto sucede en la edad vieja, manteniendo los que llegan a longevos un valor de esta función casi constante a lo largo de su envejecimiento.

Esta discrepancia podría estar causada por el efecto que muestran las hormonas sexuales sobre la función de las células del sistema inmunitario. Mientras que los estrógenos parecen jugar un papel estimulador de la capacidad fagocítica, no se observan alteraciones en la fagocitosis a diferentes concentraciones de testosterona (Chao *et al.*, 1996; Miller & Hunt, 1996). Otras hormonas también pueden estar influenciando esas diferencias entre machos y hembras, así, por ejemplo, en ratas se han comprobado

distintos resultados entre ambos sexos en la capacidad fagocítica en respuesta a un estrés social (Stefanski & Grüner, 2006).

1.2.3. Capacidad linfoproliferativa

La función inmunitaria adaptativa, representada por la **capacidad de proliferación de los linfocitos**, no muestra variaciones con el envejecimiento en el estudio longitudinal llevado a cabo en los ratones macho, a diferencia de lo que se ha observado en las hembras (Arranz *et al.*, 2010a; Martínez de Toda *et al.*, 2016). No obstante, sí se detectaron cambios cuando los resultados se segregaron a cada edad por la supervivencia que alcanzaron los animales.

En lo referente a la proliferación basal de los linfocitos, en algunos estudios se han descrito aumentos con el envejecimiento en linfocitos peritoneales de ratones hembra (Martínez de Toda *et al.*, 2017; Garrido *et al.*, 2018), mientras que en otros no se han observado variaciones en este mismo tipo de células (Cruces, 2018), ni en las de sangre periférica en humanos (Maté, 2015). Además, en los individuos que superan la esperanza de vida media del grupo, esto es, que alcanzan elevada longevidad, tanto ratones como humanos, se han registrado valores inferiores de esta proliferación basal (Maté, 2015; Martínez de Toda *et al.*, 2017).

Aunque en los ratones macho del presente trabajo, la proliferación basal de linfocitos peritoneales mostró un aumento desde la edad adulta a la vieja, y una disminución al llegar a la edad longeva, esos cambios, a diferencia de lo que sucede en hembras, no fueron estadísticamente significativos. Sin embargo, al segregar los datos según la supervivencia que presentaban los ratones macho hasta las siguientes edades, se detectó que en la edad vieja el grupo de ratones que no sobrevivió hasta la siguiente edad, mostraba valores significativamente inferiores a los de aquellos que sobrevivieron. Esto parecería indicar que este parámetro por sí mismo, en los ratones macho, no supone un

factor discriminatorio a la hora de estimar la probabilidad de que un animal sobreviva hasta edades más avanzadas.

La proliferación basal de los linfocitos se considera como un indicador de estado oxidativo e inflamatorio, observándose mayores grados de proliferación basal acompañando a mayores niveles de inflamación y estrés oxidativo crónicos, tanto en ratones como en humanos (Martínez de Toda *et al.*, 2017; De la Fuente, 2018a; Garrido, 2018). De hecho, el aumento en la presencia de ROS se ha descrito como inductor de esa proliferación (Schieber & Chandel, 2014).

En cuanto a la proliferación de linfocitos en presencia de ConA, un mitógeno más selectivo de los linfocitos T (Palacios, 1982), y que es una de las funciones de la inmunidad adquirida más estudiada en el envejecimiento, la mayoría de los trabajos realizados al respecto han detectado una disminución de esta capacidad al envejecer (Bauer & De la Fuente, 2016; De la Fuente, 2020). En la presente tesis no se ha encontrado esa disminución en los linfocitos peritoneales de machos, a diferencia de lo que se ha observado en los de hembras (Arranz *et al.*, 2010a; Martínez de Toda *et al.*, 2016, 2017; Cruces, 2018). Tampoco se han obtenido diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos segregados por supervivencia, lo cual es debido a la gran dispersión de los datos.

Al considerar los porcentajes de estimulación de las proliferaciones de los linfocitos por la presencia de ConA, disminuyó considerablemente esa dispersión, y se obtuvieron algunas diferencias entre grupos de supervivencia. Así, esta estimulación fue significativamente menor en los individuos viejos que llegaron a longevos comparados con los que alcanzaron la siguiente edad de medición. Además, este mismo grupo de ratones que alcanzaban la edad longeva, experimentaron un aumento estadísticamente significativo en esta función en la edad muy vieja. Este aumento podría ser un buen

marcador de elevada longevidad en estos animales. De hecho, en un estudio longitudinal e individualizado llevado a cabo en ratones hembra, de la misma cepa que la utilizada en la presente tesis, se comprobó que los animales que llegaron a longevos mostraron un aumento del porcentaje de estimulación de la proliferación de leucocitos peritoneales en respuesta a ConA, en la edad muy vieja (Martínez de Toda *et al.*, 2017).

Aunque, como se ha comentado antes, esta capacidad de estimulación en la proliferación de linfocitos T en la mayoría de los estudios se encuentra disminuida al envejecer (Adolfsson *et al.*, 2001; Pawelec *et al.*, 2002; Garrido *et al.*, 2018; Alves & Bueno, 2019), los resultados son variables dependiendo de la especie, el sexo y la localización de los linfocitos, entre otras características. Por ejemplo, en ratas, la cinética de variación de esta función, también utilizando ConA, es diferente en machos y hembras y para los machos lo es dependiendo si los linfocitos son esplénicos o de ganglios axilares (De la Fuente *et al.*, 2004a). En ese estudio se comprobó también que mientras la respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos de machos disminuía en la vejez, como lo hacía también la de hembras, no ocurrió así en la de las células procedentes de ganglios axilares. En este caso si bien las hembras mostraron la disminución con el envejecimiento, los machos no mostraron cambios con el mismo (De la Fuente *et al.*, 2004a).

En la proliferación de linfocitos con LPS, la bibliografía también describe una disminución de este parámetro entre la edad adulta y la vieja en células peritoneales de ratones hembra (Arranz *et al.*, 2010a; Cruces, 2018; Garrido *et al.*, 2018). Este mitógeno es más selectivo de linfocitos B (Kin, 2006). En los machos estudiados en la presente tesis no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al envejecer en comparación con la edad adulta. Al segregar los datos obtenidos a cada edad en función de su supervivencia, se observó una dispersión más moderada de los datos obtenidos que en el caso de la ConA, especialmente en el grupo de ratones viejos que alcanza la edad muy

vieja. Se detectó un descenso significativo en los individuos que alcanzaron la edad longeva respecto a esos mismos ratones cuando eran adultos. Sin embargo, esta disminución no se puede decir que sea paulatina a lo largo del envejecimiento, ya que no se observan diferencias entre esos mismos ratones comparados con las edades vieja y muy vieja.

Una posible explicación de la escasa diferencia observada en los resultados de proliferación estimulada con mitógenos en ratones macho, en comparación con lo que se ha publicado en hembras, podría ser que la respuesta principal al mitógeno correspondiente se desarrolle en tiempos de cultivo diferentes en ambos sexos. De hecho, en ratones hembra se demostró que la capacidad proliferativa a edades longevas se apreciaba sólo a un tiempo corto de cultivo con el mitógeno, atenuándose posteriormente a las 24 y especialmente a las 48 horas (Martínez de Toda *et al.*, 2017), siendo este último tiempo el utilizado en la presente tesis.

No obstante, como ya se ha comentado anteriormente, las diferencias en la evolución de las funciones inmunitarias durante el envejecimiento en los leucocitos peritoneales de los ratones macho entre lo encontrado en esta tesis y en las publicaciones al respecto, pueden deberse a multitud de factores, como se ha indicado en publicaciones previas (Alonso-Fernández *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2011). Así, desde la especie (Thomas *et al.*, 2020), cepa (Casarrubea *et al.*, 2016), sexo, localización de las células inmunitarias que se estudien (De la Fuente *et al.*, 2004a), el momento del día o del año en que se hagan los experimentos (Maté, 2015) o el propio sexo del experimentador (Sorge *et al.*, 2014), entre otras consideraciones, pueden modificar los resultados obtenidos. En este sentido, en nuestro grupo de investigación, los resultados ampliamente comentados en la evolución de la inmunosenescencia en las hembras han sido

fundamentalmente obtenidos por un investigador femenino (Martínez de Toda *et al.*, 2016, 2019d).

1.3. Estado oxidativo

De forma general se ha descrito que al envejecer se da un aumento de los oxidantes y una disminución de las defensas antioxidantes en las células inmunitarias, tanto de sangre periférica humana como de animales de experimentación (Droge, 2003; De la Fuente & Miquel, 2009; Vida *et al.*, 2011, 2017; Liguori *et al.*, 2018; Martínez de Toda *et al.*, 2019b).

1.3.1. Actividad glutatión peroxidasa y reductasa (GPx y GR)

En los resultados obtenidos en la presente tesis referentes a la actividad enzimática GPx en las células leucocitarias de peritoneo de ratones macho, se observó el máximo de esta actividad en la edad vieja, dándose un aumento significativo de los valores en esta edad respecto a los encontrados en la adulta. Sin embargo, al llegar a muy viejos y a longevos, esta actividad enzimática vuelve a disminuir, asemejándose los valores a los de los adultos. En la actividad de la GR no se observaron cambios estadísticamente significativos a lo largo del envejecimiento.

En los estudios publicados sobre los cambios en estas enzimas antioxidantes con el envejecimiento, hay datos muy diversos. Así, en estudios trasversales con plasma humano se ha observado que la actividad GPx es mayor en la vejez que en la edad adulta (Erden-Inal *et al.*, 2001; Junqueira *et al.*, 2004), mientras que la actividad GR muestra lo contrario (Erden-Inal *et al.*, 2002). Sin embargo, otros trabajos realizados en sangre humana completa de hombres y mujeres observan una correlación negativa entre la actividad GPx y la edad de los participantes en un amplio rango de edades (35-79 años), incluso después de corregir por enfermedades y otras condiciones (Trevisan *et al.*, 2001;

Espinoza *et al.*, 2008). Asimismo, en otro estudio, también en sangre completa humana, se observó una menor actividad de ambas enzimas (GPx y GR) en la vejez, mientras que en los longevos los valores de esas actividades fueron más altos (Martínez de Toda *et al.*, 2019b). Resultados similares se obtuvieron en estudios longitudinales llevados a cabo en leucocitos peritoneales de ratones hembra (Martínez de Toda *et al.*, 2019d). No obstante, en otro trabajo realizado en nuestro laboratorio no se observaron diferencias significativas en las actividades GPx ni GR en las células inmunitarias del peritoneo de ratones en el envejecimiento, tanto en las hembras (Garrido *et al.*, 2018), como en machos (Garrido, 2018). Hay que destacar dos cosas respecto a este último trabajo hecho en machos, y es que además de expresarse los datos de las actividades por número de células, en lugar de por mg de proteína, las edades de valoración no fueron coincidentes con las de la presente tesis. Aun así, se observó, en machos, un cierto aumento en la edad madura respecto a la adulta en la GPx, aunque no alcanzara significación estadística.

El aumento de GPx en la edad vieja podría indicar un mecanismo de compensación en un estado de alto estrés oxidativo. Así, se ha encontrado un resultado similar (una mayor actividad de GPx) en leucocitos peritoneales de ratones obesos, tanto machos como hembras, que presentan características de una vejez acelerada, con menores concentraciones de antioxidantes, como el GSH (Hunsche *et al.*, 2019).

En el caso de los datos de actividad GR aunque, como se ha indicado, no hay diferencias estadísticamente significativas, se aprecia un aumento en la edad vieja y un posterior descenso progresivo. Curiosamente, en hembras, la mayoría de los estudios comentados muestran que las actividades de GPx y GR alcanzan un mínimo en la edad vieja, mientras que en machos el comportamiento es el contrario, con el máximo de actividad a esa misma edad. Esta misma dinámica opuesta entre macho y hembras se describió para la enzima GR en extractos hepáticos de ratas Fisher 344, por lo que podría

suponer un efecto propio del dimorfismo sexual, aunque se requerirían más estudios para asegurarlo categóricamente (Rikans & Hornbrook, 1997).

Al segregar estos datos según supervivencia hasta la siguiente edad, la mediana de los valores de actividad GPx, observados en los individuos que alcanzan alta longevidad a las edades adulta y vieja, parece ser superior a la de los de los ratones que alcanzaron la siguiente edad o también comparados con los que ni siquiera alcanzaron la edad muy vieja. Sin embargo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las distribuciones de valores, impidiendo así el pronóstico de la supervivencia de estos ratones. En un estudio previo llevado a cabo en hembras, la actividad enzimática GPx en ratones que llegaban a longevos presentaba niveles generalmente superiores a los demás ratones a lo largo de todo el envejecimiento, salvo en la edad vieja, en la que no se detectaron diferencias significativas, independientemente de la edad a la que muriesen (Martínez de Toda *et al.*, 2019d).

En el caso de la GR, se observa un valor significativamente superior de actividad en los individuos viejos que llegaron a la edad longeva en comparación con los que sobrevivieron, pero no alcanzaron dicha edad. Este hecho parecería apuntar a que la GR podría tener, en los machos, un papel compensador en la edad vieja que permitiría un mejor ciclo del glutatión en los ratones que alcanzan la longevidad extrema.

1.3.2. Contenido de glutatión (GSH y GSSG)

En lo referente a las concentraciones de glutatión reducido (GSH), los resultados obtenidos han mostrado una disminución progresiva desde la edad adulta, al avanzar la edad. No obstante, dada la alta dispersión de datos, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas a la edad longeva respecto de los niveles observados en las edades adulta y vieja. En general, en los trabajos previos se han observado concentraciones inferiores de GSH al avanzar la edad, tanto en humanos (Samiec *et al.*,

1998; Erden-Inal *et al.*, 2002) como en ratones (Hazelton & Lang, 1980) independientemente del tejido analizado (Maher, 2005). Sin embargo, en hembras de la misma cepa utilizada en la presente tesis, las concentraciones de GSH en leucocitos peritoneales disminuyen significativamente en la vejez, aumentando posteriormente en las edades avanzadas (Arranz *et al.*, 2010b, a; Martínez de Toda *et al.*, 2019b). Las menores concentraciones de GSH en leucocitos peritoneales de los longevos que se han detectado en los machos de la presente tesis es, en principio, un resultado extraño. Observando los resultados segregados por supervivencia de los animales, se aprecia que los animales que llegan a longevos ya muestran esas menores concentraciones de GSH en la edad vieja. Todo ello apunta a una diferente regulación redox en este contexto en los machos en comparación con las hembras (Martínez de Toda *et al.*, 2019d).

En la concentración de glutatión oxidado (GSSG) se obtuvo una disminución estadísticamente significativa en las células peritoneales de los individuos muy viejos en comparación con los niveles mostrados en adultos y viejos. Mientras que algunos estudios en ratones no observaron tendencias claras en las concentraciones de GSSG medido en diversas localizaciones con la edad (Hazelton & Lang, 1980; Martínez de Toda *et al.*, 2019b), otros autores sí han detectado mayores niveles en plasma o en sangre completa de personas ancianas frente a adultas (Samiec *et al.*, 1998; Erden-Inal *et al.*, 2002; Sekhar *et al.*, 2011; Martínez de Toda *et al.*, 2019b). Es importante considerar que pequeñas concentraciones de GSSG ya producen efectos perjudiciales en las funciones celulares, de tejidos, órganos y sistemas, que pueden desencadenar la muerte del individuo (Maher, 2005). Esto explicaría que las concentraciones de GSSG encontradas en los leucocitos peritoneales de los animales muy viejos que llegaron a longevos sean significativamente menores, siendo posiblemente un reflejo de los mecanismos de control de la oxidación que se establecen en estos ratones que alcanzan mayor longevidad, y que

podría haber comenzado en la edad vieja con la mayor actividad que muestran esas células en la GR, la enzima que cataliza el paso de GSSG a GSH. Evidentemente es muy difícil deducir por los resultados obtenidos, que realmente muestran solo una foto fija de lo que está sucediendo en los leucocitos peritoneales, la evolución de los mecanismos redox que están permitiendo a los animales viejos llegar o no a longevos.

Estos valores de GSH y GSSG observados explican los resultados del cociente GSSG/GSH, que presenta dispersiones también muy elevadas. A pesar de ello, sí que se detecta un aumento significativo en este cociente en los viejos, en comparación con los adultos, y un descenso en la edad muy vieja. Del mismo modo, en plasma y en sangre humana completa de un estudio transversal se observa un menor cociente GSH/GSSG (por tanto, mayor cociente GSSG/GSH) en la vejez respecto a los adultos (Erden-Inal *et al.*, 2002; Sekhar *et al.*, 2011). En leucocitos peritoneales de ratones hembra se da una evolución en forma de “U invertida”, con máximos en este cociente en ratones viejos (Martínez de Toda *et al.*, 2019d), lo que podría coincidir, en parte, con los resultados obtenidos en la presente tesis, a excepción de los resultados en ratones longevos. Estos resultados distintos en ratones longevos podrían deberse a varios factores, uno de ellos la gran dispersión de los datos obtenidos en los machos (lo que podría subsanarse aumentando el tamaño de la muestra), pero también a los valores de GSH y GSSG en estos animales macho longevos que se han comentado antes.

Aunque los valores de GSH obtenidos en la presente tesis en machos son similares a los de las hembras, llama la atención que en los de GSSG son de un orden de magnitud mayores (Martínez de Toda *et al.*, 2019b). Si bien los machos tienden a presentar estado de oxidación superior al de las hembras (De la Fuente & Miquel, 2009; Baeza *et al.*, 2010a; Garrido, 2018) son necesarios más experimentos para determinar la incidencia de estos parámetros en el diferente envejecimiento de ambos sexos.

1.3.3. Peroxidación lipídica (Malondialdehído, MDA)

En relación a la concentración de MDA, se han observado en estudios transversales, unas cantidades mayores en plasma de ratas y humanos en la edad vieja en comparación con la adulta (Tian *et al.*, 1995; Erden-Inal *et al.*, 2001; Junqueira *et al.*, 2004). En otros estudios transversales en sangre completa y en neutrófilos humanos se observaron también valores significativamente mayores a la edad vieja, con concentraciones menores en edades muy avanzadas (Martínez de Toda *et al.*, 2019b). Además, en experimentos longitudinales con ratones hembra se observó una dinámica similar de aumento (no significativo) entre las edades adulta y vieja, seguido de descensos significativos en edades posteriores (Martínez de Toda *et al.*, 2019b, d).

En los ratones macho estudiados en la presente tesis, se ha detectado esa misma dinámica de aumento de la concentración de MDA a la edad vieja, en la que se aprecia el máximo valor, momento en el que comienzan a descender sus cantidades en leucocitos peritoneales. Esto indicaría que la peroxidación lipídica de los leucocitos peritoneales en estos machos reflejaría el estado de estrés oxidativo que presentan las células, ya que la evolución en la edad vieja y muy vieja es similar a la que muestra el cociente GSSG/GSH. No obstante, esto no se cumple en las células de los longevos, en los que las concentraciones de MDA son muy bajas, lo que sí reflejaría que, en estos animales, a pesar de la menor cantidad de GSH, de GPx y GR se están dando mecanismos de control redox que disminuyen la oxidación lipídica.

Un hecho curioso respecto a las concentraciones de MDA en leucocitos de machos se observa al analizar los resultados segregando por supervivencia de los ratones. A la edad adulta, los animales que alcanzaron la edad longeva mostraron unas concentraciones muy superiores a las de los otros grupos de supervivencia. Además, la cantidad de MDA que contenían los leucocitos peritoneales de los ratones viejos que no alcanzaron la edad

muy vieja fue significativamente inferior a la de los ratones que alcanzaron esa edad muy vieja. Esto parecería indicar que existe una cierta ventaja para la supervivencia en las edades adulta y vieja en poseer unos valores más altos de peroxidación lipídica. Estos resultados contrastan con los observados en un estudio longitudinal en personas ancianas (73,2±6,1 años), en el que se detectó que la presencia de cantidades mayores de MDA plasmático suponía una menor probabilidad de sobrevivir a un periodo de 5 años (Huerta *et al.*, 2006). Asimismo, en ratones hembra, los valores de MDA de aquellos ratones que alcanzan la edad longeva se mantenían significativamente inferiores a los de los demás (Martínez de Toda *et al.*, 2019d).

De nuevo, hay que destacar las diferencias en los mecanismos que se llevan a cabo en los leucocitos de machos y hembras para alcanzar el balance redox y su repercusión o significado como marcador en la longevidad. Para poder proponer que estos distintos resultados son únicamente debidos al sexo, y descartar otros factores como el momento del año en que se hacen los experimentos (Maté *et al.*, 2014), el que el experimentador sea hombre o mujer (Sorge *et al.*, 2014), entre otros, habría que abordar un estudio en paralelo en ratones macho y hembra, algo que será objeto de futuras investigaciones.

Por todo lo comentado, como conclusión general de este objetivo se puede indicar que:

A lo largo del envejecimiento, los ratones macho de la cepa ICR-CD1 experimentan algunos cambios en su bioquímica sanguínea, así como en la función inmunitaria y estado redox de sus leucocitos peritoneales. Tales cambios muestran grandes desviaciones interindividuales y pocas diferencias estadísticamente significativas, a diferencia de lo comprobado en hembras.

Como conclusiones más concretas se puede indicar que:

Los ratones macho presentan en la vejez una disminución en la concentración de glucosa y triglicéridos sanguíneos, así como en la quimiotaxis de las células inmunitarias, mientras que muestran un aumento de la actividad GPx, del cociente GSSG/GSH y de la concentración de MDA. Los animales que llegan a ser longevos apenas han presentado diferencias con los otros grupos en las funciones inmunitarias estudiadas, con la excepción del alto porcentaje de proliferación de los linfocitos en respuesta a la ConA en la edad muy vieja. Sin embargo, en la edad vieja han mostrado alta actividad GR, baja concentración de GSH, y en la edad muy vieja baja concentración de GSSG. Curiosamente, estos animales tienen en la edad adulta una elevada concentración de MDA, aunque ya siendo longevos estas concentraciones son muy bajas, al igual que las de GSH.

2. Desarrollo de modelos matemáticos predictivos de longevidad para ratones macho adultos de la cepa ICR-CD1

2.1. Capacidad predictiva de parámetros bioquímicos, inmunitarios y oxidativos a lo largo del envejecimiento en ratones macho

Una predicción o estimación temprana de la longevidad que alcanzará un ratón puede resultar de gran utilidad por diversos motivos. Primero, la homogeneización entre cohortes de ratones control y experimental permitirá obtener diferencias representativas con un menor n° de animales. Segundo, la obtención de estimadores tempranos de la eficacia de un tratamiento o estrategia, que puedan tener un efecto sobre la esperanza de vida, permitirá acortar los tiempos de experimentación. Y, en tercer lugar, identificar los parámetros que afectan positiva o negativamente a la longevidad ayudará a determinar posibles mecanismos celulares y moleculares subyacentes, facilitando así el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas (Swindell *et al.*, 2008; Martínez de Toda *et al.*, 2019c). Aunque se han descrito algunos marcadores de esperanza de vida, como capacidades psicomotoras, epigenéticos, conductuales, inmunitarios, de estado redox o de fragilidad (Ingram *et al.*, 1982; Cavigelli & McClintock, 2003; Fahlström *et al.*, 2012; Horvath, 2013; Martínez de Toda *et al.*, 2019c; Schultz *et al.*, 2020), éstos son complicados de validar. La causa es que no es fácil llevar a cabo estudios longitudinales hasta la muerte de los participantes, lo que impide hacer la correlación entre los parámetros y la esperanza de vida. En cambio, por limitaciones temporales es más común emplear la edad del individuo como variable a predecir en lugar de la fecha de muerte, tanto en humanos como en animales de experimentación, haciendo que los marcadores obtenidos se seleccionen para estimar la edad del sujeto y no necesariamente para la esperanza de vida del mismo (Schultz *et al.*, 2020).

Además, dado que las bases genéticas, de estilo de vida y aleatorias que permiten alcanzar una longevidad extrema son multifactoriales, sólo el uso de marcadores de orígenes variados permitirá llegar a un modelo que permita la estimación de la esperanza de vida para un amplio abanico de población (Pignolo, 2019).

Por todo lo expuesto, en la presente tesis se buscó estudiar la correlación que se observa entre los parámetros bioquímicos, inmunitarios y de estado redox que se han indicado previamente, con la longevidad observada y, posteriormente, generar diferentes ecuaciones, mediante regresión lineal múltiple, que permitan la predicción de la longevidad a través de esos parámetros medidos en la edad adulta en ratones macho (40 semanas).

2.2. Capacidad de predicción de parámetros bioquímicos, inmunitarios y redox

Como parte del objetivo 2.1, se discute la correlación que muestra cada parámetro bioquímico, inmunitario y redox medidos a diferentes edades en los ratones macho, con la longevidad.

En los parámetros bioquímicos medidos en sangre periférica de los ratones, no se detectó que ninguno correlacionase significativamente con la edad alcanzada por cada animal. Los más cercanos a la significación estadística fueron la glucosa ($p=0,082$) y el colesterol ($p=0,069$) ambos a la edad adulta, así como los triglicéridos a la edad vieja ($p=0,094$).

Intuitivamente, las predicciones de esperanza de vida resultan más sencillas a corto plazo, ya que cuanto más tiempo pasa, más probable es que un evento imprevisto altere esa esperanza de vida y consecuentemente la predicción. En este sentido, aunque no se obtuvo significación estadística en ningún parámetro bioquímico, curiosamente, los valores de estas variables a la edad adulta resultaron más correlacionados con la

longevidad observada que los valores a edades más avanzadas y, por tanto, más cercanas a la fecha de muerte. Esta falta de correlación a mayores edades es posiblemente debida al hecho de que se trata de un estudio longitudinal y, necesariamente, el tamaño de la muestra va a decrecer a medida que transcurre el tiempo disminuyendo así también la significación de esta correlación.

Aunque existe abundante bibliografía que correlaciona la bioquímica sanguínea con la edad de los participantes o con la prevalencia de enfermedades, en especial enfermedades cardiovasculares (Anderson *et al.*, 1987; Kuhla *et al.*, 2011; Nordestgaard & Varbo, 2014; Johnson & Stolzing, 2019; Seo *et al.*, 2019), los trabajos que estudian la capacidad predictiva de estas variables con la longevidad que alcanza cada individuo, son muy escasos (Putin *et al.*, 2016; Mamoshina *et al.*, 2018).

En relación con los parámetros de función inmunitaria, muy pocas funciones correlacionaron con la longevidad de los ratones macho, a pesar de que presentaran algunos cambios significativos a lo largo del envejecimiento. Más concretamente, hasta la edad muy vieja (96 semanas) ninguna de las funciones estudiadas obtuvo un p valor cercano a la significación requerida, obteniéndose a esa edad en las funciones de quimiotaxis de macrófagos, así como en ambas medidas de la función fagocítica (índice y eficacia).

La quimiotaxis de macrófagos, medida a la edad muy vieja, correlacionó fuerte y positivamente con la longevidad que alcanzaban los ratones. Esto remarca la importancia de esta función para la resolución de infecciones, movilizand o a los fagocitos hacia el lugar donde tienen que desempeñar su función defensiva. Resultados similares se han obtenido en ratones hembra, aunque no únicamente en la edad muy vieja (Martínez de Toda *et al.*, 2019d).

Sin embargo, al contrario que en las hembras, tanto el índice como la eficacia fagocítica correlacionaron en machos de manera negativa con la longevidad a la edad muy vieja. Este resultado podría justificarse por el hecho de que la fagocitosis es una actividad que consume defensas antioxidantes en los fagocitos (Hernanz *et al.*, 1990). Si la fagocitosis es menor el equilibrio entre los oxidantes producidos para llevar a cabo esa función (Azarabadi *et al.*, 2017) y los antioxidantes consumidos, se hace más positivo en el sentido de disminuir el estrés oxidativo. Puesto que el estrés oxidativo que producen las células inmunitarias en su trabajo defensivo, si no está bien regulado, supone la base de la inmunosenescencia y consecuentemente de la menor longevidad (De la Fuente & Miquel, 2009), una capacidad fagocítica menos exagerada, podría permitir un adecuado equilibrio redox y promover un envejecimiento saludable y mayor esperanza de vida.

Esto difiere de lo observado en nuestro laboratorio en el caso de ratones hembra de la misma cepa y a las mismas edades. En este sexo, mantener un elevado índice fagocítico correlacionaba con una mayor longevidad, en comparación con las que no alcanzaban la edad longeva (Martínez de Toda *et al.*, 2019d). Esta disparidad entre sexos podría estar causada, entre otras cosas, por la diferente presencia al envejecer de defensas antioxidantes en los machos y las hembras. En diferentes estudios, analizando distintas localizaciones, se ha observado de forma reiterada, menores cantidades y actividades de los antioxidantes en los machos, posiblemente debido a la menor presencia de estrógenos en este sexo (Borrás *et al.*, 2003; De la Fuente & Miquel, 2009; Baeza *et al.*, 2010a).

Efectivamente, los estrógenos no sólo tienen capacidad antioxidante *per se*, también aumentan la expresión de múltiples defensas antioxidantes (Stirone *et al.*, 2005; Viña *et al.*, 2006). Como anteriormente se ha comentado, por ejemplo, en el caso del glutatión, comparando entre machos y hembras, ni la evolución en las cantidades de antioxidantes

en las células inmunitarias, ni los valores absolutos de las mismas son semejantes en ambos sexos.

Así, aunque no hayamos observado diferencias en la capacidad antioxidante (enzimas antioxidantes GPx, GR y el GSH) en la edad muy vieja entre los ratones que llegan a la edad longeva y los que mueren antes de alcanzar las 120 semanas (**Figura 38Figura 40**), el mantenimiento de una capacidad fagocítica (tanto la que representa el IF como el EF) ligeramente más disminuida en los ratones que alcanzan la edad longeva, frente a los que mueren antes de las 120 semanas (**Figura 25Figura 26**), podría ayudar a mantener de un adecuado equilibrio redox, y así promover un envejecimiento saludable.

En cuanto a la función de la inmunidad adquirida, estudiada en la presente tesis, la proliferación de linfocitos, no se alcanzó significación estadística en ninguno de los aspectos analizados de la misma, a ninguna de las edades. Las variables que más se acercaron en este aspecto fueron la capacidad de estimulación con ConA de ratones viejos ($p=0,077$) y la proliferación en condiciones basales de ratones longevos ($p=0,091$). A pesar de no ser correlaciones significativas, los resultados en machos contrastan nuevamente con los de hembra. Así, en estas un mayor porcentaje de estimulación proliferativa con ConA tiende a implicar una mejor supervivencia, especialmente a menores edades (Martínez de Toda *et al.*, 2019d).

Un posible hecho, que no se ha considerado en la presente tesis, que podría explicar las diferencias en este aspecto entre machos y hembras, es que los machos necesitaran un tiempo de cultivo, en presencia de ConA, diferente para apreciar predicciones como las vistas en las hembras. Nuestro grupo ha comprobado, por ejemplo, que la menor respuesta proliferativa frente a mitógenos observada en los individuos de elevada longevidad era debida a que a esa edad los tiempos más cortos de cultivo, mucho menores que las 48 h

utilizadas en el diseño estándar de esta técnica, eran en los que se conseguía el pico de proliferación (Martínez de Toda *et al.*, 2017).

Las funciones que regulan el balance redox no mostraron ninguna correlación significativa con la longevidad que alcanzaban los individuos a ninguna de las edades, a excepción de la concentración de MDA a la edad adulta. Dado que unas altas concentraciones de MDA representan que el estrés oxidativo es elevado y se ha dado un daño a lípidos, se esperaría que correlacionase de manera negativa con la edad alcanzada por los ratones, como se observó en hembras de la misma cepa en las etapas adultas (Martínez de Toda *et al.*, 2019d). Sin embargo, esta correlación resultó ser positiva en los machos, de modo que aquellos ratones cuyos leucocitos presentaban una mayor concentración de MDA, alcanzaban mayores longevidades. Una posible justificación de este fenómeno podría ser que, como se ha descrito un efecto de esta molécula sobre la transcripción (Kristal *et al.*, 1994; Choi *et al.*, 2011), una elevada concentración de MDA al inicio del proceso de envejecimiento suponga una alarma para la célula, la cual pondría en marcha mecanismos antioxidantes compensatorios para mantener ese equilibrio redox y así permitir una elevada longevidad. Como se puede observar en la **Figura 43**, aunque no de manera significativa, los niveles de MDA de los individuos que llegan a longevos parecen reducirse a lo largo del envejecimiento, mientras que los ratones que no llegan a esa edad no muestran una tendencia consistente, posiblemente reflejando unos mejores mecanismos de eliminación de este tipo de residuos.

Aun cuando las ausencias de significación puedan deberse a un insuficiente tamaño de la muestra utilizada en las edades más avanzadas, es destacable la observación de que un mismo parámetro tanto bioquímico, inmunitario como redox resulte beneficioso o perjudicial para una larga vida dependiendo del momento en el envejecimiento del ratón en el que se observe. Como sucede precisamente con las concentraciones de MDA, a la

edad adulta resulta beneficioso que sean mayores para alcanzar una elevada longevidad. Sin embargo, en la edad vieja esas concentraciones no manifiestan diferencias entre las de los ratones que viven hasta la edad longeva y aquellos que ni siquiera sobreviven hasta la siguiente edad de medición. Este fenómeno según el cual unos parámetros son predictivos a una edad pero no a otra, también se ha observado en ratones hembra (Martínez de Toda *et al.*, 2019d) o incluso en humanos en funciones como la presión sanguínea (Blom *et al.*, 2013), la obesidad (Flegal *et al.*, 2013) o con la fragilidad y el síndrome metabólico (Schultz *et al.*, 2020). Por todo ello, se hace necesario considerar el momento del proceso de envejecimiento en el que se toman las muestras con las que se calcularán las predicciones de longevidad.

Como ya se intuía por las diferencias detectadas entre machos y hembras en la prevalencia de enfermedades y otros aspectos relacionados con el avance de la edad, las vías de regulación que utilizan ambos sexos para conseguir envejecimiento saludable y así alcanzar una elevada longevidad son diferentes (Franceschi *et al.*, 2018a). En ratones hembra se observó que la mayoría de parámetros inmunitarios y redox se mantenían a niveles superiores en los ratones que alcanzaban la elevada longevidad con respecto a los del resto de ratones de idéntica edad cronológica. No obstante, en machos no se ha encontrado que esos parámetros mostraran diferencias significativas entre los presentes en ratones que alcanzaban la edad longeva, los que morían antes de la siguiente edad de medición y aquellos que morían en algún momento intermedio.

De este apartado se puede concluir que en los ratones macho se da una correlación entre los valores que tengan en la edad muy vieja de quimiotaxis de macrófagos y de fagocitosis, y de MDA en la edad adulta, con la esperanza de vida de los animales.

2.3. Construcción de modelos matemáticos de predicción

Con los datos obtenidos en la bioquímica sanguínea, en la función y estado redox de leucocitos peritoneales, en el estudio longitudinal de ratones macho, se han generado modelos matemáticos de predicción de la longevidad.

2.3.1. Modelo Bioquímico

El modelo matemático de predicción de la longevidad a partir de datos de bioquímica sanguínea a la edad adulta sólo hizo uso de dos de los tres parámetros estudiados (colesterol y triglicéridos en sangre), ya que la adición del tercero (glucosa) no mejoraba la capacidad de predicción de la varianza observada en la longevidad.

Numerosos trabajos, como el estudio Framingham, han arrojado resultados en los que se observó que unos niveles bajos de colesterol circulante en personas adultas se correlacionaban con una mayor supervivencia a lo largo de un periodo de 30 años (Milman *et al.*, 2014). En cambio, a partir de los 50 años, bajadas en la concentración de colesterol en sangre correlacionaban con aumentos en la mortalidad por cualquier causa (Anderson *et al.*, 1987; Stamler *et al.*, 2000). Y específicamente el colesterol HDL se ha visto en mayores concentraciones en familias más longevas, correlacionando con menor incidencia de hipertensión, enfermedades cardiovasculares, hiperplásicas o neurodegenerativas (Milman *et al.*, 2014).

Así, de la misma forma que en los estudios en humanos mencionados, en los ratones empleados en la presente tesis, menores niveles de colesterol circulante a la edad adulta parecen indicar una mejor salud y la posibilidad de alcanzar una mayor longevidad. Y a su vez, a edades más avanzadas de los ratones, la correlación de los niveles de colesterol en sangre respecto a la edad de muerte del individuo se volvía positiva, aunque no alcanzaban significación estadística.

2.3.2. Modelo Inmunitario

El modelo matemático inmunitario de predicción de longevidad, obtenido previamente en nuestro laboratorio, con ratones hembra, obtuvo una capacidad de explicación de la varianza muy elevada (75,8%) empleando tres parámetros de función inmunitaria: fagocitosis y quimiotaxis de macrófagos y capacidad proliferativa de linfocitos estimulados con ConA (Martínez de Toda *et al.*, 2019c). Sin embargo, en los machos del presente estudio, la aplicación de parámetros inmunitarios dio un modelo muy poco apropiado, explicándose únicamente una varianza de la longevidad de un 22,7% ($R^2 = 0,227$). Al realizar una correlación de *Pearson* entre los datos estimados por este modelo y los observados, se obtuvo un valor de correlación significativo de 0,556 ($p < 0,001$).

Así, los parámetros que predicen la longevidad en hembras y machos no sólo son diferentes, como se sugería en el trabajo previamente comentado (Martínez de Toda *et al.*, 2019c), sino que intervienen muchos más factores en la ecuación de predicción en el caso de ratones macho, haciendo que la longevidad estimada en este sexo sea más complicada de obtener que en hembras.

El modelo inmunitario de cuatro parámetros generado a partir de datos de función inmunitaria en ratones macho adultos, recogido en la **Ecuación 5**, reconoce que una mayor respuesta proliferativa de los linfocitos T frente al mitógeno ConA, así como una menor proliferación basal, suponen factores que, a la edad adulta, parecen facilitar el desarrollo de un envejecimiento saludable y, por tanto, la llegada a la edad longeva en un buen estado de salud. Esto concuerda con resultados obtenidos en hembras de la misma cepa, donde una menor proliferación basal y mayor proliferación en respuesta a ConA son indicativos de una mejor respuesta inmunitaria (De la Fuente, 2008; Arranz *et al.*,

2010b) y de una comparativamente mayor longevidad (Viveros *et al.*, 2001; Garrido, 2018; Martínez de Toda *et al.*, 2019c, d).

Sin embargo, los resultados en machos también implican que funciones que deberían ser positivas para el buen funcionamiento del sistema inmunitario, y consecuentemente la salud y la esperanza de vida, suponen factores que restan predicción de longevidad, como es el caso de la quimiotaxis de los linfocitos y el porcentaje de estimulación proliferativa en presencia de ConA.

En machos, al igual que en hembras, la capacidad predictora de cada variable estudiada no presentaba siempre la misma correlación o capacidad predictiva (Martínez de Toda *et al.*, 2019d), sino que variaban con la edad a la que se realizaban las mediciones, como por ejemplo, sucedió con la quimiotaxis de linfocitos, que pasó de correlacionar negativamente con la longevidad a la edad adulta a positivamente a la edad vieja. Además, el hecho de que la correlación de las funciones con la esperanza de vida dependa del momento del envejecimiento en el que se encuentre el individuo, supone que estas funciones no varían unidireccionalmente con la edad, apoyando así la teoría de la remodelación (Franceschi *et al.*, 2000c).

Concretamente, el modelo inmunitario generado consiguió una capacidad de predicción de la varianza en la longevidad de R^2 ajustada de 22,7%. Superior que la explicada por el modelo bioquímico, pero inferior a la de los modelos Redox y Combinado (detallados en los siguientes apartados) en los en los que se empleó un número semejante de variables de predicción.

Algunas funciones presentaron una correlación con la longevidad más significativa a edades diferentes a la adulta, como la estimulación proliferativa (ConA) a la edad vieja o la proliferación basal a la edad longeva. Sin embargo, dado que a mayores edades se contaba con una muestra más limitada para la función inmunitaria en machos,

no se puede decir con rotundidad si se podría obtener una fórmula más predictiva a diferentes edades.

Por tanto, se concluye que las funciones inmunitarias analizadas, medidas en la edad adulta, y que sí permitieron un modelo predictivo en hembras, no parecen ser muy influyentes para la longevidad en los machos. En estos son las funciones de linfocitos (quimiotaxis, proliferación basal y en respuesta al mitógeno ConA) las que más inciden. Sería necesario valorar otros parámetros inmunitarios en machos que posibilitaran una mejor predicción.

2.3.3. Modelo Redox

El modelo de predicción de la longevidad de 5 variables basado en los parámetros de estrés oxidativo estudiados alcanzó a explicar el 41,0% de las diferencias observadas en la longevidad entre los ratones macho y una correlación de *Pearson* entre la longevidad observada y las estimaciones de 0,711 ($p < 0,001$). En comparación, estos parámetros en ratones hembra alcanzaron una explicación de la varianza mucho más elevada (84,4%) (Martínez de Toda *et al.*, 2019c).

Según el modelo obtenido en la **Ecuación 6**, una mayor concentración de GSH y una menor concentración de GSSG, que indican una mayor capacidad antioxidante a la edad adulta (Kandar 2015), apuntaba a una mayor longevidad en los ratones macho, de manera similar a lo descrito en hembras (Martínez de Toda *et al.*, 2019c). Sin embargo, la actividad de ambas enzimas reguladoras del ciclo del glutatión (GPx y GR) presentaron una influencia negativa en la longevidad alcanzada. Esto contrasta con lo que ocurría para la actividad de la enzima GPx en el modelo redox obtenido para hembras, el cual aumentaba la longevidad estimada cuanto mayor fuera dicha actividad GPx (Martínez de Toda *et al.*, 2019c).

Particularmente sorprendente fue la contribución de los subproductos del estrés oxidativo, como los generados en la oxidación de lípidos, el MDA. Mientras que en hembras se observó que una mayor concentración de estos compuestos a la edad adulta (y, por tanto, un indicador de un mayor estado oxidativo) correspondía con una menor longevidad (Martínez de Toda *et al.*, 2019c), en ratones macho supuso el primer componente de la ecuación que relaciona de forma positiva este marcador con la longevidad. Esta alta concentración de MDA en individuos que finalmente alcanzan una longevidad extrema podría suponer un caso de antagonismo pleiotrópico y de hormesis, activando mecanismos compensatorios a largo plazo que ayuden a reducir o neutralizar el efecto de las ROS en el futuro (Pincemail *et al.*, 2014). Así, se puede observar en la **Figura 43** que, a pesar de poseer las concentraciones de MDA más elevadas a la edad adulta, los ratones que alcanzan la edad longeva presentan un descenso progresivo en este parámetro según avanza el envejecimiento, mientras que en los demás ratones el aumento en los niveles de MDA en la edad vieja parece no tener el mismo efecto compensatorio observado en la edad adulta.

Un efecto del dimorfismo sexual en este mismo parámetro ya fue observado en un estudio transversal en mujeres y hombres entre los 35 y los 79 años. En ese trabajo se detectó una correlación positiva entre la concentración de MDA en sangre y la edad en mujeres, pero no en hombres (Trevisan *et al.*, 2001).

Por otra parte, Stankovic y colaboradores demostraron en ratas que había una relación proporcional entre diferentes niveles de restricción calórica y el estrés oxidativo que esto causaba. Esto se correspondían con un aumento de la concentración de MDA también creciente. A partir de estos datos concluyeron que la restricción calórica moderada (aportando un 60-70% de la ingesta diaria media) causaba un estrés de carácter hormético, que propiciaría un aumento de la longevidad, acompañándose de incrementos

en las concentraciones de GSH y en la actividad de la enzima antioxidante SOD mitocondrial (Stankovic *et al.*, 2013). Precisamente este efecto hormético es el que puede estar causando el hecho de que los ratones con mayores concentraciones de MDA, observados en este estudio, sean los que presenten mayores longevidades.

2.3.4. Modelo Combinado

Los modelos previamente descritos (Bioquímico, Inmunitario y Redox) fueron generados empleando resultados de los ratones macho a la edad adulta del estudio longitudinal de esta tesis. Con el objetivo de saber si variables de distinto tipo eran capaces de predecir mejor la longevidad alcanzada que cualquiera de ellas por separado se generó el modelo “Combinado” introduciendo todos los parámetros recogidos en esta cohorte como variables independientes.

Así, se alcanzó un porcentaje de explicación en la varianza en la longevidad del 48,6%, frente al 14,5; 22,7 y 41,0% de los modelos Bioquímico, Inmunitario y Redox por separado, respectivamente.

Este modelo consideró que el nivel de colesterol a la edad adulta, a pesar de no presentar una correlación significativa con la edad de muerte de los ratones, suponía el parámetro que mejor se ajustaba a una línea recta respecto a la longevidad de los mismos. A partir de entonces, las variables introducidas en el modelo Combinado no se correspondieron necesariamente con la totalidad ni con el orden de las incluidas en los modelos previamente descritos, ya que la adición de diferentes variables altera la secuencia en que estas variables son seleccionadas.

Los presentes resultados obtenidos en ratones macho contrastan con los del estudio realizado previamente en nuestro laboratorio con hembras de esta cepa, también a la edad adulta. En las hembras, el modelo combinado utilizó parámetros inmunitarios, redox y conductuales, y alcanzó una explicación de la varianza del 92,4% incluyendo las variables

de locomoción interna en el tablero de agujeros (HB), tiempo en brazos abiertos del laberinto en cruz elevado (EPM), índice fagocítico y quimiotáctico de macrófagos, concentración de GSH y de MDA (Martínez de Toda *et al.*, 2019c).

Tanto el modelo de machos como el de hembras fueron generados con seis variables independientes y, sin embargo, alcanzaron porcentajes de explicación de varianza ampliamente diferentes empleando parámetros distintos (a excepción del índice fagocítico y la concentración de GSH). Esto probablemente sea debido a la elección inicial de variables en ambos modelos, que influyó las sucesivas selecciones de parámetros en el mismo, al no disponer de datos equivalentes en los dos sexos (en hembras no se disponía de parámetros bioquímicos y sí de conductuales, mientras que en los machos sucedió al revés, se disponía de los bioquímicos, pero no de los conductuales).

De forma generalizada, todos los modelos generados en machos han demostrado una peor explicación de la varianza en la longevidad observada que los calculados en hembras, incluso cuándo éstos últimos contaban con un número inferior de factores en sus fórmulas.

Una posible justificación a esta diferencia en la capacidad de predicción es la mayor prevalencia de conductas agresivas y de dominancia/subordinación demostradas en ratones macho en comparación con las hembras (Taylor *et al.*, 2000). La conducta de dominancia/agresividad que se había relacionado con una mayor ansiedad, mostrada en el EPM (Ferrari *et al.*, 1998), se ha descrito más recientemente como un factor determinante en la esperanza de vida y en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Así, el estrés que supone mantener una posición de alta agresividad recibida y sumisión se ha correlacionado con manifestaciones negativas en la salud de los ratones (Razzoli *et al.*, 2018). Además de un mayor riesgo a padecer lesiones ateroscleróticas, estos animales presentaron alteraciones en el funcionamiento de su sistema endocrino

(hiperglucemia, sobrepeso y síndrome metabólico), lo que puede, a su vez, afectar al sistema inmunitario y la longevidad (Hunsche *et al.*, 2019). Por ello, en el presente estudio, a pesar de minimizar en lo posible la agresividad entre los machos exponiéndolos únicamente a compañeros de camada, la convivencia durante todo el envejecimiento con otros ratones macho muy probablemente afecta a la supervivencia de los mismos de un modo no previsible.

Todo lo indicado implica que las predicciones tempranas en machos serán necesariamente menos precisas que en hembras. Por ejemplo, modelos generados en machos mediante inteligencia artificial y con un tamaño de muestra muy superior al utilizado en la presente tesis, alcanzaron en torno al 40% de explicación de la varianza. En esos modelos se utilizaron datos de subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8, concentración de hormonas y masa corporal (Swindell *et al.*, 2008). Más recientemente, también utilizando diferentes algoritmos de inteligencia artificial se obtuvieron modelos en ratones macho que, empleando variables de fragilidad, así como otras más cualitativas (como distensión abdominal, condición del pelaje o endurecimiento de la cola), permitían la predicción de la longevidad con un porcentaje de explicación de la varianza del 50,5-63,0%, (Schultz *et al.*, 2020).

Aunque de forma preliminar, los modelos matemáticos aportados en este trabajo tienen el potencial de servir como poderosas herramientas a la hora de la estimación de la longevidad de ratones macho de la cepa ICR-CD1 cuando aún están en la edad adulta y todos los sistemas del organismo del animal ya están completamente desarrollados. Asimismo, como ya anticiparon algunos autores (Gialluisi *et al.*, 2019), la combinación de parámetros provenientes de diferentes mediciones para la predicción de la edad biológica presentaba mejoras sobre la predicción con variables provenientes de un mismo

origen. De acuerdo con esa idea el modelo combinado obtenido en la presente tesis es el que ha resultado más efectivo para la predicción de la longevidad.

2.4. Diferencias conductuales entre machos y hembras

Como se ha comentado anteriormente, nuestro grupo había llevado a cabo un estudio individualizado en un grupo de ratones hembra adultas, en las que se analizaron, además de una serie de parámetros inmunitarios y de estado redox, toda una batería de pruebas conductuales, y se determinó la relación de los valores obtenidos en cada animal con su esperanza de vida (Martínez de Toda *et al.*, 2019c). En la presente tesis se ha estudiado cómo es la respuesta conductual en algunas de esas pruebas, y otras no analizadas en el trabajo previo, en ratones adultos de otra cohorte de ratones hembra, así como en una de machos. Se han utilizado las pruebas del laberinto en T, el tablero con agujeros (HB) y el laberinto en cruz elevado (EPM). Tanto el EPM, como el HB son dos de las pruebas más empleadas para evaluar el estado de ansiedad y las capacidades exploratorias en roedores, respectivamente (File & Day, 1972; Walf & Frye, 2007). Asimismo, el laberinto en T proporciona resultados rápidos acerca de la respuesta que presentan los ratones a ambientes novedosos a corto plazo y es el sistema que en nuestro laboratorio se utiliza para la clasificación de los ratones en PAM/ENPAM (Viveros *et al.*, 2001; Guayerbas *et al.*, 2002, 2004; Guayerbas & De la Fuente, 2003). Los resultados de los distintos parámetros analizados se han comparado entre ambos sexos y se han correlacionado con la longevidad que alcanza cada individuo.

A continuación, se comentarán las diferencias entre machos y hembras en las conductas observadas al realizar las diferentes pruebas, ya que es un hecho establecido el dimorfismo sexual en los sistemas reguladores y más concretamente en la conducta (Weinstein *et al.*, 1984; Keller *et al.*, 2001; Stefanski & Grüner, 2006).

2.4.1. Conductas exploratorias

En la exploración horizontal llevada a cabo en el tablero de agujeros (HB), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la deambulación total entre machos y hembras, lo que ya se había descrito previamente en esta misma cepa de ratones (Tanaka, 2015; Hunsche *et al.*, 2019). Sin embargo, cuando nos centramos en la deambulación por las casillas internas del tablero, sí encontramos que fue significativamente mayor en hembras que en machos. Diferencias en la exploración horizontal entre sexos han sido previamente detectadas, al igual que los hay entre diferentes cepas de ratones (Gioiosa *et al.*, 2007). El que las hembras deambulen más por el centro del tablero nos está indicando una emocionalidad y manera de responder a situaciones de estrés en este sexo, más que una diferencia exploratoria en sí, vista desde un contexto puramente físico. Esta mejor capacidad de respuesta a tales situaciones de estrés será ratificada al analizar otras pruebas conductuales, como se comentará más adelante.

Por otra parte, los machos realizaron significativamente más la exploración vertical que las hembras, medida tanto por el número como por la duración de “*rearings*” sin apoyar las patas delanteras en alguna de las paredes (Lever *et al.*, 2006). Esto concuerda con lo observado en otras cepas de ratones (An *et al.*, 2011; Tanaka, 2015; Sturman *et al.*, 2018).

Dado que la postura necesaria para erguirse sobre las patas traseras requiere de mayor vigor y coordinación neuromuscular, hechos en los que generalmente sobresalen los machos (Viveros *et al.*, 2001; Garrido, 2018), la mayor prevalencia de conductas de exploración vertical en machos podría indicar que ninguno de los sexos tiene mayor voluntad para la exploración, sino que cada uno la realiza más acorde a sus posibilidades. Así, las hembras realizarían mayor exploración horizontal, mientras que los machos

podrían dedicar más tiempo y esfuerzos a la exploración vertical. Sin embargo, estos resultados contrastan con los de otros estudios en los que se observaron valores similares en *rearings*, *groomings* y deambulaci3n en el HB en ambos sexos (Teixeira *et al.*, 2004). Es posible que una de las razones de la ausencia de diferencias entre machos y hembras en esas conductas se deba a que estos estudios fueron realizados en ratones mucho m1s j3venes (3 meses) que los empleados en la presente tesis. Esa diferencia de edad podr3a permitir visualizar el mayor vigor muscular que requiere la exploraci3n vertical y que mantienen en mayor medida los machos frente a las hembras.

2.4.2. Conductas de ansiedad

Las conductas reconocidas tradicionalmente como indicativas de estado de ansiedad son un mayor porcentaje de deambulaci3n externa en el HB (Kassed & Herkenham, 2004), un mayor n3mero de *groomings* (D’Amato & Pavone, 1992; Moyaho & Valencia, 2002; Kalueff & Tuohimaa, 2005), una mayor actividad de *rearings* con apoyo (Lever *et al.*, 2006), un mayor tiempo en cruzar la intersecci3n del laberinto en T (Viveros *et al.*, 2001) y un mayor tiempo de permanencia en los BA del EPM (Walf & Frye, 2007).

En los experimentos realizados en esta tesis, no se detectaron diferencias estad3sticamente significativas, entre machos y hembras, en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (BA) o cerrados (BC) del EPM, ni en el n3mero de entradas a los mismos. A este respecto se han publicado resultados similares en otros estudios empleando ratones de ambos sexos y de la misma cepa y edad (Hunsche *et al.*, 2019). Sin embargo, tambi3n existen trabajos donde machos y hembras presentaron diferencias significativas en las permanencias en los diferentes brazos del EPM, as3 como en el porcentaje de entradas a los mismos (Frick *et al.*, 2000; Viveros *et al.*, 2001; Caldarone *et al.*, 2008; Garrido, 2018). Es por ello que resulte m1s eficiente analizar respuestas

conductuales indicativas de ansiedad en diferentes contextos, para poder determinar más claramente si un grupo de animales presenta mayores estados de ansiedad. Un hecho destacable, observado en la presente tesis, son las diferencias detectadas en el tiempo que permanecía cada sexo en la plataforma central (PC) del EPM, mostrando los ratones macho un tiempo significativamente mayor. Aunque esa PC tiene sólo presencia parcial de paredes, el rápido acceso a los BC del laberinto, convierte a la PC en un espacio “protegido” (Rodgers & Johnson, 1995). Por tanto se considera al tiempo transcurrido en la PC como un indicador de capacidad de espera y toma de decisiones en experimentos realizados en ratas, y permite detectar los niveles de ansiedad basal que presenten los animales (Cruz *et al.*, 1994; Clément *et al.*, 2007; Casarrubea *et al.*, 2015). En este sentido, los machos de esta tesis mostraron necesitar un mayor tiempo de toma de decisiones que las hembras.

Respecto a la deambulación porcentual en el HB, los ratones macho realizaron una menor proporción de la locomoción total en las regiones internas del tablero, comparada con la realizada por las hembras. Estos resultados concuerdan con los publicados anteriormente también en ratones adultos (Garrido, 2018). Esa menor deambulación interna en los machos, asociada a una mayor deambulación externa, en comparación con las hembras, como se ha indicado anteriormente, se relaciona con un estado de mayor ansiedad (Kassed & Herkenham, 2004).

El tiempo de *rearings* con apoyo fue también mayor en los machos, al igual que el tiempo necesario para cruzar la intersección del laberinto en T. Estos resultados apoyan la idea de que, en general los machos mostraron mayor ansiedad que las hembras (Viveros *et al.*, 2001; Lever *et al.*, 2006). Sin embargo, deberían hacerse más pruebas para llegar a confirmar esta idea. Una limitación del presente trabajo es que al ser un estudio longitudinal en el que se mantenían los animales hasta su muerte natural, no se han podido

analizar hormonas de estrés en sangre. De hecho, en otros estudios se han observado diferencias en las cantidades de hormonas asociadas al estrés, como la corticosterona, entre sexos, en ratas y ratones, con mayor cantidad de esa hormona en condiciones basales en las hembras, pero con una menor capacidad de respuesta en los machos (Stefanski & Grüner, 2006; Goel *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2020).

Cuando se considera la duración total de posturas de *grooming*, así como el número de las mismas, se encontraron valores inferiores en los machos que en las hembras, lo que parecería implicar, en principio, una menor ansiedad en los ratones macho (D'Amato & Pavone, 1992; Moyaho & Valencia, 2002; Kalueff & Tuohimaa, 2005). No obstante, este parámetro, dependiendo del contexto puede ser indicativo o no de ansiedad, pues algunos autores consideran un mayor número de *groomings* como una buena estrategia de consecución de estado de estrés (Zhan *et al.*, 2015; Sturman *et al.*, 2018; Amodeo *et al.*, 2019). En trabajos previos de nuestro laboratorio no se obtuvieron diferencias en los *groomings* realizados entre machos y hembras (Hunsche *et al.*, 2019). No obstante, los resultados de otros estudios llevados a cabo en ratones de ambos sexos y de la misma cepa y edades equivalentes, concordaron con los de la presente tesis al obtener un número y duración de *groomings* menor en los machos, así como mayor número y duración de *rearings* realizados por este sexo (Viveros *et al.*, 2001; Garrido, 2018).

Sin embargo, la comparación del estado de ansiedad de diferentes sexos presenta complicaciones. Algunos estudios han mostrado que la realización por parte de machos o de hembras, de conductas tanto exploratorias, como de *grooming* o de *rearing* en la cepa ICR-CD1, presenta diferencias significativas entre los dos sexos, incluso aunque no se encuentren en el estado de ansiedad (Zhan *et al.*, 2015; Sturman *et al.*, 2018; Amodeo *et al.*, 2019).

A pesar de controversias y dificultades, parece evidente que los machos muestran en la edad adulta una serie de conductas indicativas de un mayor estado de ansiedad que las hembras.

2.5. Estudio de la capacidad predictiva basada en variables conductuales en ratones macho y comparación con datos equivalentes obtenidos en hembras.

Independientemente de las diferencias que presentaban machos y hembras en sus parámetros conductuales a la edad adulta, las variables que correlacionaron de manera significativa con la longevidad que alcanzaron los animales fue relativamente similar en una serie de aspectos en ambos sexos. Esto podría explicar que en los grupos de machos y hembras, analizados en la presente tesis, no se observaran diferencias significativas en la longevidad media, algo no coincidente con otros estudios, en los que los machos presentaban una menor esperanza de vida que las hembras (Guayerbas, 2003; De la Fuente *et al.*, 2004a; Borrás *et al.*, 2007).

En hembras, las variables exploratorias que resultaron significativamente predictivas fueron la deambulación total y la deambulación interna en valor absoluto, ambas de manera positiva. Mientras que en machos la deambulación total no correlaciona significativamente con la longevidad, sí lo hace y de forma positiva también, la deambulación en zonas internas del tablero. Igualmente, en el modelo previamente publicado para ratones hembra, una mayor deambulación interna a la edad adulta pronosticaba una mayor longevidad (Martínez de Toda *et al.*, 2019c). En otros estudios se comprobó que los animales de mayor longevidad, tanto machos como hembras, mostraban más deambulación total e interna (Viveros *et al.*, 2001; Cruces, 2018).

Por otro lado, respecto a la conducta de ansiedad medida en el EPM, curiosamente, el parámetro que se emplea tradicionalmente para evaluar esa conducta (el tiempo

transcurrido en BA) correlacionó fuertemente con la longevidad, pero sólo en hembras. En cambio, en ambos sexos se alcanzó una correlación negativa significativa entre la longevidad y el tiempo transcurrido en BC. En el caso únicamente de machos el tiempo transcurrido en la PC también correlaciona con la esperanza de vida. Esto indica que, mientras que en hembras la ansiedad en estado basal, medida como tiempo transcurrido en BA o BC del EPM a la edad adulta, son relevantes a la hora de correlacionar con la longevidad que mostrarán estos ratones, en el caso de ratones macho, dichos parámetros de ansiedad resultan ser pobres estimadores de la longevidad, medidos a la edad adulta. Es posible que eventos que tengan lugar a más avanzada edad sean más determinantes a la hora de afectar a la longevidad que presenten los ratones macho. Además, el hecho de que el tiempo transcurrido en la PC correlacione con la longevidad de los ratones macho, mientras que los tiempos en BA no, podría estar indicando que el estado basal de ansiedad no es el determinante principal de la longevidad en machos, sino que una mejor capacidad de espera y toma de decisiones puede ser de mayor importancia para desarrollar una alta longevidad en este sexo.

Otros autores mostraron también una conexión entre ansiedad y longevidad al observar que, tratando de manera crónica a ratones con rapamicina (un compuesto que aumenta la longevidad en ratones), tanto machos como hembras veían disminuida su ansiedad medida como tiempo que permanecían en BC del EPM (Halloran *et al.*, 2012). Los ratones adultos con obesidad inducida por dieta, los cuales tenían una menor longevidad respecto a sus controles, también mostraba, tanto machos como hembras, una mayor ansiedad, medida como un menor tiempo de permanencia de BA y mayor en BC del EPM (Hunsche *et al.*, 2019). En PAM, tanto en machos como en hembras, se observó un menor tiempo en los BA del EPM en comparación con los NPAM (Viveros *et al.*, 2001). Por su parte, las PAM hembras pasaron más tiempo en los BC, no mostrando

diferencias en el tiempo en la PC (Garrido, 2018). Dada la menor longevidad que tienen los PAM en comparación con los NPAM, esos resultados confirman que el tiempo en BA y en BC están relacionados con una mayor y menor longevidad, respectivamente. Por su parte, en hembras el tiempo transcurrido en la PC no parecía guardar relación con la longevidad (Garrido, 2018).

Asimismo, el tiempo necesario para atravesar la intersección del laberinto en T, parámetro empleado para diferenciar a ratones prematuramente envejecidos (PAM) de los que no lo están (NPAM), no mostró una correlación con la longevidad de los animales estudiados. Esto es probablemente debido a que la condición de ratón prematuramente envejecido (PAM) se determina con cuatro mediciones consecutivas de este tiempo necesario para llegar a la intersección del laberinto en T (Guayerbas *et al.*, 2002), mientras que en esta tesis únicamente se realizó una medida inicial de este tiempo en el laberinto, por lo que su valor como predictor del estado de envejecimiento en el que se encuentra un ratón concreto sería orientativo. Adicionalmente, el número y el tiempo en posición de *grooming* estuvieron correlacionados significativa y negativamente con la longevidad en machos, es decir, los machos que más se acicalaban correlacionaban con una menor esperanza de vida. Sin embargo, en hembras no se observó ninguna correlación en este aspecto. Anteriores estudios describieron un mayor número y duración de *groomings* en ratones obesos de ambos sexos, así como en hembras prematuramente envejecidas, que presentaron una menor esperanza de vida, indicando una posible relación entre ambos parámetros con la longevidad en hembras (Cruces, 2018; Garrido, 2018; Hunsche *et al.*, 2019).

En resumen, las funciones exploratorias de deambulación total e interna en el HB correlacionan con la longevidad en hembras, pero únicamente la deambulación interna en machos, siendo una mayor exploración horizontal a la edad adulta indicativo de una

mayor longevidad. A pesar de observarse una correlación positiva entre la deambulación total y la longevidad de los ratones macho, es posible que, al emplear más tiempo que las hembras en la exploración vertical, no se pueda alcanzar la significación considerando únicamente la exploración horizontal.

En cuanto a medidas de ansiedad en el EPM, un mayor tiempo de permanencia en BA y menor número de entradas en BC correlacionó con una mayor longevidad en hembras, pero no en machos. Un mayor tiempo de permanencia en la PC, sólo en machos, y un menor tiempo de permanencia en BC en ambos sexos correlacionaban con una mayor longevidad. Esto indica que, mientras que en hembras la ansiedad en estado basal, medida como tiempo transcurrido en BA o BC del EPM a la edad adulta, es relevante a la hora de estimar su longevidad, en el caso de ratones macho, dichos parámetros de ansiedad valorados en la edad adulta, resulten ser pobres estimadores de la esperanza de vida en este sexo. Es posible que el análisis de estas respuestas conductuales a una edad más avanzada, sean más determinantes a la hora de afectar a la longevidad que presenten estos ratones macho. Además, el hecho de que el tiempo transcurrido en la PC sea el parámetro que correlacione con la longevidad y no los tiempos en BA o BC, podría estar indicando que el estado basal de ansiedad no es el determinante principal para determinar la esperanza de vida en el caso de los machos, lo sería una mejor capacidad de espera y toma de decisiones.

Por otro lado, ninguna medida de ansiedad en el HB correlacionó con la longevidad en ratones hembra, pero sí un menor porcentaje de deambulación externa y el número y duración de los grooming, correlacionaron con una mayor longevidad en los machos.

En resumen, a pesar de que los ratones macho muestran en general un mayor número de conductas relacionadas con la ansiedad en esta tesis (menor deambulación interna en el HB, mayor tiempo en cruzar la intersección del laberinto en T o mayor

duración de *rearings* con apoyo), y que anteriormente se habían relacionado estas conductas de ansiedad con una menor longevidad en ratones hembra (Viveros *et al.*, 2001; Martínez de Toda *et al.*, 2019c), la ansiedad a la edad adulta parece no ser el determinante mayoritario de la longevidad en los ratones macho empleados. Por tanto, se podría indicar que en este sexo la ansiedad afecta a la longevidad en menor medida y la misma puede depender más de otros factores conductuales no contemplados por las pruebas realizadas a la edad adulta en la presente tesis.

Se puede concluir este apartado indicando que, en la edad adulta, la deambulación interna en el tablero de agujeros y el tiempo en brazos cerrados del laberinto en cruz elevado, correlacionan de forma positiva y negativa, respectivamente con la longevidad en machos y hembras. No obstante, el tiempo en la plataforma central del laberinto en cruz elevado y los acicalamientos o *groomings*, lo hacen sólo en los machos.

2.5.1. Construcción del modelo matemático conductual

Por todo lo expuesto, y ya que los sistemas homeostáticos presentan un claro dimorfismo sexual que posiblemente explique las diferencias en longevidad media observadas en multitud de mamíferos, se quiso comprobar si el modelo matemático conductual generado en hembras (Martínez de Toda *et al.*, 2019c) era adecuado para la predicción de la longevidad en ratones macho. Esta fórmula del modelo conductual, aunque correlacionaba significativamente entre los valores estimados y los observados para la longevidad en machos, se consideró subóptimo. Por ello, se estimó necesario determinar un modelo para machos. Así, se construyó un nuevo modelo mediante los parámetros observados en la conducta de estos ratones macho a la edad adulta. Este nuevo modelo, que incluye el tiempo en la plataforma central (PC) del EPM, la locomoción interna, el número de *groomings* y el número y la duración total de *head-dippings* en el HB, produjo una correlación mucho más ajustada, con una significación

considerablemente mejor (coeficiente de correlación de *Pearson* de 0,820 y significación de $p < 0,001$).

Todas estas variables están relacionadas con conductas de tipo ansiedad, confirmando que mayor ansiedad en la edad adulta en los machos correlaciona con una peor esperanza de vida, de la misma manera que ocurría en hembras. Las respuestas de tipo ansiedad son también las que se estimaron como más predictoras en modelos previos en ratones hembra y macho de cepas diferentes (Fahlström *et al.*, 2012; Martínez de Toda *et al.*, 2019c) o también en ratas (Cavigelli & McClintock, 2003; Ohta *et al.*, 2016). Esto es entendible dada la estrecha relación entre el estado de ansiedad de un individuo, su mayor estrés oxidativo y la consecuente mayor edad biológica (De la Fuente, 2018a).

El primer parámetro en ser considerado por el método de regresión lineal múltiple fue el que mejor correlacionaba con la longevidad alcanzada por los ratones, es decir, el tiempo transcurrido en la PC. La segunda variable considerada en la fórmula fue la deambulación interna en forma porcentual en el HB, que también mostraba una correlación significativa en el mismo sentido, es decir, a mayor proporción de deambulación por regiones internas del HB (menor ansiedad), mayor era la longevidad estimada para el ratón.

Como ya se indicó hace años, los roedores presentan tendencia exploratoria y visitarán los agujeros del tablero de forma natural (Ohl *et al.*, 2003). Esta conducta de explorar los agujeros (*head-dipping*) se considera un indicador de exploración dirigida, pero también de estado de ansiedad, ya que se han observado cambios en el número y tiempo que permanecen los ratones explorando estos agujeros de manera dosis-dependiente con compuestos ansiolíticos y ansiogénicos (Takeda *et al.*, 1998). Así, la tercera variable estimaba que mayor frecuencia en los *head-dippings* realizados predecía una menor longevidad, mientras que la quinta variable parecía contradecir esto, ya que la

duración de las exploraciones afectaba positivamente a la longevidad en la fórmula obtenida. Esta aparente discrepancia podría reflejar que la realización de vistazos cortos, pero frecuentes supone una actividad exploratoria poco saludable, característica de un sistema nervioso disfuncional y que podría ser el causante de la menor longevidad observada en estos ratones.

Un estudio anterior apuntaba en la misma dirección al tratar a ratones con resveratrol, uno de los fármacos más empleados para la extensión de la esperanza de vida (Sinclair, 2005). Los ratones tratados presentaron un menor número de *head-dippings* comparados con controles de la misma cepa de ratones que la empleada en la presente tesis (Magaji *et al.*, 2017). De modo que un menor número de estas conductas corresponde a un aumento de la longevidad. Sin embargo, debido a que tratamientos farmacológicos, como el resveratrol, pueden presentar efectos pleiotrópicos y que no se pudieron validar los modelos con cohortes independientes de ratones, no se puede llegar a una conclusión definitiva acerca de la relación que guardan los *head-dippings* con la longevidad de un individuo.

Respecto a la última variable del modelo generado, el número de *groomings* realizados en el HB, ésta afectó de manera negativa en la fórmula a la longevidad estimada. Así, este parámetro que se ha relacionado con mayor ansiedad (Kalueff & Tuohimaa, 2005), correlacionó de forma negativa con la esperanza de vida. De nuevo, una mayor ansiedad, que puede relacionarse con un mayor número de *groomings*, sería indicativo de un envejecimiento más acelerado.

Comparado con el modelo generado en hembras, en las que se obtuvo un 79,8% de explicación de la varianza en la longevidad con únicamente dos variables (Martínez de Toda *et al.*, 2019c), el modelo de machos requirió de un mayor número de

parámetros, concretamente 5 variables, y alcanzó una explicación de la varianza inferior (63,6%).

Actualmente, existen diferentes modelos que permiten la estimación de la longevidad de ratones, pero la mayoría de ellos se han realizados en cepas consanguíneas, que tienden a presentar valores fenotípicos más homogéneos en los parámetros estudiados respecto a las no consanguíneas (Phelan, 1992), limitando así la aplicabilidad de dichos modelos a otras cepas de ratones. Además, como ya se recalcó anteriormente, predicciones tardías y más cercanas a la fecha de muerte real del ratón serán necesariamente más precisas, por ello, la mayoría de estos modelos han sido desarrollados en individuos viejos o a punto de morir (Ray *et al.*, 2010; Fahlström *et al.*, 2012; Schultz *et al.*, 2020). Y, por último, algunos estudios habían comprobado que es posible obtener conclusiones sobre el impacto que tiene un tratamiento sobre la longevidad a los 2 años de vida de los ratones, aumentando el tamaño de la muestra 3,5 veces aproximadamente, sin necesidad de esperar a la muerte de toda la población (Robertson *et al.*, 2011). Los modelos matemáticos descritos en la presente tesis doctoral permiten la evaluación del efecto de un tratamiento sobre la longevidad de ratones sin necesidad de recurrir a ese incremento en el tamaño de la muestra.

3. Estudio de parámetros citogenéticos “inserciones de ADNmt en el núcleo” y “frecuencia de MNs/NPBs” en linfocitos T peritoneales de ratones hembra de la cepa ICR-CD1 como posibles nuevos marcadores de edad biológica

Los resultados correspondientes al objetivo 3, en el que se estudia la utilidad de marcadores genéticos para la estimación del avance del envejecimiento, se discuten a continuación.

Una importante cantidad de las ROS son generadas como subproducto de la respiración celular en la mitocondria que, además de causantes de daño oxidativo a biomoléculas, son necesarias para muchos procesos fisiológicos (Allen & Tresini, 2000). Para evitar este daño que ejercerían las ROS, se establece un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, cuya pérdida genera un estado de estrés oxidativo, que es el causante de numerosas enfermedades y del deterioro experimentado con el envejecimiento (De la Fuente & Miquel, 2009).

El ADNmt se considera especialmente vulnerable al daño oxidativo de las ROS, ya que se encuentra muy próximo al lugar donde se originan, carece de intrones y su sistema de reparación es menos eficiente que el del ADNn (Ames *et al.*, 1993). Esta oxidación causa roturas que originan fragmentos de ADNmt que salen de la mitocondria y se insertan en el núcleo. Esta acumulación de fragmentos mitocondriales en el genoma nuclear es dependiente de la edad, viéndose incrementada en los individuos más envejecidos (Richter, 1988; Caro *et al.*, 2010; Martínez-Cisuelo *et al.*, 2016).

El sistema inmunitario es particularmente sensible al estrés oxidativo, debido a que es productor de compuestos oxidativos e inflamatorios como parte de su funcionamiento normal (Vida *et al.*, 2014). De hecho, diferentes tratamientos han demostrado que mejoras

en la función inmunitaria y en el balance redox se acompañan de aumentos en la longevidad (Alonso-Fernandez & De la Fuente, 2012; De la Fuente, 2018a).

Por esta razón, en esta tesis analizó la presencia de fragmentos de ADNmt en genoma nuclear, midiendo la frecuencia relativa de estas inserciones en linfocitos T. Para ello, se eligió un fragmento mitocondrial de 1841pb (1841 MT) observado previamente por Patrushev y colaboradores en el citoplasma de ratones irradiados (Patrushev *et al.*, 2006). A su vez, estudios previos en distintos tipos celulares tanto animales como vegetales describen la presencia de estas inserciones preferentemente en las regiones (peri)centroméricas (Michalovova *et al.*, 2013), si bien las repercusiones que pudieran tener sobre la función centromérica están aún sin dilucidar. Para estudiar si dichas inserciones pueden comprometer la correcta segregación cromosómica durante las divisiones celulares, llevando a la pérdida de cromosomas en forma de micronúcleos, se utilizó el test de MNs o CBMN assay (Fenech & Morley, 1985).

Además de lo anterior, se ha investigado en un análisis longitudinal si las inserciones de fragmentos de ADNmt en el genoma nuclear y/o la frecuencia de MNs o el marcador de daño al ADN (frecuencia de puentes nucleoplásmicos, NPBs) pueden ser considerados marcadores de edad biológica en linfocitos T peritoneales de ratón.

3.1. Inserción de fragmentos de ADNmt en el ADNn (NUMTs)

La Teoría Mitocondrial del envejecimiento identifica a las mitocondrias tanto como el orgánulo origen (lugar donde se generan las ROS), como el orgánulo diana (los daños de las ROS en la mitocondria llevan a una deficiencia energética) (Harman, 1972). Sin embargo, debido a que cada célula cuenta con numerosas mitocondrias y cada una de ellas con múltiples copias de ADNmt, no se ha descrito un porcentaje alto de células con ADNmt mutado/delecionado en individuos ancianos (Brierley *et al.*, 1998). Este hecho plantea dificultades a la hora de relacionar de manera causal el daño en el ADNmt con el

envejecimiento en términos de deficiencia energética y ha supuesto un freno en la Teoría Mitocondrial del Envejecimiento. Los resultados de estudios más recientes demuestran un incremento de secuencias mitocondriales en el núcleo relacionadas con la edad (Caro *et al.*, 2010; Cheng & Ivessa, 2012; Martínez-Cisuelo *et al.*, 2016) y proponen un cambio de paradigma basado en un nuevo mecanismo molecular. En éste, las mitocondrias siguen siendo el origen del problema, pero dejan de ser el orgánulo diana para pasar a serlo el núcleo, donde se encuentran el 99% de los genes.

La inserción en el núcleo de fragmentos mitocondriales y la inestabilidad genómica a la que dan lugar queda recogida en la propuesta que sobre la dinámica de inserciones hacen Michalovova y colaboradores (2013) (**Figura 75**). Los fragmentos de ADNmt que habrían migrado hasta el núcleo se insertan en las proximidades de los centrómeros, al ser entornos más estables con menor densidad génica, por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (*NHEJ*) (Matsuo *et al.*, 2005; Michalovova *et al.*, 2013). A su vez, en especies con mayor dinamismo de elementos transponibles (*TEs*), se produciría la rotura de estas secuencias y movilización a otras regiones del genoma, explicándose así que las secuencias más largas dentro del ADNn sean las evolutivamente “más jóvenes”, conservando también una mayor identidad con las secuencias que se observan en el genoma mitocondrial. Asimismo, estos fragmentos podrían ser expulsados del genoma nuclear por recombinación ectópica de secuencias repetitivas de las proximidades (Michalovova *et al.*, 2013).

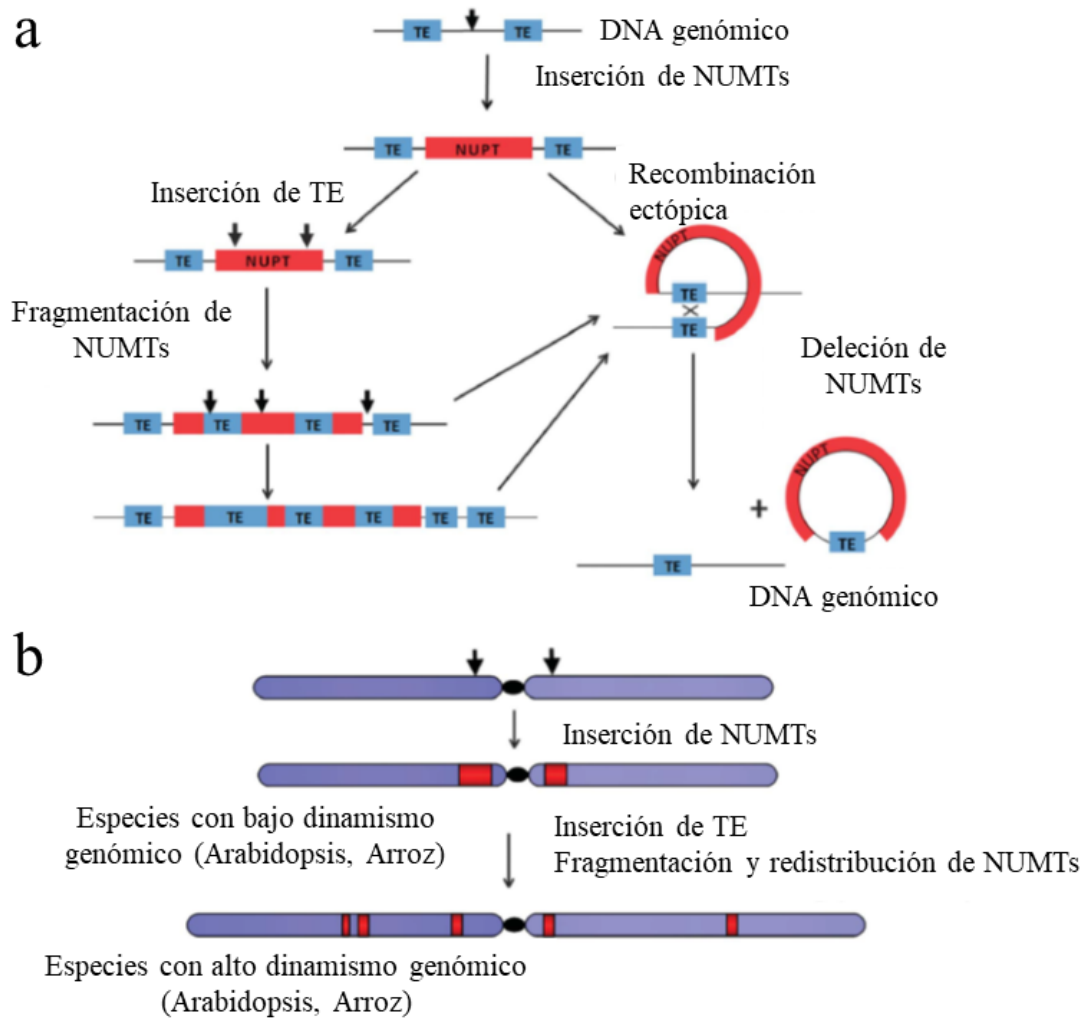


Figura 75. Modelo de la dinámica de inserción y redistribución de NUMTs y TEs. (a) La inserción de elementos transponibles (TEs) causa la fragmentación del ADN nuclear mitocondrial (NUMTs). Las mutaciones que se acumulan en los NUMTs más antiguos llevan a la divergencia entre las secuencias de los de NUMTs y ADNmt. La recombinación ectópica entre TEs provoca la eliminación de las secuencias intermedias. (b) La inserción de TEs y el alto dinamismo genómico lleva a la fragmentación y redistribución de los NUMTs. (Figura modificada de Michalovova et al., 2013)

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran la presencia de fragmentos de ADNmt no descritos previamente en el genoma nuclear de linfocitos T de ratón. Mediante FISH hemos comprobado que existe un aumento de la secuencia mitocondrial 1841MT en el núcleo entre las edades adulta (40 semanas), madura (56 semanas) y vieja (72 semanas). Esta evidencia está en consonancia con los resultados de los trabajos

anteriormente mencionados y abre una nueva vía de estudio acerca de las bases moleculares que subyacen a la inmunosenescencia.

El fragmento mitocondrial 1841MT se encuentra localizado en las regiones pericentroméricas de los 40 cromosomas de los ratones hembra analizados. Distintos trabajos describen la presencia de ADN proveniente de orgánulos (mitocondrias y/o cloroplastos) en las inmediaciones de los centrómeros (Matsuo *et al.*, 2005; Caro *et al.*, 2010; Martínez-Cisuelo *et al.*, 2016). En ratón, estas regiones están constituidas por las secuencias satélite *minor satellite* (MiSat) y *major satellite* (MaSat) que ocupan distintos dominios cromosómicos (Garagna *et al.*, 2002). Las regiones (peri)centroméricas son regiones heterocromáticas, transcripcionalmente inactivas, que juegan un papel muy importante en la división celular. Las regiones MaSat permiten que varios centrómeros se encuentren próximos gracias a la asociación con la proteína de heterocromatina 1- α (HP1), contribuyendo a la arquitectura nuclear. Por su parte, las regiones MiSat constituyen unidades asociadas con proteínas centroméricas (CENPs), siendo el lugar donde se constituye el cinetocoro y donde tiene lugar la interacción con los microtúbulos del huso, mientras que la región pericentromérica MaSat mantiene la cohesión entre cromátidas hermanas dentro del mismo cromosoma. La función de cada una de las regiones es muy importante en los procesos de cohesión y disociación que se dan en los centrómeros durante la segregación cromosómica en el proceso de división celular (Guenatri *et al.*, 2004).

En esta tesis profundizamos en el estudio de la localización de la secuencia 1841 MT en relación con las secuencias centroméricas Mi y MaSat, encontrando que estas inserciones se dan en las regiones pericentroméricas ocupadas por la secuencia MaSat, si bien la repercusión que pueden tener sobre la segregación de los cromosomas y la división celular está aún por dilucidar.

3.2. Frecuencia de micronúcleos (MNs)

El test de micronúcleos o CBMN assay desarrollado por Fenech y Morley (1985) nos ha permitido analizar marcadores de inestabilidad cromosómica, como la pérdida cromosómica en forma de micronúcleos (MNs), así como de daño al ADN (frecuencia de puentes nucleoplásmicos, NPBs) durante la mitosis de linfocitos T con citocinesis inhibida. La cuantificación de los MNs presentes en las células binucleadas (BN) generadas pertenecientes a los tres grupos de edad analizados mostró un aumento significativo asociado a la edad. En cambio, no se observaron variaciones en el número de MNs por célula. Tampoco se encontraron diferencias significativas relacionadas con la edad en cuanto a la frecuencia de puentes nucleoplásmicos. Estos puentes son el resultado de fusiones teloméricas que se dan entre los cromosomas para reparar roturas, generando cromosomas dicéntricos que se evidencian durante las anafases mitóticas. Los NPBs son, por tanto, indicadores de eventos clastogénicos ocurridos durante el envejecimiento.

Para averiguar si los MNs observados contenían fragmentos acéntricos (y por tanto presentaban un origen clastogénico) o, por el contrario, estaban constituidos por cromátidas o cromosomas completos (revelando un origen aneugénico), realizamos una FISH con sondas específicas de centrómero de ratón en células binucleadas con MN. Los resultados demostraron la presencia de señal centromérica en el 97,1% de los MNs analizados. Este resultado indica que casi la totalidad de los MNs que se observan en los ratones analizados están provocados por fallos en la segregación cromosómica que llevan a la pérdida de cromosomas o cromátidas completos, originando células aneuploides (hiper- o hipoploides). Este hecho está en consonancia con lo descrito en la bibliografía acerca del aumento de la frecuencia de aneuploidia y su relación con el envejecimiento (Catalan *et al.*, 2000; Cottliar & Slavutsky, 2001).

La formación de MN relacionada con la edad se ha descrito previamente en la especie humana, siendo los cromosomas sexuales más propensos a perderse en forma de MN (Norppa & Falck, 2003). Curiosamente, la formación de MNs se ha propuesto como un mecanismo para corregir hiperploidías, eliminando cromosomas que se encuentran en exceso, devolviendo a la célula a su estado euploide (Jones *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2019).

Con el avance del envejecimiento, la frecuencia de MNs se ha visto aumentada en linfocitos de sangre periférica tanto en hombres como en mujeres, con una sobrerrepresentación en la pérdida de los cromosomas sexuales (Catalan *et al.*, 1995; Norppa & Falck, 2003). Esta correlación positiva, sin embargo, sólo es significativa en los hombres hasta los 50-70 años, mientras que en las mujeres se observa una correlación negativa con la edad a partir de los 70 años (Wojda *et al.*, 2007; Orta & Günebakan, 2012).

A su vez, en enfermedades asociadas al envejecimiento, como en las enfermedades neurodegenerativas Alzheimer y Parkinson, se detecta una mayor frecuencia de MNs comparados con voluntarios sanos de la misma edad cronológica (Petrozzi *et al.*, 2002; Migliore *et al.*, 2002, 2011).

El test de MN también permite estimar la frecuencia de células que presentan signos citológicos compatibles con el proceso de apoptosis. En esta tesis, sólo se cuantificaron aquellos linfocitos que presentaban cuerpos apoptóticos en células con membrana plasmática intacta, signos de un estadio tardío de apoptosis. La frecuencia de células en apoptosis observada mostró un aumento significativo en la edad vieja. Algunos trabajos descritos en la bibliografía demuestran que la presencia de MNs puede señalar la muerte por apoptosis de la célula (Hintzsche *et al.*, 2017). No obstante, consideramos que el aumento de la frecuencia de apoptosis en linfocitos T asociada al envejecimiento que se

observa en los individuos analizados debe analizarse de forma más exhaustiva utilizando técnicas específicas.

A partir de los experimentos realizados en la presente tesis, no es posible determinar las repercusiones que presenta esta inserción de fragmentos sobre la funcionalidad de las poblaciones celulares estudiadas. Sin embargo, los resultados permiten proponer un nuevo mecanismo subyacente al proceso de inmunosenescencia en el que las inserciones de ADNmt en el genoma nuclear durante el envejecimiento y la inestabilidad genómica que provocan podrían ser responsables, mediante errores en la segregación cromosómica, de la generación de células aneuploides que, al ser eliminadas por apoptosis, afectarían a la tasa de linfoproliferación. La disminución en la proliferación es un rasgo de inmunosenescencia ampliamente descrito en la bibliografía y observado en nuestro laboratorio en trabajos previos (De la Fuente, 2014a; Martínez de Toda *et al.*, 2016; Hunsche *et al.*, 2019).

Por todo esto, los parámetros estudiados en este apartado de nuevos marcadores (inserciones de ADNmt en el ADNn y frecuencia de MNs) cumplen las condiciones necesarias para ser candidatos a biomarcadores de envejecimiento (Torres Courchoud & Pérez Calvo, 2016). Sin embargo, se requieren futuros experimentos con diversos tratamientos de probada eficacia sobre el proceso de envejecimiento para ser considerados marcadores de edad biológica. Asimismo, futuras investigaciones son necesarias para determinar si existe una relación causa-efecto que explique la correlación observada entre NUMTs y MNs.

4. Función inmunitaria y estado oxidativo de células de sangre periférica humana en pacientes mayores con enfermedad de Parkinson en fase temprana (fase II)

Aunque los aspectos relacionados con la inmunidad, que se han estudiado principalmente en pacientes con enfermedad de Parkinson (EP) han sido los focalizados en las células de microglía y en astrocitos, las cuales pueden ser consideradas células inmunitarias residentes del sistema nervioso central (SNC), cada vez se considera la alteración del funcionamiento del sistema inmunitario periférico como un factor característico de esta enfermedad (Costantini *et al.*, 2018; Mackie *et al.*, 2018). La mayoría de estos estudios trata con etapas moderadas y avanzadas de la EP, debido a la dificultad de un diagnóstico en fases tempranas, y se han reportado numerosos resultados contradictorios. Algunos autores señalan una hiperactivación de la función inmunitaria, mientras que otros detectan un deterioro inmunitario generalizado en la EP en comparación con individuos sanos de la misma edad cronológica (Bessler *et al.*, 1999; Reale *et al.*, 2009; Grozdanov *et al.*, 2014; Joshi & Singh, 2018).

Según los resultados obtenidos en esta tesis y como es característico en el envejecimiento, tanto los pacientes con EPII como los controles sanos de la misma edad mostraron la inmunosenescencia típica en comparación con los individuos adultos. Así, presentaron menor quimiotaxis, fagocitosis, actividad NK y linfoproliferación en respuesta a mitógenos y mayor adherencia y linfoproliferación basal (De la Fuente & Miquel, 2009; Martínez de Toda *et al.*, 2016, 2017; De la Fuente, 2020).

4.1. Inmunidad innata

A pesar de ser las células de la inmunidad innata (como los fagocitos y las NK) las que producen una mayor cantidad de estrés oxidativo al envejecer, dada su gran necesidad de generar ROS para llevar a cabo su función, siendo muy sensibles al daño oxidativo

(De la Fuente & Miquel, 2009; Vida *et al.*, 2017), los leucocitos de sangre periférica de pacientes EPII no presentaron diferencias estadísticamente significativas en las funciones innatas estudiadas (adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y actividad citotóxica NK) en comparación con los controles sanos de equivalente edad cronológica. Y esto a pesar de estar considerando una patología neurodegenerativa en la que se da un mayor estado de oxidación (Chen *et al.*, 2009; Prigione *et al.*, 2009; Hwang, 2013). Esto contrasta con lo que ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, en la que tanto las personas con esta patología como los ratones triples transgénicos para la misma, mostraron menores valores en la quimiotaxis y fagocitosis de sus leucocitos, en comparación con los correspondientes controles (Maté, 2015; Vida *et al.*, 2018).

Aunque no hay estudios en los estadios tempranos de la enfermedad en los que se hayan evaluado las mismas funciones innatas del presente trabajo, sí hay algunos que indican en pacientes con EP severo una menor fagocitosis en células inmunitarias periféricas (monocitos y células polimorfonucleares) en comparación con los controles sanos (Salman *et al.*, 1999; Grozdanov *et al.*, 2014). Sin embargo, al utilizarse en esos estudios pacientes con distinto grado de avance de la enfermedad, se podría sugerir que, en fases más avanzadas de ésta, la fagocitosis podría estar disminuida en mayor grado que en las primeras etapas. De hecho, estudios que trabajan únicamente con muestras de pacientes en fases tempranas (I-II) no observan diferencias en la capacidad fagocítica o quimiotáctica de monocitos humanos (Wijeyekoon *et al.*, 2018), al igual que lo obtenido en esta tesis en los polimorfonucleares de pacientes con EPII.

En lo referente a la actividad NK en esos pacientes de EP, si bien en los trabajos existentes no se han encontrado diferencias al comparar con las personas sanas de su misma edad, sí se encontró una correlación con la severidad de la enfermedad (Mihara *et al.*, 2008; Niwa *et al.*, 2012). De nuevo, los resultados encontrados en EPII son

diferentes a los detectados en pacientes y en ratones triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, en los que se apreció una menor actividad NK en fases tempranas de la enfermedad (Maté, 2015; Vida *et al.*, 2018) dándose un aumento a medida que avanza la enfermedad en el caso de los humanos (Solerte *et al.*, 1998).

4.2. Inmunidad adquirida

Los resultados de la presente tesis demuestran que, incluso en etapas tempranas de la progresión de la enfermedad (fase II), se puede apreciar deterioro en la inmunidad adaptativa, en comparación con los controles sanos de la misma edad, y esto incluso considerando la inmunosenescencia que presentan ambos grupos (controles y los de EP) consecuencia de su edad avanzada. Así, las respuestas proliferativas de los linfocitos a los mitógenos PHA y LPS, en pacientes de EPII, fueron menores que las de los controles sanos de igual edad cronológica. Siendo esta proliferación de los linfocitos una de las funciones más deterioradas al envejecer y típica de un estado de inmunosenescencia (De la Fuente & Miquel, 2009; Martínez de Toda *et al.*, 2016, 2017), los resultados indican que los pacientes de EPII experimentan un deterioro más acelerado de la inmunidad adquirida ya en fases tempranas de la enfermedad.

Se ha descrito que la dopamina (DA) ejerce una influencia sobre la maduración de los linfocitos, así como en la función inmunitaria que desarrollan éstos, por lo que una depleción de neuronas dopaminérgicas como la que ocurre en la EP, con una menor síntesis y liberación de DA, podría contribuir a atenuar la respuesta linfoproliferativa (Mignini *et al.*, 2013; Levite, 2016). De acuerdo con esta idea, numerosos estudios muestran la existencia de una respuesta mitogénica deteriorada en los linfocitos de sangre periférica de pacientes con EP (Marttila *et al.*, 1985; Bieganowska *et al.*, 1993). En este contexto, también se ha comprobado que el tratamiento con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), usada como modelo de Parkinson, causa una baja capacidad linfoproliferativa

en respuesta a LPS y ConA en animales de experimentación (Deleplanque *et al.*, 1992; Delrue-perollet *et al.*, 1995; Pacheco-López *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2005). Nuestros resultados confirman esta disminución de la respuesta proliferativa en los pacientes de EP ya desde las fases tempranas de la enfermedad.

Cuando se considera la proliferación a nivel basal, poco estudiada en la EP, se ha observado una mayor linfoproliferación basal de linfoblastos en sujetos con EP en fases moderadas y graves, respecto a los de donantes sanos (Esteras *et al.*, 2015). En la presente tesis, la mayor linfoproliferación basal típica del envejecimiento (De la Fuente & Miquel, 2009; De la Fuente, 2014a), no parece sufrir alteraciones adicionales como consecuencia de la enfermedad (pacientes de EPII) en comparación con los controles sanos de su misma edad. Las posibles discrepancias con los resultados de los otros estudios pueden ser debidas a la fase de la enfermedad en que se encuentran los pacientes. Esto indica que posiblemente puedan detectarse niveles superiores de proliferación basal en linfocitos de sangre periférica en pacientes de EP a medida que avance la patología. Una mayor linfoproliferación basal representa una sobreactivación del sistema inmunitario por abundancia de señales proliferativas en ausencia de infección, una situación referida como “inflamación estéril” (Martínez de Toda *et al.*, 2017). Si bien la neuroinflamación, así como una inflamación sistémica son características en la EP (Qin *et al.*, 2016), en pacientes de estadios tempranos esta inflamación no parece tener una repercusión apreciable en la proliferación basal de linfocitos circulantes, más allá del efecto debido al envejecimiento fisiológico.

Ya en 1997, Effros y Pawelec hipotetizaban que la elevada proliferación basal de los linfocitos T que se observaba en el envejecimiento podría sobre-estimular a estas células de modo que no serían capaces de reaccionar adecuadamente frente a estímulos mitogénicos, como sucede en las infecciones (Effros & Pawelec, 1997). Esto podría

explicar la menor proliferación en respuesta a mitógenos que tienen los linfocitos de los individuos mayores frente a los adultos y, en cierta medida la de los pacientes con EPII. No obstante, habría otros mecanismos que explicasen por qué la disminución en esa respuesta linfoproliferativa es mayor en pacientes con EPII. En este sentido, aunque los datos clínicos apoyan la inflamación periférica y la disminución de la síntesis de dopamina como eventos temprano en el desarrollo de la EP, permanece aún sin esclarecer el mecanismo a través del cual los pacientes con EP sufren un deterioro acelerado de la inmunidad adquirida periférica en las primeras etapas de la enfermedad.

Al igual que se ha observado en la presente tesis con los EP, en los de Alzheimer también aparece una menor respuesta proliferativa de los linfocitos al mitógeno PHA al comparar con la de personas sanas de la misma edad cronológica (Vida *et al.*, 2018). No obstante, en experimentos con modelos transgénicos de ratón para esa enfermedad de Alzheimer, los linfocitos presentaron una capacidad proliferativa, tanto basal como en respuesta a mitógenos (ConA) superior a la de los controles no transgénicos (Maté *et al.*, 2015). Es evidente que el deterioro de esta función típica de la inmunidad adaptativa, podría ser característico de la neurodegeneración, pero de la debida a la edad y no tanto la de base más genética como representa el modelo murino comentado.

Por los resultados obtenidos en la presente tesis, se puede indicar la presencia de una inmunosenescencia acelerada en las fases tempranas de la EP que se concreta en una función relevante de la inmunidad adaptativa, la respuesta linfoproliferativa a los mitógenos PHA y LPS, pudiendo sugerirse a dicha respuesta como un biomarcador periférico útil en la caracterización temprana de la EP.

4.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo crónico juega un papel clave en el envejecimiento, así como en la patogénesis de la EP (Prigione *et al.*, 2006; De la Fuente & Miquel, 2009; Dias *et al.*, 2013; De la Fuente, 2018a). Una disminución del contenido de GSH específicamente en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) se describió hace décadas en muestras de cerebros *post mortem* de los pacientes con EP (Bharath *et al.*, 2002), mientras que la cantidad total de glutatión no varía con respecto a los controles (Perry *et al.*, 1982; Sofic *et al.*, 1992). Sin embargo, al ser muestras *post-mortem* se trataban necesariamente de estadios avanzados de la enfermedad o, como poco, de una mezcla no homogénea de fases distintas de la misma. Por ello, se hace necesaria la determinación de la variación del estado redox en estos pacientes según en los diferentes estadios de la enfermedad.

Nuestros resultados revelaron que diversos marcadores de estrés y daño oxidativo tenían valores más elevados en células de sangre de pacientes con EPII, en comparación con los controles correspondientes. Así, los pacientes de EPII mostraron menor actividad de GPx y mayor de GR, además de una mayor concentración de MDA y de GSSG, manteniéndose las de GSH similares a las de las personas sanas de igual edad cronológica.

En el caso de la enzima GPx, se ha descrito una menor actividad en eritrocitos en las primeras fases de la enfermedad, que no varía significativamente en estas células a lo largo del avance de la misma, a diferencia de lo observado en células de sangre completa (Abraham *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). Respecto a la actividad GR, al igual que en la presente tesis, no se han visto diferencias entre pacientes de EP y controles ancianos en las primeras fases de la enfermedad en leucocitos mononucleares de sangre periférica (Prigione *et al.*, 2006; Cristalli *et al.*, 2012).

En lo referente a la concentración de GSSG, en otros estudios también ha detectado unas mayores concentraciones en pacientes con EP (Younes-Mhenni *et al.*, 2007), pero

los resultados son contradictorios en cuanto al contenido total de glutatión y de GSH, en muestras de sangre completa de estos pacientes (población mixta de las etapas I–IV) (Serra *et al.*, 2001; Younes-Mhenni *et al.*, 2007; Cristalli *et al.*, 2012; Campolo *et al.*, 2016; Saito *et al.*, 2016).

Los aumentos en las concentraciones de GSSG, observados en la presente tesis, no se vieron reflejados en diferencias significativas en el cociente GSSG/GSH entre los pacientes de EP y los ancianos sanos.

Es decir, que en las primeras fases de la EP las muestras de sangre completa no manifiestan alteración en ese cociente, que es un indicador de estado de estrés oxidativo (Kand'ár, 2016). De hecho, el tener concentraciones de GSH similares a los de individuos sanos y una mayor cantidad de GSSG, a pesar de una mayor actividad GR y menor actividad GPx que los controles ancianos, hace pensar que, en estos pacientes, probablemente otras rutas moleculares estén consumiendo el poder reductor del GSH y transformándolo en GSSG. De hecho, este agotamiento de la cantidad de GSH se ha propuesto como uno de los primeros responsables de la cascada de reacciones que acaba causando el daño a las neuronas dopaminérgicas y al desarrollo de la EP (Zeevalk *et al.*, 2008).

Aunque la mayor actividad de GR detectada en las muestras de pacientes con EPII podría justificarse como acción de una respuesta compensatoria para hacer frente a los altos niveles de GSSG observados, parece no ser capaz de reestablecer completamente el desequilibrio. Por otro lado, la menor actividad de GPx detectada podría contribuir a la acumulación de peróxidos y así causar un mayor daño oxidativo en estas células. Esto justificaría que las células de sangre completa de pacientes con EPII también mostraron concentraciones superiores de MDA, en relación con los controles ancianos.

Relativo a la concentración de MDA, en general la bibliografía tiende a detectar un aumento de su contenido en sangre en pacientes de EP, sin embargo, los resultados son contradictorios debido a las diferencias en el tipo de las muestras utilizadas para la valoración (sangre completa, suero, plasma...) y a que, a menudo, se recurre a una población heterogénea de pacientes en distintas fases de la enfermedad. Así, existen estudios que observan esta mayor cantidad de MDA en suero (Ilic *et al.*, 1999; Prigione *et al.*, 2006; Agil *et al.*, 2006; Younes-Mhenni *et al.*, 2007; Medeiros *et al.*, 2016), y otros que detectan un contenido de MDA similar tanto en plasma, en leucocitos como en eritrocitos de sangre de pacientes con EP comparado con los controles ancianos sanos, pero que es significativamente superior en fases más avanzadas de la enfermedad (Sanyal *et al.*, 2009; Cristalli *et al.*, 2012).

Además, algunos trabajos han detectado otros productos de oxidación y daño al ADN (8-OHdG) también más elevados en células de sangre completa y plasma de pacientes con EP, apoyando la existencia de un desequilibrio redox detectable en muestras sanguíneas de estos pacientes (Bosco *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009).

Dado que el mantenimiento de un buen equilibrio redox y una baja acumulación de daño celular son importantes para preservar la función inmunitaria y lograr así una longevidad extrema (De la Fuente & Miquel, 2009; Arranz *et al.*, 2010b; De la Fuente, 2018a), es posible que el deterioro temprano de la respuesta proliferativa estimulada observada en los pacientes de EPII esté mediado por el aumento observado en el estrés y el daño oxidativo que esté afectando a los linfocitos.

Por otro lado, la mayoría de las ROS tienen su origen en la mitocondria y, como ya se ha discutido en el apartado anterior, estas ROS tienen la capacidad de oxidar el ADNmt, pudiendo causar la fragmentación del mismo. Así, regiones cerebrales específicas, como la corteza prefrontal, la SNpc o incluso en sangre periférica de

pacientes de EP se pueden encontrar alteraciones como importantes deleciones en su ADNmt (Bender *et al.*, 2006, 2008; Martín-Jiménez *et al.*, 2020). Hasta la fecha no se ha descrito si existe una diferente prevalencia de inserciones de estos fragmentos delecionados en el ADNn, por lo que futuras investigaciones podrían dilucidar si el desequilibrio del estado redox observado en los pacientes de EPII podría estar causando una mayor inserción de fragmentos de ADNmt en el ADNn y, posiblemente, una mayor frecuencia de MNs en sus leucocitos de sangre periférica, como marcador temprano del avance de la EP. Este es un aspecto objeto de futuras investigaciones.

En resumen, la importancia de descubrir marcadores tempranos del desarrollo y pronósticos del avance de la EP radica en que, en el momento que se presenta la sintomatología clínica, el 70% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc han muerto (Kannarkat *et al.*, 2013). El estudio de biomarcadores que permitan la identificación de fases prodrómicas y preclínicas de la EP son cruciales para el diagnóstico temprano de esta enfermedad, con el que se podrían desarrollar terapias preventivas o de intervención temprana, que contribuirían a retrasar o ralentizar la aparición de síntomas y reducir su intensidad.

Nuestros resultados sugieren que la evaluación de varios parámetros de funciones inmunitarias (proliferación estimulada con PHA o LPS) en linfocitos de sangre periférica aislados, junto con parámetros de estrés y daño oxidativo (actividades GPx y GR y contenidos de GSSG y MDA) en las células de sangre completa podrían llegar a ser biomarcadores periféricos útiles para estimar la progresión de la EP en las fases tempranas de la enfermedad.

5. Resumen General de la Discusión

Se han presentado resultados referentes a los cambios de algunos parámetros de bioquímica sanguínea, de función inmunitaria y de estrés oxidativo que tienen lugar según avanza el envejecimiento en ratones macho de la cepa ICR-CD1. Comparados con los datos publicados en ratones hembra, los machos de este estudio mostraron una mayor dispersión y falta de tendencia clara en muchos parámetros. Asimismo, se confirma que, en ratones macho de la cepa ICR-CD1, la inmunosenescencia característica del envejecimiento no supone simplemente el declive de las funciones inmunitarias. Algunas de esas funciones no cambian con la edad, aumentan o disminuyen, mientras que otras varían sin seguir una tendencia clara, apoyando así la teoría de la remodelación (Franceschi & Cossarizza, 1995; Franceschi *et al.*, 2000c).

Se ha realizado una comparativa entre las funciones conductuales que presentan ambos sexos. A grandes rasgos, los machos mostraron valores mayores, respecto a las hembras, en conductas que tradicionalmente se asocian a más estado de ansiedad. Sin embargo, hay que plantearse la posibilidad de que los parámetros contabilizados no representen adecuadamente el estado de ansiedad en ambos sexos, y que los machos y las hembras muestren su estado de ansiedad de diferente manera. Esto explicaría, en parte, la controversia en los resultados que intentan demostrar si los machos muestran mayores (Rodgers & Cole, 1993; Võikar *et al.*, 2001; Estanislau & Morato, 2006) o menores niveles de ansiedad (Marcondes *et al.*, 2001; An *et al.*, 2011) que las hembras.

Para cada uno de estos conjuntos de parámetros, así como para variables conductuales en los ratones macho se han desarrollado fórmulas matemáticas, así como una fórmula combinada mezclando los datos de los diferentes grupos de parámetros, que permiten la estimación de la longevidad que alcanzará cada ratón. En el caso de la fórmula conductual, se confirmó la reproducibilidad del modelo previamente generado en ratones

hembra y se comprobó la escasa aplicabilidad de la misma en machos. A pesar de que ambos modelos hacían uso de parámetros principalmente relacionados con conductas de ansiedad, este hecho apoya la idea de que ambos sexos recurren a conductas diferentes para expresar o controlar la ansiedad.

El uso de modelos animales en la biogerontología ha permitido diseñar estudios longitudinales, que ofrecen información individualizada de los sujetos investigados y que no pueden llevarse a cabo en humanos. Futuras investigaciones que validen los resultados obtenidos permitirán el uso de estos modelos matemáticos como poderosas herramientas que ayudarán a la optimización de recursos temporales en las investigaciones sobre envejecimiento. Además, conocer el efecto que tienen estas variables sobre la longevidad de los ratones, podría apuntar a los mecanismos moleculares involucrados en la determinación de esta longevidad y así diseñar estrategias y tratamientos que modifiquen estos parámetros, orientados a facilitar un envejecimiento saludable.

Se han estudiado las alteraciones en los parámetros de inserciones de ADNmt en el ADNn y diversas variables relacionadas con la frecuencia de MN y otras aberraciones cromosómicas durante el envejecimiento y la relación que existe entre las diferentes variables y el avance de la edad. Además, se ha observado una tendencia creciente de éstas según avanza el envejecimiento que permite considerar las inserciones de ADNmt en el ADNn y la frecuencia de MN como candidatos a biomarcadores de edad biológica. Se requieren futuras investigaciones que ahonden en la relación causal que existe entre ambas, así como su validación como marcadores de edad biológica demostrando que existe correlación entre alguno de los parámetros y la longevidad que alcanzan los individuos. También, se debe analizar si intervenciones que demuestren modificar la longevidad pueden tener algún efecto sobre estos parámetros.

Por último, se han comparado la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica y el estado redox de las células de sangre completa de pacientes de EPII en comparación con controles sanos de equivalente edad cronológica, así como con los adultos sanos, para discernir los cambios que en tales parámetros tienen lugar como consecuencia del envejecimiento fisiológico o como resultado del desarrollo de la fase temprana de la enfermedad. A diferencia de lo que sucede en otras patologías neurodegenerativas, en los pacientes de EPII no hay alteraciones en las funciones inmunitarias innatas, como la adherencia, quimiotaxis, fagocitosis o la actividad citotóxica NK. Aunque son necesarias más investigaciones en este aspecto, los resultados de la presente tesis permiten sugerir el análisis de la proliferación linfoide en respuesta a mitógenos como una ayuda en el diagnóstico temprano de la enfermedad o, posiblemente, en el pronóstico de su progresión.

CONCLUSIONES

1. A lo largo del envejecimiento, los ratones macho de la cepa ICR-CD1 experimentan algunos cambios en su bioquímica sanguínea, así como en la función inmunitaria y estado redox de sus leucocitos peritoneales. Tales cambios muestran, en general, grandes desviaciones interindividuales y pocas diferencias estadísticamente significativas, a diferencia de lo comprobado en hembras.
2. Los ratones macho presentan en la vejez una disminución en la concentración de glucosa y triglicéridos sanguíneos, así como de la quimiotaxis de las células inmunitarias peritoneales, mientras que muestran un aumento de la actividad GPx, del cociente GSSG/GSH y de la concentración de MDA en dichos leucocitos.
3. Los ratones macho que llegan a longevos, apenas han presentado diferencias a lo largo de su envejecimiento con los otros animales en las funciones inmunitarias estudiadas, con la excepción del alto porcentaje de proliferación de los linfocitos en respuesta a la ConA en la edad muy vieja. Sin embargo, en parámetros de estado redox han mostrado, en la edad vieja una alta actividad GR, y en la edad muy vieja una baja concentración de GSSG. Curiosamente, estos animales tienen en la edad adulta una elevada concentración de MDA, aunque ya siendo longevos estas concentraciones son muy bajas.
4. En los ratones macho se da una correlación entre los valores de quimiotaxis de macrófagos y de fagocitosis, en la edad muy vieja, y los de MDA en la edad adulta, con la esperanza de vida de los animales.
5. A la edad adulta en ratones macho de la cepa ICR-CD1, se pueden usar modelos matemáticos basados en bioquímica sanguínea, función inmunitaria y/o estado redox de leucocitos peritoneales para estimar la esperanza de vida de cada ratón,

así como un modelo que combina parámetros anteriores, con una explicación de la varianza de 14,5%, 22,7%, 41,0% y 48,6%, respectivamente. Los modelos generados en ratones macho fueron diferentes a los de hembras y la capacidad de predicción fue muy inferior a la previamente conseguida en hembras.

6. Los ratones hembra y macho de la cepa ICR-CD1, a la edad adulta, se diferencian significativamente en una serie de pruebas conductuales, mostrando los machos una mayor exploración vertical y unas conductas que pueden relacionarse con una mayor ansiedad.
7. En la edad adulta, la deambulación interna en el tablero de agujeros y el tiempo en brazos cerrados del laberinto en cruz elevado, correlacionan de forma positiva y negativa, respectivamente con la longevidad en machos y hembras. No obstante, el tiempo en la plataforma central del laberinto en cruz elevado y los grooming o acicalamientos lo hacen sólo en los machos.
8. El modelo matemático previamente publicado para la predicción de la longevidad a partir de datos conductuales de ratones hembra no resultó óptimo para su aplicación a machos. El nuevo modelo matemático generado en ratones macho emplea 5 parámetros conductuales analizados en el tablero con agujeros y el laberinto en cruz elevado, como son el tiempo en la plataforma central, la deambulación interna, el número y tiempo de *head-dipping* y el número de *grooming*. Este modelo fue capaz de explicar un 63,6% de la varianza observada en la esperanza de vida.
9. Se describe por primera vez la existencia de inserciones de ADNmt en el genoma nuclear de linfocitos T de ratón. Dichas inserciones se dan en las regiones pericentroméricas de todos los autosomas, así como en el cromosoma X.

- 10.** Al avanzar el envejecimiento, se observa un aumento de las inserciones de ADNmt en el ADNn y de la pérdida cromosómica, evidenciada esta última como micronúcleos con señal centromérica. Por ello, se proponen estos dos parámetros como nuevos candidatos a marcadores de edad biológica. Por otro lado, la correlación positiva encontrada entre ambos fenómenos sugiere que la preferente inserción de las secuencias mitocondriales en las regiones pericentroméricas afecta a la correcta segregación cromosómica. Se propone un nuevo mecanismo molecular subyacente a la inmunosenescencia.
- 11.** Los pacientes de Parkinson en la fase II muestran, en comparación con los controles sanos de similar edad, concentraciones más altas de oxidantes (glutación oxidado y peróxidos lipídicos) y menor actividad de defensas antioxidantes, como la de glutación peroxidasa. También presentan una inmunosenescencia acelerada en funciones inmunitarias adaptativas, como es la proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos, mientras que no se observan alteraciones en las funciones inmunitarias innatas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham S, Soundararajan CC, Vivekanandhan S, & Behari M (2005) Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease. *Indian J Med Res* 121:111–115
- Ademokun A, Wu YC, & Dunn-Walters D (2010) The ageing B cell population: Composition and function. *Biogerontology* 11:125–137. <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9256-9>
- Ademowo OS, Dias HKI, Burton DGA, & Griffiths HR (2017) Lipid (per) oxidation in mitochondria: an emerging target in the ageing process? *Biogerontology* 18:859–879. <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9710-z>
- Adolfsson O, Huber BT, & Meydani SN (2001) Vitamin E-Enhanced IL-2 Production in Old Mice: Naive But Not Memory T Cells Show Increased Cell Division Cycling and IL-2-Producing Capacity. *J Immunol* 167:3809–3817. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.7.3809>
- Agil A, Durán R, Barrero F, et al. (2006) Plasma lipid peroxidation in sporadic Parkinson's disease. Role of the L-dopa. *J Neurol Sci* 240:31–6. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.08.016>
- Aguilera A, & Gómez-gonzález B (2008) Genome instability : a mechanistic view of its causes and consequences. 9:. <https://doi.org/10.1038/nrg2268>
- Ahmad S, Khan H, Shahab U, et al. (2017) Protein oxidation: An overview of metabolism of sulphur containing amino acid, Cysteine. *Front Biosci - Sch* 9:71–87. <https://doi.org/10.2741/S474>
- Aiello A, Farzaneh F, Candore G, et al. (2019) Immunosenescence and its hallmarks: How to oppose aging strategically? A review of potential options for therapeutic intervention. *Front Immunol* 10:1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02247>
- Akbar AN, Henson SM, & Lanna A (2016) Senescence of T Lymphocytes: Implications for Enhancing Human Immunity. *Trends Immunol* 37:866–876. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.09.002>
- Allen R., & Tresini M (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28:463–499. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00242-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00242-7)
- Almeida FF, & Belz GT (2016) Innate lymphoid cells: models of plasticity for immune homeostasis and rapid responsiveness in protection. *Mucosal Immunol* 9:1103–1112. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.64>
- Alonso-Fernandez P, & De la Fuente M (2012) Role of the Immune System in Aging and Longevity. *Curr Aging Sci* 4:78–100. <https://doi.org/10.2174/1874609811104020078>
- Alonso-Fernández P, Puerto M, Maté I, et al. (2008) Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J Am Geriatr Soc* 56:2244–2251. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2008.02018.x>
- Alvarado C, Álvarez P, Puerto M, et al. (2006) Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* 22:767–777. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.05.007>
- Alves AS, & Bueno V (2019) Immunosenescence: participation of T lymphocytes and myeloid-derived suppressor cells in aging-related immune response changes. *Einstein (São Paulo)* 17:1–8. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2019RB4733
- Ambrosi G, Ghezzi C, Sepe S, et al. (2014) Bioenergetic and proteolytic defects in fibroblasts from patients with sporadic Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1842:1385–1394. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.008>
- Ames BN, Shigenaga MK, & Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7915–7922. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7915>
- Amodeo DA, Pahua AE, Zarate M, et al. (2019) Differences in the expression of restricted repetitive behaviors in female and male BTBR T + tf/J mice. *Behav Brain Res* 372:112028. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112028>
- An X-L, Zou J-X, Wu R-Y, et al. (2011) Strain and Sex Differences in Anxiety-Like and Social Behaviors in C57BL/6J and BALB/cJ Mice. *Exp Anim* 60:111–123. <https://doi.org/10.1538/expanim.60.111>

- Anderson KM, Castelli WP, & Levy D (1987) Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA J Am Med Assoc* 257:2176–2180. <https://doi.org/10.1001/jama.257.16.2176>
- Annesley SJ, Lay ST, De Piazza SW, et al. (2016) Immortalized Parkinson's disease lymphocytes have enhanced mitochondrial respiratory activity. *Dis Model Mech* 9:1295–1305. <https://doi.org/10.1242/dmm.025684>
- Anuj Y, Rewa K, Ashwani Y, et al. (2016) Antioxidants and its functions in human body. *Res Environ life Sci* 9:1328–1331
- Aprahamian T, Takemura Y, Goukassian D, & Walsh K (2008) Ageing is associated with diminished apoptotic cell clearance in vivo. *Clin Exp Immunol* 152:448–455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03658.x>
- Araki K, Yagi N, Aoyama K, et al. (2019) Parkinson's disease is a type of amyloidosis featuring accumulation of amyloid fibrils of α -synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:17963–17969. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906124116>
- Arkhipov VI, Pershina E V., & Levin SG (2019) The role of anti-inflammatory cytokines in memory processing in a healthy brain. *Behav Brain Res* 367:111–116. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.053>
- Arranz L, Caamaño JH, Lord JM, & De la Fuente M (2010a) Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: Possible role of nuclear factor kappa B. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 65 A:941–950. <https://doi.org/10.1093/gerona/gqlq101>
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I, et al. (2010b) Environmental Enrichment Improves Age-Related Immune System Impairment: Long-Term Exposure Since Adulthood Increases Life Span in Mice. *Rejuvenation Res* 13:415–428. <https://doi.org/10.1089/rej.2009.0989>
- Arranz L, Fernández C, Rodríguez A, et al. (2008) The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic Biol Med* 45:1252–1262. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.014>
- Arranz L, Giménez-Llort L, De Castro NM, et al. (2009) El aislamiento social durante la vejez empeora el deterioro cognitivo, conductual e inmunitario. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 44:137–142. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2008.12.001>
- Artico M, Bosco S, Cavallotti C, et al. (2002) Noradrenergic and cholinergic innervation of the bone marrow. *Int J Mol Med* 10:77–80. <https://doi.org/10.3892/ijmm.10.1.77>
- Atanackovic D, Schnee B, Schuch G, et al. (2006) Acute psychological stress alerts the adaptive immune response: Stress-induced mobilization of effector T cells. *J Neuroimmunol* 176:141–152. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.03.023>
- Aubert G, & Lansdorp PM (2008) Telomeres and aging. *Physiol Rev* 88:557–579. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2007>
- Aw D, Silva AB, & Palmer DB (2007) Immunosenescence: Emerging challenges for an ageing population. *Immunology* 120:435–446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02555.x>
- Azarabadi S, Abdollahi H, Torabi M, et al. (2017) ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L). *Eur J Plant Pathol* 147:279–294. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1000-0>
- Baciou L, Masoud R, Souabni H, et al. (2018) Phagocyte NADPH oxidase, oxidative stress and lipids: Anti- or pro ageing? *Mech Ageing Dev* 172:30–34. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.11.001>
- Bae CY, Kang YG, Kim S, et al. (2008) Development of models for predicting biological age (BA) with physical, biochemical, and hormonal parameters. *Arch Gerontol Geriatr* 47:253–265. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2007.08.009>
- Baeza I, De Castro NM, Arranz L, et al. (2010a) Ovariectomy causes immunosenescence and oxi-inflamm-ageing in peritoneal leukocytes of aged female mice similar to that in aged males. *Biogerontology* 12:227–238. <https://doi.org/10.1007/s10522-010-9317-0>

- Baeza I, Fdez-Tresguerres J, Ariznavarreta C, & De La Fuente M (2010b) Effects of growth hormone, melatonin, oestrogens and phytoestrogens on the oxidized glutathione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) ratio and lipid peroxidation in aged ovariectomized rats. *Biogerontology* 11:687–701. <https://doi.org/10.1007/s10522-010-9282-7>
- Bagnara GP, Bonsi L, Strippoli P, et al. (2000) Hemopoiesis in healthy old people and centenarians: Well-maintained responsiveness of CD34+ cells to hemopoietic growth factors and remodeling of cytokine network. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 55:100–104. <https://doi.org/10.1093/gerona/55.2.B61>
- Bai X, Han L, Liu Q, et al. (2010) Evaluation of biological aging process - A population-based study of healthy People in China. *Gerontology* 56:129–140. <https://doi.org/10.1159/000262449>
- Baker DJ, Childs BG, Durik M, et al. (2016) Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530:184–189. <https://doi.org/10.1038/nature16932>
- Bakhoun SF, Thompson SL, Manning AL, & Compton DA (2009) Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nat Cell Biol* 11:27–35. <https://doi.org/10.1038/ncb1809>
- Bale TL (2009) Neuroendocrine and Immune Influences on the CNS: It's a Matter of Sex. *Neuron* 64:13–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.036>
- Barja G (2004) Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 27:595–600. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.07.005>
- Barja G (2013) Updating the Mitochondrial Free Radical Theory of Aging: An Integrated View, Key Aspects, and Confounding Concepts. *Antioxid Redox Signal* 19:1420–1445. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5148>
- Barja G (2019) Towards a unified mechanistic theory of aging. *Exp Gerontol* 124:. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.05.016>
- Barja G, & Herrero A (2000) Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J* 14:312–318. <https://doi.org/10.1096/fasebj.14.2.312>
- Bartesaghi S, & Radi R (2018) Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol* 14:618–625. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.009>
- Bauer ME (2005) Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress* 8:69–83. <https://doi.org/10.1080/10253890500100240>
- Bauer ME, & De la Fuente M (2016) The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 158:27–37. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.01.001>
- Bayne S, & Liu J-P (2005) Hormones and growth factors regulate telomerase activity in ageing and cancer. *Mol Cell Endocrinol* 240:11–22. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.05.009>
- Beery AK, & Zucker I (2011) Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev* 35:565–572. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002>
- Bellinger DL, Lorton D, Felten SY, & Felten DL (1992) Innervation of lymphoid organs and implications in development, aging, and autoimmunity. *Int J Immunopharmacol* 14:329–344. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(92\)90162-E](https://doi.org/10.1016/0192-0561(92)90162-E)
- Bellinger DL, Madden KS, Lorton D, et al. (2001) Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in immunosenescence. *Psychoneuroimmunology* 1:241–288
- Belsky DW, Caspi A, Houts R, et al. (2015) Quantification of biological aging in young adults. *Proc Natl Acad Sci* 112:E4104–E4110. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506264112>
- Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, et al. (2006) High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 38:515–517. <https://doi.org/10.1038/ng1769>
- Bender A, Schwarzkopf RM, McMillan A, et al. (2008) Dopaminergic midbrain neurons are the prime target for mitochondrial DNA deletions. *J Neurol* 255:1231–1235. <https://doi.org/10.1007/s00415-008-0892-9>
- Bendor JT, Logan TP, & Edwards RH (2013) The function of α -synuclein. *Neuron* 79:1044–1066. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.004>

- Bensasson D, Feldman MW, & Petrov DA (2003) Rates of DNA duplication and mitochondrial DNA insertion in the human genome. *J Mol Evol* 57:343–354. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2485-7>
- Berthiaume JM, & Wallace KB (2007) Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 23:15–25. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0140-y>
- Besedovsky HO, & Sorkin E (1977) Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol* 27:1–12
- Besedovsky HO, & Del Rey A (1996) Immune-Neuro-Endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. *Endocr Rev* 17:64–102. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-1-64>
- Besedovsky HO, & Del Rey A (2007) Physiology of psychoneuroimmunology: A personal view. *Brain Behav Immun* 21:34–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.09.008>
- Besedovsky HO, & Del Rey A (2011) Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem Res* 36:1–6. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0252-x>
- Bessler H, Djaldetti R, Salman H, et al. (1999) IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother* 53:141–145. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(99\)80079-1](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(99)80079-1)
- Bezard E, Dovero S, Prunier C, et al. (2001) Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:6853–6861. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-17-06853.2001>
- Bharath S, Hsu M, Kaur D, et al. (2002) Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 64:1037–1048. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01174-7](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01174-7)
- Biedrzycka E, & Amarowicz R (2008) Diet and health: Apple polyphenols as antioxidants. *Food Rev Int* 24:235–251. <https://doi.org/10.1080/87559120801926302>
- Bieganowska K, Członkowska A, Bidziński A, et al. (1993) Immunological changes in the MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *J Neuroimmunol* 42:33–37. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(93\)90209-H](https://doi.org/10.1016/0165-5728(93)90209-H)
- Björkstén J (1968) The crosslinkage theory of aging. *J Am Geriatr Soc* 16:408–427. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1968.tb02821.x>
- Blagosklonny M V. (2007) An anti-aging drug today: from senescence-promoting genes to anti-aging pill. *Drug Discov Today* 12:218–224. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.01.004>
- Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6:611–622. <https://doi.org/10.1038/nrg1656>
- Blasco MA (2007) Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol* 3:640–649. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.38>
- Blom JW, De Ruijter W, Witteman JCM, et al. (2013) Changing prediction of mortality by systolic blood pressure with increasing age: The Rotterdam study. *Age (Omaha)* 35:431–438. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9349-7>
- Bogenhagen DF (2012) Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1819:914–920. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.11.005>
- Boonekamp JJ, Simons MJP, Hemerik L, & Verhulst S (2013) Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age. *Aging Cell* 12:330–332. <https://doi.org/10.1111/accel.12050>
- Borkan GA, & Norris AH (1980) Assessment of Biological Age Using a Profile of Physical Parameters. *J Gerontol* 35:177–184. <https://doi.org/10.1093/geronj/35.2.177>
- Borras C, Gambini J, & Vina J (2007) Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Front Biosci* 12:1008. <https://doi.org/10.2741/2120>
- Borrás C, Sastre J, García-Sala D, et al. (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* 34:546–552. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01356-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01356-4)
- Borrás C, Serna E, Gambini J, et al. (2017) Centenarians maintain miRNA biogenesis pathway while it is impaired in octogenarians. *Mech Ageing Dev* 168:54–57. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.07.003>

- Bosco DA, Fowler DM, Zhang Q, et al. (2006) Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate α -synuclein fibrilization. *Nat Chem Biol* 2:249–253. <https://doi.org/10.1038/nchembio782>
- Bose A, & Beal MF (2016) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem* 216–231. <https://doi.org/10.1111/jnc.13731>
- Boveris A, Oshino N, & Chance B (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128:617–630. <https://doi.org/10.1042/bj1280617>
- Boyd SD, Liu Y, Wang C, et al. (2013) Human lymphocyte repertoires in ageing. *Curr Opin Immunol* 25:511–515. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.07.007>
- Boyden BS (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *Assessment* 453–466. <https://doi.org/10.1084/jem.115.3.453>
- Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, et al. (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318:121–134. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>
- Breit TM, Verschuren MC, Wolvers-Tettero IL, et al. (1997) Human T cell leukemias with continuous V (D) J recombinase activity for TCR-delta gene deletion. *J Immunol* 159:4341–4349
- Brierley EJ, Johnson MA, Lightowlers RN, et al. (1998) Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: Implications for the central nervous system and muscle. *Ann Neurol* 43:217–223. <https://doi.org/10.1002/ana.410430212>
- Brunner EJ, Shipley MJ, Witte DR, et al. (2006) Relation between blood glucose and coronary mortality over 33 years in the Whitehall study. *Diabetes Care* 29:26–31. <https://doi.org/10.2337/diacare.29.01.06.dc05-1405>
- Brüünsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, et al. (2001) Decreased natural killer cell activity is associated with atherosclerosis in elderly humans. *Exp Gerontol* 37:127–136. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00162-0](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00162-0)
- Brüünsgaard H, & Pedersen BK (2003) Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 23:15–39. [https://doi.org/10.1016/S0889-8561\(02\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0889-8561(02)00056-5)
- Butcher SK, Chahal H, Nayak L, et al. (2001) Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol* 70:881–6. <https://doi.org/10.1189/jlb.70.6.881>
- Butcher SK, Wang K, Lascelles D, & Lord JM (2004) Neutrophil ageing and immunosenescence. *NeuroImmune Biol* 4:41–55. [https://doi.org/10.1016/S1567-7443\(04\)80005-X](https://doi.org/10.1016/S1567-7443(04)80005-X)
- Cahill L (2006) Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 7:477–484. <https://doi.org/10.1038/nrn1909>
- Caldarone BJ, King SL, & Picciotto MR (2008) Sex differences in anxiety-like behavior and locomotor activity following chronic nicotine exposure in mice. *Neurosci Lett* 439:187–191. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.023>
- Campbell CL, & Thorsness PE (1998) Escape of mitochondrial DNA to the nucleus in yme1 yeast is mediated by vacuolar-dependent turnover of abnormal mitochondrial compartments. *J Cell Sci* 111:2455–2464
- Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120:513–22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.003>
- Campolo J, De Maria R, Cozzi L, et al. (2016) Antioxidant and inflammatory biomarkers for the identification of prodromal Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 370:167–172. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.09.050>
- Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, et al. (2011) Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J Proteomics* 74:2313–2323. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.005>
- Caro P, Gómez J, Arduini A, et al. (2010) Mitochondrial DNA sequences are present inside nuclear DNA in rat tissues and increase with age. *Mitochondrion* 10:479–486. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.05.004>

- Caruso C, Buffa S, Candore G, et al. (2009) Mechanisms of immunosenescence. *Immun Ageing* 6:10. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-6-10>
- Casarrubea M, Faulisi F, Caternicchia F, et al. (2016) Temporal patterns of rat behaviour in the central platform of the elevated plus maze. Comparative analysis between male subjects of strains with different basal levels of emotionality. *J Neurosci Methods* 268:155–162. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.07.024>
- Casarrubea M, Faulisi F, Sorbera F, & Crescimanno G (2015) The effects of different basal levels of anxiety on the behavioral shift analyzed in the central platform of the elevated plus maze. *Behav Brain Res* 281:55–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.021>
- Catalan J, Autio K, Wessman M, et al. (1995) Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. *Cytogenet Genome Res* 68:11–16. <https://doi.org/10.1159/000133879>
- Catalan J, Surrallés J, Falck GC-M, et al. (2000) Segregation of sex chromosomes in human lymphocytes. *Mutagenesis* 15:251–255. <https://doi.org/10.1093/mutage/15.3.251>
- Cavigelli SA, Bennett JM, Michael KC, & Klein LC (2008) Female temperament, tumor development and life span: relation to glucocorticoid and tumor necrosis factor α levels in rats. *Brain Behav Immun* 22:727–735. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.10.014>
- Cavigelli SA, & McClintock MK (2003) Fear of novelty in infant rats predicts adult corticosterone dynamics and an early death. *Proc Natl Acad Sci* 100:16131–16136. <https://doi.org/10.1073/pnas.2535721100>
- Chahal H, & Drake W (2007) The endocrine system and ageing. *J Pathol* 211:173–180. <https://doi.org/10.1002/path.2110>
- Chan SS, Monteiro HP, Deucher GP, et al. (1998) Functional activity of blood polymorphonuclear leukocytes as an oxidative stress biomarker in human subjects. *Free Radic Biol Med* 24:1411–1418. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00010-0)
- Chance B, Sies H, & Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527–605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>
- Chao TC, Phuangsab A, Van Alten PJ, & Walter RJ (1996) Steroid sex hormones and macrophage function: Regulation of chemiluminescence and phagocytosis. *Am J Reprod Immunol* 35:106–113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1996.tb00015.x>
- Chen CM, Liu JL, Wu YR, et al. (2009) Increased oxidative damage in peripheral blood correlates with severity of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 33:429–435. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.011>
- Chen X, Liu X, Zhang L, et al. (2013) Poorer survival of male breast cancer compared with female breast cancer patients may be due to biological differences. *Jpn J Clin Oncol* 43:954–963. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyt116>
- Cheng X, & Ivesa AS (2010) The migration of mitochondrial DNA fragments to the nucleus affects the chronological aging process of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 9:919–923. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00607.x>
- Cheng X, & Ivesa AS (2012) Accumulation of linear mitochondrial DNA fragments in the nucleus shortens the chronological life span of yeast. *Eur J Cell Biol* 91:782–788. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.06.005>
- Chia G, Agudo J, Treff N, et al. (2017) Genomic instability during reprogramming by nuclear transfer is DNA replication dependent. *Nat Cell Biol* 19:282–291. <https://doi.org/10.1038/ncb3485>
- Chmielewska M, Dedukh D, Haczkiwicz K, et al. (2018) The programmed DNA elimination and formation of micronuclei in germ line cells of the natural hybridogenetic water frog *Pelophylax esculentus*. *Sci Rep* 8:1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26168-z>
- Choi JW, Kim JH, Cho SC, et al. (2011) Malondialdehyde inhibits an AMPK-mediated nuclear translocation and repression activity of ALDH2 in transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 404:400–406. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.131>
- Chong Y, Ikematsu H, Yamaji K, et al. (2005) CD27+ (memory) B cell decrease and apoptosis-resistant CD27- (naive) B cell increase in aged humans: Implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances. *Int Immunol* 17:383–390. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh218>

- Chou JP, & Effros RB (2013) T Cell Replicative Senescence in Human Aging. *Curr Pharm Des* 19:1680–1698. <https://doi.org/10.2174/138161213805219711>
- Chung HY, Lee EK, Choi YJ, et al. (2011) Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *J Dent Res* 90:830–840. <https://doi.org/10.1177/0022034510387794>
- Cimini D, Fioravanti D, Salmon ED, & Degross F (2002) Merotelic kinetochore orientation versus chromosome mono-orientation in the origin of lagging chromosomes in human primary cells
- Cino M, & Del Maestro RF (1989) Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: The effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Arch Biochem Biophys* 269:623–638. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90148-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90148-3)
- Clément Y, Joubert C, Kopp C, et al. (2007) Anxiety in mice: A principal component analysis study. *Neural Plast* 2007:. <https://doi.org/10.1155/2007/35457>
- Cohen S, Miller GE, & Rabin BS (2001) Psychological Stress and Antibody Response to Immunization: A Critical Review of the Human Literature. *Psychosom Med* 63:7–18. <https://doi.org/10.1097/00006842-200101000-00002>
- Colamartino M, Santoro M, Duranti G, et al. (2014) Evaluation of Levodopa and Carbidopa Antioxidant Activity in Normal Human Lymphocytes In Vitro: Implication for Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Neurotox Res* 27:106–117. <https://doi.org/10.1007/s12640-014-9495-7>
- Coleman JW (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 1:1397–1406. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00086-8)
- Colonna-Romano G, Aquino A, Bulati M, et al. (2006) Memory B cell subpopulations in the aged. *Rejuvenation Res* 9:149–152. <https://doi.org/10.1089/rej.2006.9.149>
- Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, et al. (2008) B cell immunosenescence in the elderly and in centenarians. *Rejuvenation Res* 11:433–439. <https://doi.org/10.1089/rej.2008.0664>
- Comfort A (1969) TEST-BATTERY TO MEASURE AGEING-RATE IN MAN. *Lancet* 294:1411–1415. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(69\)90950-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(69)90950-7)
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, & Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17:1195–1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
- Costantini E, D'Angelo C, & Reale M (2018) The role of immunosenescence in neurodegenerative diseases. *Mediators Inflamm* 2018:. <https://doi.org/10.1155/2018/6039171>
- Cottliar AS, & Slavutsky IR (2001) Telomeres and telomerase activity: their role in aging and in neoplastic development. *Medicina (B Aires)* 61:335–42
- Couto N, Wood J, & Barber J (2016) The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med* 95:27–42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>
- Cristalli DO, Arnal N, Marra FA, et al. (2012) Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *J Neurol Sci* 314:48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.11.001>
- Crott JW, Choi S-W, Branda RF, & Mason JB (2005) Accumulation of mitochondrial DNA deletions is age, tissue and folate-dependent in rats. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 570:63–70. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.09.009>
- Cruces J (2018) Cambios conductuales e inmunitarios en el envejecimiento cronológico, prematuro y acelerado. Estrategias para una longevidad saludable. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid
- Cruces J, Venero C, Pereda-Pérez I, & De la Fuente M (2014a) The Effect of Psychological Stress and Social Isolation on Neuroimmunoendocrine Communication. *Curr Pharm Des* 20:4608–4628. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140130205822>
- Cruces J, Venero C, Pereda-Pérez I, & De la Fuente M (2014b) A higher anxiety state in old rats after social isolation is associated to an impairment of the immune response. *J Neuroimmunol* 277:18–25. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.09.011>

- Cruz APM, Frei F, & Graeff FG (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49:171–176. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90472-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90472-3)
- Cruz T, García L, Álvarez MA, & Manzanero AL (2019) Calidad del sueño y déficit de memoria en el envejecimiento sano. *Neurología* 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2018.10.001>
- Csaba G (2014) Hormones in the immune system and their possible role. A critical review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 61:241–260. <https://doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.3.1>
- D'Amato FR, & Pavone F (1992) Role of anxiety in subordinate male mice sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 43:181–185. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(92\)90655-Y](https://doi.org/10.1016/0091-3057(92)90655-Y)
- Dahle CL, Jacobs BS, & Raz N (2009) Aging, Vascular Risk, and Cognition: Blood Glucose, Pulse Pressure, and Cognitive Performance in Healthy Adults. *Psychol Aging* 24:154–162. <https://doi.org/10.1037/a0014283>
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, et al. (2008) From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9:46–56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>
- De Cabo de la Vega C, Pujol A, & Viveros MP (1995) Neonatally administered naltrexone affects several behavioral responses in adult rats of both genders. *Pharmacol Biochem Behav* 50:277–286. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)00314-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)00314-9)
- De Graff AMR, Hazoglou MJ, & Dill KA (2016) Highly Charged Proteins: The Achilles' Heel of Aging Proteomes. *Structure* 24:329–336. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.11.006>
- De la Fuente M (1985) Changes in the macrophage function with aging. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol* 81:935–938. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(85\)90933-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(85)90933-8)
- De la Fuente M (2002) Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 56:S5–S8. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601476>
- De la Fuente M (2008) Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation* 15:213–223. <https://doi.org/10.1159/000156465>
- De la Fuente M (2009) Retos de la Nutrición en el Siglo XXI ante el Envejecimiento Poblacional. In: Varela G, & Alonso E (eds) *Teorías del envejecimiento*. Instituto Tomás Pascuala Sanz y Universidad San Pablo CEU, Madrid (Spain), pp 29–48
- De la Fuente M (2010) Murine models of premature ageing for the study of diet-induced immune changes: improvement of leucocyte functions in two strains of old prematurely ageing mice by dietary supplementation with sulphur-containing antioxidants. *Proc Nutr Soc* 69:651–9. <https://doi.org/10.1017/S0029665110003848>
- De la Fuente M (2014a) The Immune System, a Marker and Modulator of the Rate of Aging. In: Massoud A, & Rezaei N (eds) *Immunology of Aging*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 3–23
- De la Fuente M (2014b) Editorial (Thematic Issue: Crosstalk Between the Nervous and the Immune Systems in Health and Sickness). *Curr Pharm Des* 20:4605–4607
- De la Fuente M (2015) Efecto de los antioxidantes en la modulación de la función inmunitaria. Cambios con la edad. Universidad Miguel Hernández de Elche
- De la Fuente M (2018a) Oxidation and inflammation in the immune and nervous systems, a link between aging and anxiety. In: Fulop T, Franceschi C, Hirokawa K, & Pawelec G (eds) *Handbook of Immunosenescence*. Springer Nature. Cham., Cham, pp 1–31
- De la Fuente M (2018b) Bio-psycho-social bridge: the psychoneuroimmune system in successful aging. In: Fernández-Ballesteros R, Benetos A, & Robine J (eds) *Cambridge Handbook of Successful Aging*. Cambridge University Press, New York, pp 265–280
- De la Fuente M (2019a) Teorías del Envejecimiento. Libro Blanco de la Nutrición de las Personas Mayores en España. In: 1st edn. FEN-SEGG, Madrid (Spain), pp 36–43
- De la Fuente M (2019b) Los antioxidantes y la función inmunitaria. In: Marcos A (ed) *Inmunonutrición Estilo de vida*. Editorial Médica Panamericana, Madrid (Spain), pp 227–243
- De la Fuente M (2019c) Funcionamiento del sistema inmunitario. In: Marcos A (ed) *Inmunonutrición. Estilo de vida*. Editorial Médica Panamericana, Madrid (Spain), pp 5–24
- De la Fuente M (2019d) La Psiconeuroinmunología. In: Marcos A (ed) *Inmunonutrición. Estilo de vida*. Editorial Médica Panamericana, Madrid (Spain), pp 47–68

- De la Fuente M (2020) Inmunosenescencia. In: Abizanda P, & Rodriguez-Mañas L (eds) *Tratado de Medicina Geriátrica: Fundamentos de la atención sanitaria a los mayores*, 2nd edn. Elsevier España
- De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, et al. (2004a) Changes with ageing in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology* 5:389–400. <https://doi.org/10.1007/s10522-004-3201-8>
- De la Fuente M, Cruces J, Hernandez O, & Ortega E (2011) Strategies to Improve the Functions and Redox State of the Immune System in Aged Subjects. *Curr Pharm Des* 17:3966–3993. <https://doi.org/10.2174/138161211798764861>
- De la Fuente M, & Gimenez-Llort L (2010) Models of aging of neuroimmunomodulation: Strategies for its improvement. *Neuroimmunomodulation* 17:213–216. <https://doi.org/10.1159/000258727>
- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, et al. (2004b) Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50 Online:
- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, et al. (2008) Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic Res* 42:272–280. <https://doi.org/10.1080/10715760801898838>
- De la Fuente M, Hernanz A, Medina S, et al. (2003) Characterization of monoaminergic systems in brain regions of prematurely ageing mice. *Neurochem Int* 43:165–172. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00212-7)
- De la Fuente M, Hernanz A, & Vallejo MC (2005) The immune system in the oxidative stress conditions of aging and hypertension: Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxidants Redox Signal* 7:1356–1366. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1356>
- De la Fuente M, & Miquel J (2009) An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* 15:3003–3026. <https://doi.org/10.2174/138161209789058110>
- De la Fuente M, Sánchez C, Vallejo C, et al. (2020) Vitamin C and vitamin C plus E improve the immune function in the elderly. *Exp Gerontol* 142:111118. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111118>
- DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, et al. (2006) Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology* 7:471–481. <https://doi.org/10.1007/s10522-006-9062-6>
- Deleplanque B, Neveu PJ, Vitiello S, & Le Moal M (1992) Early effects of unilateral lesions of substantia nigra on immune reactivity. *Neurosci Lett* 135:205–209. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90437-C](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90437-C)
- Dellu F, Mayo W, Vallée M, et al. (1994) Reactivity to novelty during youth as a predictive factor of cognitive impairment in the elderly: a longitudinal study in rats. *Brain Res* 653:51–56. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90371-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90371-9)
- Dellu F, Mayo W, Vallée M, et al. (1996) Behavioral reactivity to novelty during youth as a predictive factor of stress-induced corticosterone secretion in the elderly - A life-span study in rats. *Psychoneuroendocrinology* 21:441–453. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(96\)00017-0](https://doi.org/10.1016/0306-4530(96)00017-0)
- Delrue-perollet C, Li KS, Vitiello S, & Neveu PJ (1995) Peripheral Catecholamines Are Involved in the Neuroendocrine and Immune Effects of LPS. *Brain Behav Immun* 9:149–162. <https://doi.org/10.1006/brbi.1995.1014>
- DeMaagd G, & Philip A (2015) Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. *P T* 40:504–32
- Derhovanessian E, Larbi A, & Pawelec G (2009) Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. *Curr Opin Immunol* 21:440–445. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.05.012>
- Devitt A, & Marshall LJ (2011) The innate immune system and the clearance of apoptotic cells. *J Leukoc Biol* 90:447–457. <https://doi.org/10.1189/jlb.0211095>

- Dhabhar FS, Saul AN, Holmes TH, et al. (2012) High-anxious individuals show increased chronic stress burden, decreased protective immunity, and increased cancer progression in a mouse model of squamous cell carcinoma. *PLoS One* 7:.. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033069>
- Di Bona D, Vasto S, Capurso C, et al. (2009) Effect of interleukin-6 polymorphisms on human longevity: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev* 8:36–42. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.09.001>
- Dias V, Junn E, & Mouradian MM (2013) The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 3:461–91. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>
- Dilman VM (1986) Ontogenetic model of ageing and disease formation and mechanisms of natural selection. *J Theor Biol* 118:73–81. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(86\)80009-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(86)80009-1)
- Ding YR, Li B, Zhang YJ, et al. (2018) Complete mitogenome of *Anopheles sinensis* and mitochondrial insertion segments in the nuclear genomes of 19 mosquito species. *PLoS One* 13:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204667>
- Domènech-Abella J, Mundó J, Haro JM, & Rubio-Valera M (2019) Anxiety, depression, loneliness and social network in the elderly: Longitudinal associations from The Irish Longitudinal Study on Ageing (TILDA). *J Affect Disord* 246:82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.12.043>
- Donnini A, Argentati K, Mancini R, et al. (2002) Phenotype, antigen-presenting capacity, and migration of antigen-presenting cells in young and old age. *Exp Gerontol* 37:1097–1112. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00087-6](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00087-6)
- Driver JA, Logroscino G, Gaziano JM, & Kurth T (2009) Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology* 72:432–438. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000341769.50075.bb>
- Droge W (2003) Oxidative stress and ageing. *Adv Exp Med Biol* 191–192
- Dutton PL, Ohnishi T, Darrouzet E, et al. (2000) Coenzyme Q oxidation reduction reactions in mitochondrial electron transport. In: *Coenzyme Q: Molecular Mechanisms in Health and Disease*. pp 65–82
- Effros RB, & Pawelec G (1997) Replicative senescence of T cells: Does the Hayflick Limit lead to immune exhaustion? *Immunol Today* 18:450–454. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01079-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01079-7)
- El Assar M, Angulo J, & Rodríguez-Mañas L (2013) Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic Biol Med* 65:380–401. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.003>
- Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35:495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Erden-Inal M, Kanbak G, & Sunal E (2001) Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* 305:75–80. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(00\)00422-8](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(00)00422-8)
- Erden-Inal M, Sunal E, & Kanbak G (2002) Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Funct* 20:61–66. <https://doi.org/10.1002/cbf.937>
- Esiri M (2007) Ageing and the brain. *J Pathol* 211:181–187. <https://doi.org/10.1002/path.2089>
- Espinoza SE, Guo H, Fedarko N, et al. (2008) Glutathione peroxidase enzyme activity in aging. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 63:505–509. <https://doi.org/10.1093/gerona/63.5.505>
- Estanislau C, & Morato S (2006) Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects. *Int J Dev Neurosci* 24:255–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2006.03.001>
- Esteras N, Alquézar C, Bartolomé F, et al. (2015) G1/S Cell Cycle Checkpoint Dysfunction in Lymphoblasts from Sporadic Parkinson's Disease Patients. *Mol Neurobiol* 52:386–398. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8870-y>
- Esteve JM, Mompo J, Asuncion JG, et al. (1999) Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro . *FASEB J* 13:1055–1064. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.9.1055>
- Fabris N (1991) Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to aging. *Arch Gerontol Geriatr* 12:219–230. [https://doi.org/10.1016/0167-4943\(91\)90029-P](https://doi.org/10.1016/0167-4943(91)90029-P)

- Fahlström A, Yu Q, & Ulfhake B (2011) Behavioral changes in aging female C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* 32:1868–1880. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.003>
- Fahlström A, Zeberg H, & Ulfhake B (2012) Changes in behaviors of male C57BL/6J mice across adult life span and effects of dietary restriction. *Age (Omaha)* 34:1435–1452. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9320-7>
- Falkenberg M, Larsson N-G, & Gustafsson CM (2007) DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:679–699. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.152028>
- Farhadi F, Vosoughi K, Shahidi GA, et al. (2017) Sexual dimorphism in Parkinson's disease: Differences in clinical manifestations, quality of life and psychosocial functioning between males and females. *Neuropsychiatr Dis Treat* 13:329–338. <https://doi.org/10.2147/NDT.S124984>
- Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2:1084–1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- Fenech M (2010) The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys* 98:234–243. <https://doi.org/10.1097/HP.0b013e3181b85044>
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, et al. (2003) HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 534:65–75. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00249-8)
- Fenech M, & Morley AA (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res Mutagen Relat Subj* 147:29–36. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9)
- Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, et al. (1995) Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of swedish people: A comparison between survivors and nonsurvivors. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 50A:B378–B382. <https://doi.org/10.1093/gerona/50A.6.B378>
- Ferrari P, F, Palanza P, Parmigiani S, et al. (1998) Interindividual Variability in Swiss Male Mice: Relationship between Social Factors, Aggression, and Anxiety. *Physiol Behav* 63:821–827. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00544-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00544-1)
- Ferrucci L, & Fabbri E (2018) Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol* 15:505–522. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0064-2>
- File SE, & Day S (1972) Effects of time of day and food deprivation on exploratory activity in the rat. *Anim Behav* 20:758–762. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(72\)80148-9](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(72)80148-9)
- Finkel D, Whitfield K, & McGue M (1995) Genetic and Environmental Influences on Functional Age: A Twin Study. *Journals Gerontol Ser B Psychol Sci Soc Sci* 50B:P104–P113. <https://doi.org/10.1093/geronb/50B.2.P104>
- Flegal KM, Kit BK, Orpana H, & Graubard BI (2013) Association of All-Cause Mortality With Overweight and Obesity Using Standard Body Mass Index Categories. *JAMA* 309:71. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.113905>
- Forman HJ, & Fisher AB (1981) *Antioxidant Defenses*. Springer, New York, NY, pp 235–249
- Forno LS (1996) Neuropathology of Parkinson's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:259–272. <https://doi.org/10.1097/00005072-199603000-00001>
- Fraga MF, & Esteller M (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 23:413–418. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.05.008>
- Franceschi C (2007) Inflammaging as a Major Characteristic of Old People: Can It Be Prevented or Cured? *Nutr Rev* 65:12–15. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00358.x>
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, et al. (2000a) Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908:244–254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
- Franceschi C, Bonafè M, & Valensin S (2000b) Human immunosenescence: The prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 18:1717–1720. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00513-7)

- Franceschi C, & Cossarizza A (1995) Introduction: The reshaping of the immune system with age. *Int Rev Immunol* 12:1–4. <https://doi.org/10.3109/08830189509056697>
- Franceschi C, Garagnani P, Morsiani C, et al. (2018a) The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Front Med* 5:. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00061>
- Franceschi C, Garagnani P, Parini P, et al. (2018b) Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol* 14:576–590. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0059-4>
- Franceschi C, Valensin S, Bonafè M, et al. (2000c) The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol* 35:879–896. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00172-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00172-8)
- Franco R, & Cidlowski JA (2012) Glutathione efflux and cell death. *Antioxidants Redox Signal* 17:1694–1713. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4553>
- Frasca D, & Blomberg BB (2011) Aging affects human B cell responses. *J Clin Immunol* 31:430–435. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9501-7>
- Frasca D, Diaz A, Romero M, & Blomberg BB (2017) Ageing and obesity similarly impair antibody responses. *Clin Exp Immunol* 187:64–70. <https://doi.org/10.1111/cei.12824>
- Frasca D, Nguyen D, Riley RL, & Blomberg BB (2003) Effects of aging on proliferation and E47 transcription factor activity induced by different stimuli in murine splenic B cells. *Mech Ageing Dev* 124:361–369. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(03)00009-5)
- Frick KM, Burlingame LA, Arters JA, & Berger-Sweeney J (2000) Reference memory, anxiety and estrous cycling in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience* 95:293–307. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00418-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00418-2)
- Fridovich I (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* (80-) 201:875–880. <https://doi.org/10.1126/science.210504>
- Fulop T, Larbi A, Douziech N, et al. (2004) Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell* 3:217–226. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00110.x>
- Fulop T, Larbi A, Kotb R, et al. (2011) Aging, Immunity, and Cancer. *Discov Med* 11:537–50
- Gala RR, & Daughaday WH (1991) Prolactin and Growth Hormone in the Regulation of the Immune System. *Proc Soc Exp Biol Med* 198:513–527. <https://doi.org/10.3181/00379727-198-43286B>
- Garagna S, Zuccotti M, Capanna E, & Redi CA (2002) High-resolution organization of mouse telomeric and pericentromeric DNA. *Cytogenet Genome Res* 96:125–129. <https://doi.org/10.1159/000063028>
- Garinis GA, van der Horst GTJ, Vijg J, & Hoeijmakers JHJ (2008) DNA damage and ageing: New-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol* 10:1241–1247. <https://doi.org/10.1038/ncb1108-1241>
- Garrido A (2018) Caracterización neuroinmunoendocrina de modelos de envejecimiento prematuro en ratón. Efecto del ambiente social. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid
- Garrido A, Cruces J, Ceprián N, et al. (2018) Premature aging in behavior and immune functions in tyrosine hydroxylase haploinsufficient female mice. A longitudinal study. *Brain Behav Immun* 69:440–455. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.01.003>
- Garrido A, De la Serna M, De la Fuente M, et al. (2021) Neuronal and glial region dependent changes in female mice from a model of premature aging. *Exp Gerontol* 111224. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111224>
- Gentile NT, Seftchick MW, Huynh T, et al. (2006) Decreased mortality by normalizing blood glucose after acute ischemic stroke. *Acad Emerg Med* 13:174–180. <https://doi.org/10.1197/j.aem.2005.08.009>
- Gialluisi A, Di Castelnuovo A, Donati MB, et al. (2019) Machine Learning Approaches for the Estimation of Biological Aging: The Road Ahead for Population Studies. *Front Med* 6:. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00146>
- Gilad GM, & Gilad VH (1995) Strain, stress, neurodegeneration and longevity. *Mech Ageing Dev* 78:75–83. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(94\)01529-U](https://doi.org/10.1016/0047-6374(94)01529-U)

- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, & Offen D (2001) Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40:959–975. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00019-3)
- Giménez-Llort L, Maté I, Manassra R, et al. (2012) Peripheral immune system and neuroimmune communication impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1262:74–84. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06639.x>
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, et al. (1999) The immune system in the elderly: III. Innate immunity. *Immunol Res* 20:117–126. <https://doi.org/10.1007/BF02786468>
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, et al. (2001) Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: Quantitative flow cytometric analysis. *Am J Hematol* 67:63–72. <https://doi.org/10.1002/ajh.1082>
- Gioiosa L, Fissore E, Ghirardelli G, et al. (2007) Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm Behav* 52:307–316. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.05.006>
- Gisselsson D (2008) Classification of chromosome segregation errors in cancer. *Chromosoma* 117:511–519. <https://doi.org/10.1007/s00412-008-0169-1>
- Gisselsson D, Shao C, Tuck-Muller CM, et al. (2005) Interphase chromosomal abnormalities and mitotic missegregation of hypomethylated sequences in ICF syndrome cells. *Chromosoma* 114:118–126. <https://doi.org/10.1007/s00412-005-0343-7>
- Globerson A, & Effros RB (2000) Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today* 21:515–521. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01714-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01714-X)
- Goel N, Workman JL, Lee TT, et al. (2014) Sex differences in the HPA axis. *Compr Physiol* 4:1121–1155. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130054>
- Goetz CG, Poewe W, Rascol O, et al. (2004) Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: Status and recommendations. *Mov Disord* 19:1020–1028. <https://doi.org/10.1002/mds.20213>
- Gomez CR, Nomellini V, Faunce DE, & Kovacs EJ (2008) Innate immunity and aging. *Exp Gerontol* 43:718–728. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.05.016>
- Goyens MH (2002) Genes, telomeres and mammalian ageing. *Mech Ageing Dev* 123:791–799. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00424-9](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00424-9)
- Granger M, & Eck P (2018) Dietary Vitamin C in Human Health. In: *Advances in Food and Nutrition Research*, 1st edn. Elsevier Inc., pp 281–310
- Gredilla R, & Barja G (2005) Minireview: The Role of Oxidative Stress in Relation to Caloric Restriction and Longevity. *Endocrinology* 146:3713–3717. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0378>
- Greenamyre JT, & Hastings TG (2004) BIOMEDICINE: Parkinson's--Divergent Causes, Convergent Mechanisms. *Science* (80-) 304:1120–1122. <https://doi.org/10.1126/science.1098966>
- Grozdanov V, Bliederauser C, Ruf WP, et al. (2014) Inflammatory dysregulation of blood monocytes in Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol* 128:651–663. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1345-4>
- Guayerbas N (2003) Cambios con la edad en la función inmune en un modelo murino de envejecimiento prematuro. Efecto de los antioxidantes. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid
- Guayerbas N, Catalán M, Víctor VM, et al. (2002) Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* 134:41–48. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00449-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00449-1)
- Guayerbas N, & De la Fuente M (2003) An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol* 27:339–350. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00103-9](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00103-9)
- Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, & de la Fuente M (2004) Improvement of the macrophage functions in prematurely ageing mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50 Online:
- Guenatri M, Bailly D, Maison C, & Almouzni G (2004) Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J Cell Biol* 166:493–505.

- <https://doi.org/10.1083/jcb.200403109>
- Guo X, Ni J, Liang Z, et al. (2019) The molecular origins and pathophysiological consequences of micronuclei: New insights into an age-old problem. *Mutat Res - Rev Mutat Res* 779:1–35. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.11.001>
- Haarhuis JHI, Elbatsh AMO, Broek B Van Den, et al. (2013) WAPL-mediated removal of cohesin protects against segregation errors and aneuploidy. *Curr Biol* 23:2071–2077. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.003>
- Haber F, & Weiss J (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc London Ser A - Math Phys Sci* 147:332–351. <https://doi.org/10.1098/rspa.1934.0221>
- Hajishengallis G (2010) Too old to fight? Aging and its toll on innate immunity. *Mol Oral Microbiol* 25:25–37. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2009.00562.x>
- Halliwell B (1992) Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *J Neurochem* 59:1609–1623. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x>
- Halliwell B, & Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1–14. <https://doi.org/10.1042/bj2190001>
- Halloran J, Hussong SA, Burbank R, et al. (2012) Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin by rapamycin modulates cognitive and non-cognitive components of behavior throughout lifespan in mice. *Neuroscience* 223:102–113. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.054>
- Harman D (1956) Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol* 11:298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Harman D (1972) The Biologic Clock: The Mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 20:145–147. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1972.tb00787.x>
- Harman D (1992) Free radical theory of aging. *Mutat Res DNAGing* 275:257–266. [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(92\)90030-S](https://doi.org/10.1016/0921-8734(92)90030-S)
- Harper JM, Galecki AT, Burke DT, & Miller RA (2004) Body weight, hormones and T cell subsets as predictors of life span in genetically heterogeneous mice. *Mech Ageing Dev* 125:381–390. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.03.003>
- Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, et al. (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460:392–395. <https://doi.org/10.1038/nature08221>
- Harrison R (2004) Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev* 36:363–375. <https://doi.org/10.1081/DMR-120037569>
- Hauser DN, & Hastings TG (2013) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis* 51:35–42. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.10.011>
- Hayflick L (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37:614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Hayflick L (2007) Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* 1100:1–13. <https://doi.org/10.1196/annals.1395.001>
- Hazelton GA, & Lang CA (1980) Glutathione contents of tissues in the aging mouse. *Biochem J* 188:25–30. <https://doi.org/10.1042/bj1880025>
- Hazkani-Covo E, Zeller RM, & Martin W (2010) Molecular poltergeists: Mitochondrial DNA copies (numts) in sequenced nuclear genomes. *PLoS Genet* 6:. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000834>
- Heck AL, & Handa RJ (2019) Sex differences in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis' response to stress: an important role for gonadal hormones. *Neuropsychopharmacology* 44:45–58. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0167-9>
- Hernanz A, Collazos ME, & De la Fuente M (1990) Effect of age, culture medium and lymphocyte presence on ascorbate content of peritoneal macrophages from mice and Guinea pigs during phagocytosis. *Int Arch Allergy Immunol* 91:166–170. <https://doi.org/10.1159/000235109>
- Hintzsche H, Hemmann U, Poth A, et al. (2017) Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutat Res - Rev Mutat Res* 771:85–98. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.02.002>

- Hirsch EC, & Hunot S (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8:382–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70062-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70062-6)
- Hissin PJ, & Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74:214–226. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)
- Homma T, & Fujii J (2015) Application of Glutathione as Anti-Oxidative and Anti-Aging Drugs. *Curr Drug Metab* 16:560–571. <https://doi.org/10.2174/1389200216666151015114515>
- Hooten NN, Fitzpatrick M, Wood WH, et al. (2013) Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging (Albany NY)* 5:725–740. <https://doi.org/10.18632/aging.100603>
- Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 14:R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
- Horvath S, & Raj K (2018) DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet* 19:371–384. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3>
- Hou Y, Dan X, Babbar M, et al. (2019) Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 15:565–581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- Howell WH (1890) The life-history of the formed elements of the blood, especially the red blood corpuscles. *J Morphol* 4:57–116. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050040105>
- Huang CY, Grünheit N, Ahmadinejad N, et al. (2005) Mutational decay and age of chloroplast and mitochondrial genomes transferred recently to angiosperm nuclear chromosomes. *Plant Physiol* 138:1723–1733. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060327>
- Huerta JM, González S, Fernández S, et al. (2006) Lipid peroxidation, antioxidant status and survival in institutionalised elderly: A five-year longitudinal study. *Free Radic Res* 40:571–578. <https://doi.org/10.1080/10715760600580470>
- Hung AL, Lim M, & Doshi TL (2017) Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain. *Scand J Pain* 17:287–293. <https://doi.org/10.1016/j.sjpain.2017.08.002>
- Hunsche C, Martínez de Toda I, & De la Fuente M (2019) Impacts of the late adulthood diet-induced obesity onset on behavior, immune function, redox state and life span of male and female mice. *Brain Behav Immun* 78:65–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.01.010>
- Hwang O (2013) Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol* 22:11–17. <https://doi.org/10.5607/en.2013.22.1.11>
- Iannitti T, & Palmieri B (2011) Inflammation and Genetics: An Insight in the Centenarian Model. *Hum Biol* 83:531–559. <https://doi.org/10.3378/027.083.0407>
- Ide K, Yamada H, Umegaki K, et al. (2015) Lymphocyte vitamin C levels as potential biomarker for progression of Parkinson's disease. *Nutrition* 31:406–408. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.08.001>
- Ighodaro OM, & Akinloye OA (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med* 54:287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, & Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 19:4780. <https://doi.org/10.1093/nar/19.17.4780>
- Ilic T V, Jovanovic M, Jovicic A, & Tomovic M (1999) Oxidative stress indicators are elevated in de novo Parkinson's disease patients. *Funct Neurol* 14:141–7
- INE (2020) Proporción de personas mayores de cierta edad por provincia. In: Inst. Nac. Estadística. <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=1488#!tabs-tabla>. Accessed 22 Jun 2020
- Ingram DK, Archer JR, Harrison DE, & Reynolds MA (1982) Physiological and behavioral correlates of lifespan in aged C57BL/6J mice. *Exp Gerontol* 17:295–303. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(82\)90019-5](https://doi.org/10.1016/0531-5565(82)90019-5)
- Izgüt-Uysal VN, Ağaç A, Karadoğan I, & Derin N (2003) Effects of L-carnitine on neutrophil functions in aged rats. *Mech Ageing Dev* 124:341–347. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(03\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(03)00004-6)

- Jackaman C, Tomay F, Duong L, et al. (2017) Aging and cancer: The role of macrophages and neutrophils. *Ageing Res Rev* 36:105–116. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.03.008>
- Janda E, Isidoro C, Carresi C, & Mollace V (2012) Defective autophagy in Parkinson's disease: Role of oxidative stress. *Mol Neurobiol* 46:639–661. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8318-1>
- Jara EL, Muñoz-Durango N, Llanos C, et al. (2017) Modulating the function of the immune system by thyroid hormones and thyrotropin. *Immunol Lett* 184:76–83. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.02.010>
- Jensen H, Engedal H, & Saetersdal TS (1976) Ultrastructure of mitochondria-containing nuclei in human myocardial cells. *Virchows Arch B* 21:1–12. <https://doi.org/10.1007/bf02899139>
- Johnson AA, & Stolzing A (2019) The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease. *Aging Cell* 18:1–26. <https://doi.org/10.1111/acer.13048>
- Jomova K, Baros S, & Valko M (2012) Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. *Transit Met Chem* 37:127–134. <https://doi.org/10.1007/s11243-012-9583-6>
- Jones KH, York TP, & Jackson-Cook C (2012) Mechanisms leading to the formation of micronuclei containing sex chromosomes differ with age. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 747:207–217. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.05.004>
- Joshi N, & Singh S (2018) Updates on immunity and inflammation in Parkinson disease pathology. *J Neurosci Res* 96:379–390. <https://doi.org/10.1002/jnr.24185>
- Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, et al. (2004) Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med* 25:5–16. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.003>
- Kallman F, Jarvik L, & Birren J (1959) Handbook of ageing and the individual
- Kalueff A V, & Tuohimaa P (2005) Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *Eur J Pharmacol* 508:147–153. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.11.054>
- Kand'ár R (2016) The ratio of oxidized and reduced forms of selected antioxidants as a possible marker of oxidative stress in humans. *Biomed Chromatogr* 30:13–28. <https://doi.org/10.1002/bmc.3529>
- Kanfi Y, Naiman S, Amir G, et al. (2012) The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature* 483:218–221. <https://doi.org/10.1038/nature10815>
- Kannarkat GT, Boss JM, & Tansey MG (2013) The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 3:493–514. <https://doi.org/10.3233/JPD-130250>
- Kanungo MS (1975) A model for ageing. *J Theor Biol* 53:253–261. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(75\)80002-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(75)80002-6)
- Karrer TM, McLaughlin CL, Guaglianone CP, & Samanez-Larkin GR (2019) Reduced serotonin receptors and transporters in normal aging adults: a meta-analysis of PET and SPECT imaging studies. *Neurobiol Aging* 80:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.03.021>
- Kasapoglu M, & Özben T (2001) Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol* 36:209–220. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00198-4)
- Kassed CA, & Herkenham M (2004) NF-κB p50-deficient mice show reduced anxiety-like behaviors in tests of exploratory drive and anxiety. *Behav Brain Res* 154:577–584. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.03.026>
- Kaszubowska L, Dettlaff-Pokora A, Hak L, et al. (2008) Successful ageing of nonagenarians is related to the sensitivity of NK cells to activation. In: *Journal of Physiology and Pharmacology*. pp 187–199
- Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, & Mehta JL (2017) Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 19:. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>
- Kaushal D, & Kansal VK (2014) Dahi containing lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum improves phagocytic potential of macrophages in aged mice. *J Food Sci Technol* 51:1147–1153. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0637-8>
- Keller ET, Zhang J, Yao Z, & Qi Y (2001) The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of menopause. *J Reprod Immunol* 50:41–55. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(00\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(00)00087-5)

- Kenyon C, Chang J, Gensch E, et al. (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366:461–464. <https://doi.org/10.1038/366461a0>
- Kidd P (2003) Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8:223–246
- Kim OY, Chae JS, Paik JK, et al. (2012) Effects of aging and menopause on serum interleukin-6 levels and peripheral blood mononuclear cell cytokine production in healthy nonobese women. *Age (Omaha)* 34:415–425. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9244-2>
- Kin NW (2006) It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J Leukoc Biol* 79:1093–1104. <https://doi.org/10.1189/jlb.1105625>
- Kirkwood TBL (2008) Gerontology: Healthy old age. *Nature* 455:739–740. <https://doi.org/10.1038/455739a>
- Kirkwood TBL (2017) Why and how are we living longer? *Exp Physiol* 102:1067–1074. <https://doi.org/10.1113/EP086205>
- Kirkwood TBL, & Rose MR (1991) Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos Trans - R Soc London, B* 332:15–24. <https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0028>
- Kleine T, Maier UG, & Leister D (2009) DNA Transfer from Organelles to the Nucleus: The Idiosyncratic Genetics of Endosymbiosis. *Annu Rev Plant Biol* 60:115–138. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092119>
- Kluger A, Gianutsos JG, Golomb J, et al. (1997) Patterns of Motor Impairment in Normal Aging, Mild Cognitive Decline, and Early Alzheimer' Disease. *Journals Gerontol Ser B Psychol Sci Soc Sci* 52B:P28–P39. <https://doi.org/10.1093/geronb/52B.1.P28>
- Krampis K, Tyler BM, & Boore JL (2006) Extensive variation in nuclear mitochondrial DNA content between the genomes of *Phytophthora sojae* and *Phytophthora ramorum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:1329–1336. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1329>
- Kristal BS, Chen J, & Yu BP (1994) Sensitivity of mitochondrial transcription to different free radical species. *Free Radic Biol Med* 16:323–329. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90033-7)
- Kuhla A, Blei T, Jaster R, & Vollmar B (2011) Aging is associated with a shift of fatty metabolism toward lipogenesis. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 66 A:1192–1200. <https://doi.org/10.1093/gerona/glr124>
- Kumar R, & Burns EA (2008) Age-related decline in immunity: implications for vaccine responsiveness. *Expert Rev Vaccines* 7:467–479. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.4.467>
- Kumar R, Joshi G, Kler H, et al. (2018) Toward an Understanding of Structural Insights of Xanthine and Aldehyde Oxidases: An Overview of their Inhibitors and Role in Various Diseases. *Med Res Rev* 38:1073–1125. <https://doi.org/10.1002/med.21457>
- Kurath J, & Mata R (2018) Individual differences in risk taking and endogenous levels of testosterone, estradiol, and cortisol: A systematic literature search and three independent meta-analyses. *Neurosci Biobehav Rev* 90:428–446. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.003>
- Kutsyi MP, Gouliaeva NA, Kuznetsova EA, & Gaziev AI (2005) DNA-binding proteins of mammalian mitochondria. *Mitochondrion* 5:35–44. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.09.002>
- Kuznetsova I, Podgornaya O, & Ferguson-Smith MA (2006) High-resolution organization of mouse centromeric and pericentromeric DNA. *Cytogenet Genome Res* 112:248–255. <https://doi.org/10.1159/000089878>
- Lai JJ, Lai KP, Zeng W, et al. (2012) Androgen receptor influences on body defense system via modulation of innate and adaptive immune systems: Lessons from conditional AR knockout mice. *Am J Pathol* 181:1504–1512. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.008>
- Larson RA (1977) Environmental chemistry of reactive oxygen species. *C R C Crit Rev Environ Control* 8:197–246. <https://doi.org/10.1080/10643387709381663>
- Laurent C, Dorothée G, Hunot S, et al. (2017) Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. *Brain* 140:184–200. <https://doi.org/10.1093/brain/aww270>

- Lawrence RA, & Burk RF (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952–958. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90747-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90747-6)
- Lee YJ, Han SB, Nam SY, et al. (2010) Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res* 33:1539–1556. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-1006-7>
- Leeuwenburgh C, Hansen P, Shaish A, et al. (1998) Markers of protein oxidation by hydroxyl radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 274:R453–R461. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.2.R453>
- Leiter EH, Premdas F, Harrison DE, & Lipson LG (1988) Aging and glucose homeostasis in C57BL/6J male mice. *FASEB J* 2:2807–2811. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2.12.3044905>
- Leposavić G, Perišić M, Kosec D, et al. (2009) Neonatal testosterone imprinting affects thymus development and leads to phenotypic rejuvenation and masculinization of the peripheral blood T-cell compartment in adult female rats. *Brain Behav Immun* 23:294–304. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.11.002>
- Lever C, Burton S, & O'Keefe J (2006) Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev Neurosci* 17:111–133. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2006.17.1-2.111>
- Levite M (2016) Dopamine and T cells: Dopamine receptors and potent effects on T cells, dopamine production in T cells, and abnormalities in the dopaminergic system in T cells in autoimmune, neurological and psychiatric diseases. *Acta Physiol* 216:42–89. <https://doi.org/10.1111/apha.12476>
- Libby P (2012) Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:2045–2051. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179705>
- Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 13:757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Limón-Pacheco J, & Gonsheff ME (2009) The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 674:137–147. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.015>
- Liu H, Wang H, Shen S, et al. (2004) Glutathione Metabolism during Aging and in Alzheimer Disease. *Ann N Y Acad Sci* 1019:346–349. <https://doi.org/10.1196/annals.1297.059>
- Liu RM (2002) Down-regulation of γ -glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene expression in rat brain tissue during aging. *J Neurosci Res* 68:344–351. <https://doi.org/10.1002/jnr.10217>
- Liu X, Mo W, Ye J, et al. (2018) Regulatory T cells trigger effector T cell DNA damage and senescence caused by metabolic competition. *Nat Commun* 9:. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02689-5>
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194–217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lopez J V., Yuhki N, Masuda R, et al. (1994) Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *J Mol Evol* 39:174–190. <https://doi.org/10.1007/BF00163806>
- Lorenz TK, Heiman JR, & Demas GE (2018) Interactions Among Sexual Activity, Menstrual Cycle Phase, and Immune Function in Healthy Women. *J Sex Res* 55:1087–1095. <https://doi.org/10.1080/00224499.2017.1394961>
- Lough AN, Roark LM, Kato A, et al. (2008) Mitochondrial DNA transfer to the nucleus generates extensive insertion site variation in maize. *Genetics* 178:47–55. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.079624>
- Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, et al. (2009) Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* 30:366–373. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.04.003>
- Maarouf CL, Beach TG, Adler CH, et al. (2012) Cerebrospinal fluid biomarkers of neuropathologically diagnosed Parkinson's disease subjects. *Neurol Res* 34:669–676. <https://doi.org/10.1179/1743132812Y.0000000063>

- MacGregor RR, Spagnuolo PJ, & Lentnek AL (1974) Inhibition of Granulocyte Adherence by Ethanol, Prednisone, and Aspirin, Measured with an Assay System. *N Engl J Med* 291:642–646. <https://doi.org/10.1056/nejm197409262911302>
- Machado A, Herrera AJ, De Pablos RM, et al. (2014) Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 25:785–804. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0035>
- Mackie P, Lebowitz J, Saadatpour L, et al. (2018) The dopamine transporter: An unrecognized nexus for dysfunctional peripheral immunity and signaling in Parkinson's Disease. *Brain Behav Immun* 70:21–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.03.020>
- Madamanchi NR, & Runge MS (2013) Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med* 61:473–501. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.001>
- Madden KS (2003) Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity. *Brain Behav Immun* 17:5–10. [https://doi.org/10.1016/S0889-1591\(02\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0889-1591(02)00059-4)
- Magaji MG, Iniaghe LO, Abolarin M, et al. (2017) Neurobehavioural evaluation of resveratrol in murine models of anxiety and schizophrenia. *Metab Brain Dis* 32:437–442. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9927-6>
- Maher P (2005) The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev* 4:288–314. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.02.005>
- Mamoshina P, Kochetov K, Putin E, et al. (2018) Population Specific Biomarkers of Human Aging: A Big Data Study Using South Korean, Canadian, and Eastern European Patient Populations. *Journals Gerontol Ser A* 73:1482–1490. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly005>
- Mangas-Losada A, García-García R, Urios A, et al. (2017) Minimal hepatic encephalopathy is associated with expansion and activation of CD4+CD28-, Th22 and Tfh and B lymphocytes. *Sci Rep* 7:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05938-1>
- Manuelidis L (1978) Chromosomal localization of complex and simple repeated human DNAs. *Chromosoma* 66:23–32. <https://doi.org/10.1007/BF00285813>
- Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, & Spadari-Bratfisch RC (2001) Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav* 74:435–440. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00593-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00593-5)
- Mariani E, Pulsatelli L, Meneghetti A, et al. (2001) Different IL-8 production by T and NK lymphocytes in elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 122:1383–1395. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00270-6](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00270-6)
- Marrot L, Jones C, Perez P, & Meunier JR (2008) The significance of Nrf2 pathway in (photo)-oxidative stress response in melanocytes and keratinocytes of the human epidermis. *Pigment Cell Melanoma Res* 21:79–88. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2007.00424.x>
- Martignoni M, Groothuis GMM, & de Kanter R (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2:875–894. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.6.875>
- Martín-Jiménez R, Lurette O, & Hebert-Chatelain E (2020) Damage in mitochondrial DNA associated with parkinson's disease. *DNA Cell Biol* 39:1421–1430. <https://doi.org/10.1089/dna.2020.5398>
- Martínez-Cisuelo V, Gómez J, García-Junceda I, et al. (2016) Rapamycin reverses age-related increases in mitochondrial ROS production at complex I, oxidative stress, accumulation of mtDNA fragments inside nuclear DNA, and lipofuscin level, and increases autophagy, in the liver of middle-aged mice. *Exp Gerontol* 83:130–138. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.08.002>
- Martínez-Romero R, Cañuelo A, Martínez-Lara E, et al. (2006) Aging affects but does not eliminate the enzymatic antioxidative response to hypoxia/reoxygenation in cerebral cortex. *Exp Gerontol* 41:25–31. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.09.009>
- Martínez de Toda I, & De la Fuente M (2015) The role of Hsp70 in oxi-inflamm-aging and its use as a potential biomarker of lifespan. *Biogerontology* 16:709–721. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9607-7>
- Martínez de Toda I, Garrido A, Vida C, et al. (2018) Frailty Quantified by the “Valencia Score” as a Potential Predictor of Lifespan in Mice. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 73:1323–1329. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly064>

- Martínez de Toda I, Maté I, Vida C, et al. (2016) Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity. *Aging* (Albany NY) 8:3110–3119. <https://doi.org/10.18632/aging.101116>
- Martínez de Toda I, Miguélez L, Siboni L, et al. (2019a) High perceived stress in women is linked to oxidation, inflammation and immunosenescence. *Biogerontology* 20:823–835. <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09829-y>
- Martínez de Toda I, Vida C, & De la Fuente M (2017) An appropriate modulation of lymphoproliferative response and cytokine release as possible contributors to longevity. *Int J Mol Sci* 18:17–19. <https://doi.org/10.3390/ijms18071598>
- Martínez de Toda I, Vida C, García-Salmones M, et al. (2020) Immune Function, Oxidative, and Inflammatory Markers in Centenarians as Potential Predictors of Survival and Indicators of Recovery After Hospital Admission. *Journals Gerontol Ser A* 75:1827–1833. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz250>
- Martínez de Toda I, Vida C, Garrido A, & De la Fuente M (2019b) Redox Parameters as Markers of the Rate of Aging and Predictors of Life Span. *Journals Gerontol Ser A* 75:613–620. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz033>
- Martínez de Toda I, Vida C, Sanz San Miguel L, & De la Fuente M (2019c) When will my mouse die? Life span prediction based on immune function, redox and behavioural parameters in female mice at the adult age. *Mech Ageing Dev* 182:111125. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.111125>
- Martínez de Toda I, Vida C, Sanz San Miguel L, & De la Fuente M (2019d) Function, oxidative, and inflammatory stress parameters in immune cells as predictive markers of lifespan throughout aging. *Oxid Med Cell Longev* 2019:1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/4574276>
- Martila RJ, Eskola J, Soppi E, & Rinne UK (1985) Immune functions in Parkinson's disease lymphocyte subsets, concanavalin A-induced suppressor cell activity and in vitro immunoglobulin production. *J Neurol Sci* 69:121–131. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(85\)90127-3](https://doi.org/10.1016/0022-510X(85)90127-3)
- Massano J, & Bhatia KP (2012) Clinical Approach to Parkinson's Disease: Features, Diagnosis, and Principles of Management. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a008870–a008870. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008870>
- Massey V, & Williams CH (1965) On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. *J Biol Chem* 240:4470–80
- Maté I (2015) Caracterización de marcadores inmunológicos y de estrés oxidativo en el envejecimiento humano y en un modelo de Alzheimer en ratón. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid
- Maté I, Cruces J, Giménez-Llort L, & De la Fuente M (2015) Function and redox state of peritoneal leukocytes as preclinical and prodromic markers in a longitudinal study of triple-transgenic mice for Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 43:213–226. <https://doi.org/10.3233/JAD-140861>
- Maté I, Madrid J, & Fuente M (2014) Chronobiology of the Neuroimmunoendocrine System and Aging. *Curr Pharm Des* 20:4642–4655. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140130201131>
- Matsuo M, Ito Y, Yamauchi R, & Obokata J (2005) The rice nuclear genome continuously integrates, shuffles, and eliminates the chloroplast genome to cause chloroplast-nuclear DNA flux. *Plant Cell* 17:665–75. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.027706>
- Matsuwaki T, Eskilsson A, Kugelberg U, et al. (2014) Interleukin-1 β induced activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis is dependent on interleukin-1 receptors on non-hematopoietic cells. *Brain Behav Immun* 40:166–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.03.015>
- McCord JM (1993) Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 26:351–357. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(93\)90111-I](https://doi.org/10.1016/0009-9120(93)90111-I)
- McGeer PL, & McGeer EG (2004) Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Park Relat Disord* 10:S3. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2004.01.005>
- McGrew J, Diehl B, & Fitzgerald-Hayes M (1986) Single base-pair mutations in centromere

- element III cause aberrant chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 6:530–538. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.2.530>
- McNaught KSP, Belizaire R, Isacson O, et al. (2003) Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol* 179:38–46. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.8050>
- Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, et al. (2000) Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 28:1243–1248. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00246-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00246-X)
- Medeiros MS, Schumacher-Schuh A, Cardoso AM, et al. (2016) Iron and oxidative stress in Parkinson's disease: An observational study of injury biomarkers. *PLoS One* 11:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146129>
- Medvedev ZA (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65:375–398. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1990.tb01428.x>
- Meites J, Goya R, & Takahashi S (1987) Why the neuroendocrine system is important in aging processes. *Exp Gerontol* 22:1–15. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(87\)90010-6](https://doi.org/10.1016/0531-5565(87)90010-6)
- Meydani SN, Wu D, Santos MS, & Hayek MG (1995) Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am J Clin Nutr* 62:1462S–1476S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1462S>
- Michalovova M, Vyskot B, & Kejnovsky E (2013) Analysis of plastid and mitochondrial DNA insertions in the nucleus (NUPTs and NUMTs) of six plant species: Size, relative age and chromosomal localization. *Heredity (Edinb)* 111:314–320. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.51>
- Migliore L, Coppedè F, Fenech M, & Thomas P (2011) Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. *Mutagenesis* 26:85–92. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq067>
- Migliore L, Petrozzi L, Lucetti C, et al. (2002) Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurology* 58:1809–1815. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.12.1809>
- Mignini F, Sabbatini M, Capacchietti M, et al. (2013) T-cell subpopulations express a different pattern of dopaminergic markers in intra- and extra-thymic compartments. *J Biol Regul Homeost Agents* 27:463–475
- Mihara T, Nakashima M, Kuroiwa A, et al. (2008) Natural killer cells of Parkinson's disease patients are set up for activation: A possible role for innate immunity in the pathogenesis of this disease. *Parkinsonism Relat Disord* 14:46–51. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2007.05.013>
- Miller L, & Hunt JS (1996) Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sci* 59:1–14. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00122-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00122-1)
- Miller RA (1996) The Aging Immune System: Primer and Prospectus. *Science (80-)* 273:70–74. <https://doi.org/10.1126/science.273.5271.70>
- Miller RA (2001) Biomarkers of Aging: Prediction of Longevity by Using Age-Sensitive T-Cell Subset Determinations in a Middle-Aged, Genetically Heterogeneous Mouse Population. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 56:B180–B186. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.4.B180>
- Miller RA, Chrisp C, & Galecki A (1997) CD4 memory T cell levels predict life span in genetically heterogeneous mice. *FASEB J* 11:775–783. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.10.9271362>
- Mills CD (2012) M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. *Crit Rev Immunol* 32:463–488. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v32.i6.10>
- Milman S, Atzmon G, Crandall J, & Barzilai N (2014) Phenotypes and Genotypes of High Density Lipoprotein Cholesterol in Exceptional Longevity. *Curr Vasc Pharmacol* 12:690–697. <https://doi.org/10.2174/1570161111666131219101551>
- Minor RK, Allard JS, Younts CM, et al. (2010) Dietary interventions to extend life span and health span based on calorie restriction. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 65 A:695–703. <https://doi.org/10.1093/gerona/glq042>
- Miquel J (1991) An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr* 12:99–117. [341](https://doi.org/10.1016/0167-</p>
</div>
<div data-bbox=)

- 4943(91)90022-I
- Miquel J (1992) An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat Res* 275:209–216. [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(92\)90024-J](https://doi.org/10.1016/0921-8734(92)90024-J)
- Miquel J (1998) An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: Genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 33:113–126. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(97\)00060-0](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(97)00060-0)
- Miquel J (2006) Integración de teorías del envejecimiento (parte I). *Rev Esp Geriatr Gerontol* 41:55–63. [https://doi.org/10.1016/S0211-139X\(06\)72923-7](https://doi.org/10.1016/S0211-139X(06)72923-7)
- Miquel J, Lundgren PR, & Johnson JE (1978) Spectrophotofluorometric and electron microscopic study of lipofuscin accumulation in the testis of aging mice. *Journals Gerontol* 33:5–19. <https://doi.org/10.1093/geronj/33.1.5>
- Miquel J, & Weber H (1990) *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203713372>
- Mishara B, & Riedel R (2000) El proceso de envejecimiento
- Miura T, Muraoka S, Ikeda N, et al. (2000) Antioxidative and prooxidative action of stilbene derivatives. *Pharmacol Toxicol* 86:203–208. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2000.d01-36.x>
- Miyaji C, Watanabe H, Toma H, et al. (2000) Functional alteration of granulocytes, NK cells, and natural killer T cells in centenarians. *Hum Immunol* 61:908–916. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(00\)00153-1](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(00)00153-1)
- Mizoguchi K, Ikeda R, Shoji H, et al. (2009) Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. *Neuroscience* 159:259–270. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.12.020>
- Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, et al. (1999) The isoprostanes: Unique prostaglandin-like products of free-radical- initiated lipid peroxidation. *Drug Metab Rev* 31:117–139. <https://doi.org/10.1081/DMR-100101910>
- Mota M (1963) Electron Microscope Study of the Relationship between the Nucleus and Mitochondria in *Chlorophytum capense* (L.) Kuntze. *Cytologia (Tokyo)* 28:409–416. <https://doi.org/10.1508/cytologia.28.409>
- Moyaho A, & Valencia J (2002) Grooming and yawning trace adjustment to unfamiliar environments in laboratory Sprague-Dawley rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 116:263–269. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.116.3.263>
- Münch G, Kuhla B, Lüth HJ, et al. (2003) Anti-AGEing defences against Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 31:1397–1399. <https://doi.org/10.1042/bst0311397>
- Nakamura E, & Miyao K (2007) A Method for Identifying Biomarkers of Aging and Constructing an Index of Biological Age in Humans. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 62:1096–1105. <https://doi.org/10.1093/gerona/62.10.1096>
- Navarro A, Gómez C, Sánchez-Pino MJ, et al. (2005) Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 289:1392–1399. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00834.2004>
- Negrini S, Gorgoulis VG, & Halazonetis TD (2010) Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:220–228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- Nergadze SG, Lupotto M, Pellanda P, et al. (2010) Mitochondrial DNA insertions in the nuclear horse genome. *Anim Genet* 41:176–185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02130.x>
- Nguyen K, Kanamori K, Shin CS, et al. (2020) The impact of sex on changes in plasma corticosterone and cotinine levels induced by nicotine in c57bl/6j mice. *Brain Sci* 10:1–14. <https://doi.org/10.3390/brainsci10100705>
- Niki E (1987) Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44:227–253. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(87\)90052-1](https://doi.org/10.1016/0009-3084(87)90052-1)
- Ning FY, Fu J, & Du ZH (2017) Mitochondrial DNA insertions in the nuclear *Capra hircus* genome. *Genet Mol Res* 16:. <https://doi.org/10.4238/gmr16018266>
- Niwa F, Kuriyama N, Nakagawa M, & Imanishi J (2012) Effects of peripheral lymphocyte subpopulations and the clinical correlation with Parkinson's disease. *Geriatr Gerontol Int* 12:102–107. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2011.00740.x>

- Niwa Y, Kasama T, Miyachi Y, & Kanoh T (1989) Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging: Cross-sectional and longitudinal studies. *Life Sci* 44:1655–1664. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(89\)90482-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90482-7)
- Norden DM, & Godbout JP (2013) Review: Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39:19–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01306.x>
- Nordestgaard BG, & Varbo A (2014) Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet* 384:626–635. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61177-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61177-6)
- Norppa H, & Falck GC-M (2003) What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18:221–33
- Norrara B, Fiuza FP, Arrais AC, et al. (2018) Pattern of tyrosine hydroxylase expression during aging of mesolimbic pathway of the rat. *J Chem Neuroanat* 92:83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.05.004>
- Nyberg L (2017) Functional brain imaging of episodic memory decline in ageing. *J Intern Med* 281:65–74. <https://doi.org/10.1111/joim.12533>
- Ohl F, Roedel A, Binder E, & Holsboer F (2003) Impact of high and low anxiety on cognitive performance in a modified hole board test in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Eur J Neurosci* 17:128–136. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02436.x>
- Ohta R, Kumagai F, Marumo H, et al. (2016) Stress-reactive rats (high-avoidance female rats) have a shorter lifespan than stress-nonreactive rats (low-avoidance female rats). *J Toxicol Pathol* 29:77–84. <https://doi.org/10.1293/tox.2015-0045>
- Oishi Y, & Manabe I (2016) Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. *npj Aging Mech Dis* 2:1–8. <https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.18>
- Olanow CW (2007) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease - 2007. *Mov Disord* 22:. <https://doi.org/10.1002/mds.21675>
- Oliva MR, Muñoz P, Vallas V, et al. (1997) Radicales libres y modificación oxidativa del DNA. Implicaciones en la carcinogénesis experimental y humana. *Monogr la Real Acad Nac Farm*. <https://doi.org/es/monoranf.v0i0.372>
- Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy. *J Theor Biol* 41:181–190. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(73\)90198-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90198-7)
- Olpe HR, & Steinmann MW (1982) Age-related decline in the activity of noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus. *Brain Res* 251:174–176. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)91287-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)91287-2)
- Ongrádi J, & Kövesdi V (2010) Factors that may impact on immunosenescence: An appraisal. *Immun Ageing* 7:1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-7-7>
- Orta T, & Günebakan S (2012) The effect of aging on micronuclei frequency and proliferation in human peripheral blood lymphocytes. *Indian J Hum Genet* 18:95–100. <https://doi.org/10.4103/0971-6866.96671>
- Ortega E, Garcia JJ, & De La Fuente M (2000) Ageing modulates some aspects of the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes. *Exp Physiol* 85:519–525. <https://doi.org/10.1111/j.1469-445X.2000.02050.x>
- Ouellette MM (2000) The establishment of telomerase-immortalized cell lines representing human chromosome instability syndromes. *Hum Mol Genet* 9:403–411. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.3.403>
- Pacheco-López G, Niemi MB, Kou W, et al. (2003) Central catecholamine depletion inhibits peripheral lymphocyte responsiveness in spleen and blood. *J Neurochem* 86:1024–1031. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01914.x>
- Palacios R (1982) Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J Immunol* 128:337–342
- Palliyaguru DL, Moats JM, Di Germanio C, et al. (2019) Frailty index as a biomarker of lifespan and healthspan: Focus on pharmacological interventions. *Mech Ageing Dev* 180:42–48. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.03.005>
- Pampalona J, Soler D, Genescà A, & Tusell L (2010) Telomere dysfunction and chromosome structure modulate the contribution of individual chromosomes in abnormal nuclear morphologies. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 683:16–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.10.001>

- Pamplona R, & Barja G (2003) Aging Rate, Mitochondrial Free Radical Production, and Constitutive Sensitivity to Lipid Peroxidation: Insights From Comparative Studies. In: von Zglinicki T (ed) *Aging at the Molecular Level*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 47–64
- Pandey KB, & Rizvi SI (2010) Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev* 3:2–12. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.1.10476>
- Patrushev M, Kasymov V, Patrusheva V, et al. (2004) Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments. *Cell Mol Life Sci* 61:3100–3103. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4424-1>
- Patrushev M, Kasymov V, Patrusheva V, et al. (2006) Release of mitochondrial DNA fragments from brain mitochondria of irradiated mice. *Mitochondrion* 6:43–47. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2005.12.001>
- Pawelec G (2012) Hallmarks of human “immunosenescence”: Adaptation or dysregulation? *Immun Ageing* 9:8–11. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-9-15>
- Pawelec G (2017) Immunosenescence and cancer. *Biogerontology* 18:717–721. <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9682-z>
- Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, et al. (2002) T cells and aging, january 2002 update. *Front Biosci* 7:A831. <https://doi.org/10.2741/A831>
- Perez-Aguilar MC, & Rondon-Mercado R (2018) Neuroimmunoendocrine System in Health and Disease. 1:2–6
- Pérez-Cerezales S, Ramos-Ibeas P, Rizos D, et al. (2018) Early sex-dependent differences in response to environmental stress. *Reproduction* 155:R39–R51. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0466>
- Perry TL, Godin D V., & Hansen S (1982) Parkinson’s disease: A disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci Lett* 33:305–310. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90390-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90390-1)
- Petrozzi L, Lucetti C, Scarpato R, et al. (2002) Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease patients. *Neurol Sci* 23:97–98. <https://doi.org/10.1007/s100720200087>
- Pham-Huy LA, He H, & Pham-Huy C (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4:89–96
- Phelan JP (1992) Genetic variability and rodent models of human aging. *Exp Gerontol* 27:147–159. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(92\)90039-3](https://doi.org/10.1016/0531-5565(92)90039-3)
- Pignolo RJ (2019) Exceptional Human Longevity. *Mayo Clin Proc* 94:110–124. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.10.005>
- Pincemail J, Ricour C, Defraigne JO, & Petermans J (2014) [Oxidative Stress, Antioxydants and the Ageing Process] - PubMed
- Pitychoutis PM, & Papadopoulou-Daifoti Z (2010) Of depression and immunity: Does sex matter? *Int J Neuropsychopharmacol* 13:675–689. <https://doi.org/10.1017/S1461145710000465>
- Pomaki M, Mota J, De la Fuente M, & Berger J (2005) Effects of thiolic antioxidants on in vitro mouse peritoneal macrophage functions. *Comp Clin Path* 13:176–181. <https://doi.org/10.1007/s00580-005-0545-7>
- Poulianiti KP, Kaltsatou A, Mitrou GI, et al. (2016) Systemic Redox Imbalance in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review. *Oxid Med Cell Longev* 2016:. <https://doi.org/10.1155/2016/8598253>
- Prigione A, Begni B, Galbusera A, et al. (2006) Oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson’s disease: Negative correlation with levodopa dosage. *Neurobiol Dis* 23:36–43. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.01.013>
- Prigione A, Isaías IU, Galbusera A, et al. (2009) Increased oxidative stress in lymphocytes from untreated Parkinson’s disease patients. *Park Relat Disord* 15:327–328. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.05.013>
- Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, & Steeves TDL (2014) The prevalence of Parkinson’s disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 29:1583–1590. <https://doi.org/10.1002/mds.25945>

- Puerto M, Guayerbas N, Álvarez P, & De La Fuente M (2005) Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol* 165:33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.03.021>
- Putin E, Mamoshina P, Aliper A, et al. (2016) Deep biomarkers of human aging: Application of deep neural networks to biomarker development. *Aging (Albany NY)* 8:1021–1033. <https://doi.org/10.18632/aging.100968>
- Qin X-Y, Zhang S-P, Cao C, et al. (2016) Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease. *JAMA Neurol* 73:1316. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.2742>
- Qiu YH, Cheng C, Dai L, & Peng YP (2005) Effect of endogenous catecholamines in lymphocytes on lymphocyte function. *J Neuroimmunol* 167:45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.06.007>
- Ransohoff RM (2016) How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science (80-)* 353:777–783. <https://doi.org/10.1126/science.aag2590>
- Rattan SIS (1995) Gerontogenes: real or virtual? *FASEB J* 9:284–286. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.2.7781932>
- Rattan SIS (2019) Homeostasis, homeodynamics and aging. *Encycl Biomed Gerontol* 238–241. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11425-4>
- Ray D, & Yung R (2018) Immune senescence, epigenetics and autoimmunity. *Clin Immunol* 196:59–63. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.04.002>
- Ray MA, Johnston NA, Verhulst S, et al. (2010) Identification of markers for imminent death in mice used in longevity and aging research. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 49:282–288
- Razzoli M, Nyuyki-Dufe K, Gurney A, et al. (2018) Social stress shortens lifespan in mice. *Aging Cell* 17:. <https://doi.org/10.1111/accel.12778>
- Reale M, Iarlori C, Thomas A, et al. (2009) Peripheral cytokines profile in Parkinson’s disease. *Brain Behav Immun* 23:55–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.07.003>
- Rebrin I, Kamzalov S, & Sohal RS (2003) Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radic Biol Med* 35:626–635. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00388-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00388-5)
- Reiche EM, Odebrecht S, Nunes V, & Morimoto HK (2004) For personal use. Only reproduce with permission from Elsevier Ltd 617 Stress, depression, the immune system, and cancer. *Oncology* 5:617–625. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01597-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01597-9)
- Reiter RJ (1992) The ageing pineal gland and its physiological consequences. *BioEssays* 14:169–175. <https://doi.org/10.1002/bies.950140307>
- Ricchetti M, Fairhead C, & Dujon B (1999) Mitochondrial DNA repairs double-strand breaks in yeast chromosomes. *Nature* 402:96–100. <https://doi.org/10.1038/47076>
- Richly E, & Leister D (2004) NUMTs in Sequenced Eukaryotic Genomes. *Mol Biol Evol* 21:1081–1084. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh110>
- Richter C (1987) Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids* 44:175–189. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(87\)90049-1](https://doi.org/10.1016/0009-3084(87)90049-1)
- Richter C (1988) Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett* 241:1–5. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81018-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81018-4)
- Richter C (1997) Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and respiration. *Biosci Rep* 17:53–66. <https://doi.org/10.1023/A:1027387301845>
- Rikans LE, & Hornbrook KR (1997) Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1362:116–127. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(97\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(97)00067-7)
- Ristow M, & Schmeisser K (2014) Mitohormesis: Promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS). *Dose-Response* 12:288–341. <https://doi.org/10.2203/dose-response.13-035.Ristow>
- Rivera A, Vanzuli I, Julio Rodríguez Arellano J, & Butt A (2016) Decreased Regenerative Capacity of Oligodendrocyte Progenitor Cells (NG2-Glia) in the Ageing Brain: A Vicious Cycle of Synaptic Dysfunction, Myelin Loss and Neuronal Disruption? *Curr Alzheimer Res* 13:413–418. <https://doi.org/10.2174/1567205013666151116125518>

- Rizvi SI, & Maurya PK (2007) Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. *Mol Biotechnol* 37:58–61. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0048-7>
- Robertson HT, Smith DL, Pajewski NM, et al. (2011) Can rodent longevity studies be both short and powerful? *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 66 A:279–286. <https://doi.org/10.1093/gerona/glq190>
- Rodgers RJ, & Cole JC (1993) Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol Behav* 54:729–736. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90084-S](https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90084-S)
- Rodgers RJ, & Johnson NJT (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52:297–303. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00138-M](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00138-M)
- Rodley CDM, Grand RS, Gehlen LR, et al. (2012) Mitochondrial-nuclear DNA interactions contribute to the regulation of nuclear transcript levels as part of the inter-organellar communication system. *PLoS One* 7:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030943>
- Rodriguez-Diaz R, Abdulreda MH, Formoso AL, et al. (2011) Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. *Cell Metab* 14:45–54. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.05.008>
- Rodriguez JM, Monsalves-Alvarez M, Henriquez S, et al. (2016) Glucocorticoid resistance in chronic diseases. *Steroids* 115:182–192. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.09.010>
- Rossi MID, Yokota T, Medina KL, et al. (2003) B lymphopoiesis is active throughout human life, but there are developmental age-related changes. *Blood* 101:576–584. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-03-0896>
- Roush W (1996) Live long and prosper? *Science* (80-) 273:42. <https://doi.org/10.1126/science.273.5271.42>
- Roved J, Westerdahl H, & Hasselquist D (2017) Sex differences in immune responses: Hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. *Horm Behav* 88:95–105. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.11.017>
- Saeed M, Berlin RM, & Cruz TD (2012) Exploring the utility of genetic markers for predicting biological age. *Leg Med* 14:279–285. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2012.05.003>
- Safaiyan S, Kannaiyan N, Snaidero N, et al. (2016) Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging. *Nat Neurosci* 19:995–998. <https://doi.org/10.1038/nn.4325>
- Saito Y, Akazawa-Ogawa Y, Matsumura A, et al. (2016) Oxidation and interaction of DJ-1 with 20S proteasome in the erythrocytes of early stage Parkinson's disease patients. *Sci Rep* 6:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep30793>
- Salman H, Bergman M, Djaldetti R, et al. (1999) Decreased phagocytic function in patients with Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother* 53:146–148. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(99\)80080-8](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(99)80080-8)
- Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, et al. (1998) Glutathione in Human Plasma: Decline in Association with Aging, Age-Related Macular Degeneration, and Diabetes. *Free Radic Biol Med* 24:699–704. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00286-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00286-4)
- Sandhu SK, & Kaur G (2002) Alterations in oxidative stress scavenger system in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontology* 3:161–173. <https://doi.org/10.1023/A:1015643107449>
- Sandstrom BE, & Marklund SL (1990) Effects of variation in glutathione peroxidase activity on DNA damage and cell survival in human cells exposed to hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide. *Biochem J* 271:17–23. <https://doi.org/10.1042/bj2710017>
- Sanson P, Vescovini R, Fagnoni F, et al. (2008) The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol* 43:61–65. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.06.008>
- Santulli G, & Iaccarino G (2013) Pinpointing beta adrenergic receptor in ageing pathophysiology: Victim or executioner? Evidence from crime scenes. *Immun Ageing* 10:1–13. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-10>
- Sanyal J, Bandyopadhyay SK, Banerjee TK, et al. (2009) Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 13:129–132
- Sanz A, Caro P, Ibañez J, et al. (2005) Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at Complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *J Bioenerg*

- Biomembr 37:83–90. <https://doi.org/10.1007/s10863-005-4131-0>
- Sasaki T, Senda M, Kim S ni, et al. (2001) Age-related changes of glutathione content, glucose transport and metabolism, and mitochondrial electron transfer function in mouse brain. *Nucl Med Biol* 28:25–31. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(00\)00180-3](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(00)00180-3)
- Sastre J, Pallardó F V., & Viña J (2003) The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med* 35:1–8. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00184-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00184-9)
- Savina A, & Amigorena S (2007) Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219:143–156. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x>
- Scalzo P, de Miranda AS, Guerra Amaral DC, et al. (2011) Serum Levels of Chemokines in Parkinson's Disease. *Neuroimmunomodulation* 18:240–244. <https://doi.org/10.1159/000323779>
- Schieber M, & Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 24:R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schon EA, Dimauro S, & Hirano M (2012) Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* 13:878–890. <https://doi.org/10.1038/nrg3275>
- Schultz MB, Kane AE, Mitchell SJ, et al. (2020) Age and life expectancy clocks based on machine learning analysis of mouse frailty. *Nat Commun* 11:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18446-0>
- Seals DR, Justice JN, & Larocca TJ (2016) Physiological geroscience: Targeting function to increase healthspan and achieve optimal longevity. *J Physiol* 594:2001–2024. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.282665>
- Segerstrom SC, & Miller GE (2004) Psychological stress and the human immune system: A meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull* 130:601–630. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.130.4.601>
- Sekhar R V., Patel SG, Guthikonda AP, et al. (2011) Deficient synthesis of glutathione underlies oxidative stress in aging and can be corrected by dietary cysteine and glycine supplementation. *Am J Clin Nutr* 94:847–853. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.003483>
- Seo E, Kang H, Choi H, et al. (2019) Reactive oxygen species-induced changes in glucose and lipid metabolism contribute to the accumulation of cholesterol in the liver during aging. *Aging Cell* 18:1–11. <https://doi.org/10.1111/acel.12895>
- Serna E, Gambini J, Borrás C, et al. (2012) Centenarians, but not octogenarians, up-regulate the expression of microRNAs. *Sci Rep* 2:1–6. <https://doi.org/10.1038/srep00961>
- Serra JA, Domínguez RO, de Lustig ES, et al. (2001) Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients. *J Neural Transm* 108:1135–48. <https://doi.org/10.1007/s007020170003>
- Sevini F, Giuliani C, Vianello D, et al. (2014) MtDNA mutations in human aging and longevity: Controversies and new perspectives opened by high-throughput technologies. *Exp Gerontol* 56:234–244. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.022>
- Shao MJ, Zhu YJ, Qiu YE, et al. (2017) Changes in the Level of Immunoglobulins and CD4/CD8 Ratio in Young and Aged Mice with Estradiol Deficiency. *Immunol Invest* 46:305–313. <https://doi.org/10.1080/08820139.2016.1267203>
- Sharma A, Gupta P, & Prabhakar PK (2019) Endogenous Repair System of Oxidative Damage of DNA. *Curr Chem Biol* 13:110–119. <https://doi.org/10.2174/2212796813666190221152908>
- Shaw AC, Goldstein DR, & Montgomery RR (2013) Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13:875–887. <https://doi.org/10.1038/nri3547>
- Shi DD, Huang YH, Lai CSW, et al. (2019) Chemotherapy-Induced Cognitive Impairment Is Associated with Cytokine Dysregulation and Disruptions in Neuroplasticity. *Mol Neurobiol* 56:2234–2243. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1224-4>
- Shin MH, Rhie G, Kim YK, et al. (2005) H₂O₂ accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 125:221–229. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23823.x>
- Sibaii H, El-Zayat SR, & Khalil M (2020) When wrinkles appear on the immune system can it be reversed? *Eur Cytokine Netw* 31:1–17. <https://doi.org/10.1684/ecn.2020.0441>

- Simell B, Vuorela A, Ekström N, et al. (2011) Aging reduces the functionality of anti-pneumococcal antibodies and the killing of *Streptococcus pneumoniae* by neutrophil phagocytosis. *Vaccine* 29:1929–1934. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.121>
- Simon H-U, Haj-Yehia A, & Levi-Schaffer F (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5:415–418. <https://doi.org/10.1023/a:1009616228304>
- Sinclair DA (2005) Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev* 126:987–1002. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.03.019>
- Singh KK, Choudhury AR, & Tiwari HK (2017) Numtogenesis as a mechanism for development of cancer. *Semin Cancer Biol* 47:101–109. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.05.003>
- Slee RB, Steiner CM, Herbert BS, et al. (2012) Cancer-associated alteration of pericentromeric heterochromatin may contribute to chromosome instability. *Oncogene* 31:3244–3253. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.502>
- Sofic E, Lange KW, Jellinger K, & Riederer P (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 142:128–130. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90355-B](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90355-B)
- Sohal RS, & Allen RG (1990) Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp Gerontol* 25:499–522. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(90\)90017-V](https://doi.org/10.1016/0531-5565(90)90017-V)
- Sohal RS, & Sohal BH (1991) Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging. *Mech Ageing Dev* 57:187–202. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(91\)90034-W](https://doi.org/10.1016/0047-6374(91)90034-W)
- Solana R, Pawelec G, & Tarazona R (2006) Aging and Innate Immunity. *Immunity* 24:491–494. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.05.003>
- Solerte SB, Fioravanti M, Pascale A, et al. (1998) Increased natural killer cell cytotoxicity in Alzheimer's disease may involve protein kinase C dysregulation. *Neurobiol Aging* 19:191–199. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(98\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(98)00050-5)
- Song S, Pursell ZF, Copeland WC, et al. (2005) DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4990–4995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500253102>
- Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, et al. (2014) Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods* 11:629–632. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2935>
- Srettabunjong S, Satitsri S, Thongnoppakhun W, & Tirawanchai N (2014) The study on telomere length for age estimation in a Thai population. *Am J Forensic Med Pathol* 35:148–153. <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000095>
- Stamler J, Daviglus ML, Garside DB, et al. (2000) Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *J Am Med Assoc* 284:311–318. <https://doi.org/10.1001/jama.284.3.311>
- Stankovic M, Mladenovic D, Ninkovic M, et al. (2013) Effects of caloric restriction on oxidative stress parameters. *Gen Physiol Biophys* 32:277–283. https://doi.org/10.4149/gpb_2013027
- Stefanski V, & Grüner S (2006) Gender difference in basal and stress levels of peripheral blood leukocytes in laboratory rats. *Brain Behav Immun* 20:369–377. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2005.11.001>
- Steimer T (2002) The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci* 4:231–249. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2002.4.3/tsteimer>
- Stichel CC, & Luebbert H (2007) Inflammatory processes in the aging mouse brain: Participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiol Aging* 28:1507–1521. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.07.022>
- Stirone C, Duckles SP, Krause DN, & Procaccio V (2005) Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol Pharmacol* 68:959–965. <https://doi.org/10.1124/mol.105.014662>
- Stone DK, Reynolds AD, Mosley RL, & Gendelman HE (2009) Innate and Adaptive Immunity for the Pathobiology of Parkinson's Disease. *Antioxid Redox Signal* 11:2151–2166. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2460>
- Strehler BL (1977) Time, cells, and aging. Academic Press

- Strehler BL (2000) Understanding Aging. In: Aging Methods and Protocols. Humana Press, New Jersey, pp 1–19
- Sturman O, Germain PL, & Bohacek J (2018) Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress* 21:443–452. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>
- Subhashini N, Thangathirupathi A, & Lavanya N (2011) Antioxidant activity of *Trigonella foenum graecum* using various in vitro and ex vivo models. *Int J Pharm Pharm Sci* 3:96–102
- Sun H, Sun C, & Tian Z (2017) Practical Immunodermatology. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-024-0902-4>
- Suzuki Y, & Ono Y (1999) Involvement of reactive oxygen species produced via NADPH oxidase in tyrosine phosphorylation in human B- and T-lineage lymphoid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 255:262–267. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0188>
- Swindell WR, Harper JM, & Miller RA (2008) How Long Will My Mouse Live? Machine Learning Approaches for Prediction of Mouse Life Span. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 63:895–906. <https://doi.org/10.1093/gerona/63.9.895>
- Szilard L (1959) A theory of ageing. *Nature* 184:957–958. <https://doi.org/10.1038/184957a0>
- Taanman JW (1999) The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1410:103–123. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00161-3)
- Takao H, Hayashi N, & Ohtomo K (2012) A longitudinal study of brain volume changes in normal aging. *Eur J Radiol* 81:2801–2804. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2011.10.011>
- Takeda H, Tsuji M, & Matsumiya T (1998) Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* 350:21–29. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00223-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00223-4)
- Tanaka T (2015) Sex differences in exploratory behaviour of laboratory CD-1 mice (*Mus musculus*). *Scand J Lab Anim Sci* 41:1–6
- Tanase M, Urbanska AM, Zolla V, et al. (2016) Role of carbonyl modifications on aging-associated protein aggregation. *Sci Rep* 6:1–14. <https://doi.org/10.1038/srep19311>
- Tarazona R, Gayoso I, Alonso C, et al. (2009) NK Cells in Human Ageing. In: *Handbook on Immunosenescence*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 531–544
- Tatton W., & Olanow C. (1999) Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1410:195–213. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00167-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00167-4)
- Taylor SE, Klein LC, Lewis BP, et al. (2000) Biobehavioral responses to stress in females: Tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychol Rev* 107:411–429. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.107.3.411>
- Teixeira RM, Duarte FS, & De Lima TCM (2004) Behavioral and immunological effects of substance P in female and male mice. *Pharmacol Biochem Behav* 79:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.04.032>
- Terman A, Kurz T, Navratil M, et al. (2010) Mitochondrial Turnover and aging of long-lived postmitotic cells: The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxidants Redox Signal* 12:503–535. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2598>
- Thomas R, Wang W, & Su DM (2020) Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. *Immun Ageing* 17:1–17. <https://doi.org/10.1186/s12979-020-0173-8>
- Tian L, Cai Q, Bowen R, & Wei H (1995) Effects of caloric restriction on age-related oxidative modifications of macromolecules and lymphocyte proliferation in rats. *Free Radic Biol Med* 19:859–865. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00090-K](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00090-K)
- Tobon-Velasco J, Cuevas E, & Torres-Ramos M (2014) Receptor for AGEs (RAGE) as Mediator of NF- κ B Pathway Activation in Neuroinflammation and Oxidative Stress. *CNS Neurol Disord - Drug Targets* 13:1615–1626. <https://doi.org/10.2174/1871527313666140806144831>

- Tooke BP, Yu H, Adams JM, et al. (2019) Hypothalamic POMC or MC4R deficiency impairs counterregulatory responses to hypoglycemia in mice. *Mol Metab* 20:194–204. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.11.004>
- Torres Courchoud I, & Pérez Calvo JI (2016) Biomarcadores y práctica clínica. *An Sist Sanit Navar* 39:5–8. <https://doi.org/10.4321/S1137-6627/2016000100001>
- Tortorella C, Piazzolla G, & Antonaci S (2001) Neutrophil oxidative metabolism in aged humans: A perspective. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23:565–572. <https://doi.org/10.1081/IPH-100108602>
- Tortorella C, Simone O, Piazzolla G, et al. (2007) Age-related impairment of GM-CSF-induced signalling in neutrophils: Role of SHP-1 and SOCS proteins. *Ageing Res Rev* 6:81–93. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2006.10.001>
- Toth P, Tarantini S, Tucsek Z, et al. (2014) Resveratrol treatment rescues neurovascular coupling in aged mice: Role of improved cerebrovascular endothelial function and downregulation of NADPH oxidase. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 306:. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00744.2013>
- Trevisan M, Browne R, Ram M, et al. (2001) Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population. *Am J Epidemiol* 154:348–356. <https://doi.org/10.1093/aje/154.4.348>
- Trifunovic A (2006) Mitochondrial DNA and ageing. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1757:611–617. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.03.003>
- Troen BR (2003) The Biology of Aging. *Mt Sinai J Med* 70:. <https://doi.org/10.1056/NEJM197111112852005>
- Tsikis D (2017) Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem* 524:13–30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>
- Tung BT, Rodríguez-Bies E, Ballesteros-Simarro M, et al. (2014) Modulation of endogenous antioxidant activity by resveratrol and exercise in mouse liver is age dependent. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 69:398–409. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt102>
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs PD (2019), & United Nations (2020) Strategic Sourcing. In: *World Popul. Prospect. 2019, Online Ed. Rev. 1.* <https://population.un.org/wpp/Download/Standard/Population/>. Accessed 22 Jun 2020
- United Nations (2020) Strategic Sourcing. In: *Dep. Econ. Soc. Aff. Popul. Dyn.* <https://population.un.org/wpp/Download/Standard/Population/>. Accessed 22 Jun 2020
- Utani KI, Kohno Y, Okamoto A, & Shimizu N (2010) Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress. *PLoS One* 5:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010089>
- Utkin YN (2019) Aging Affects Nicotinic Acetylcholine Receptors in Brain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 19:119–124. <https://doi.org/10.2174/1871524919666190320102834>
- Valavanidis A, Vlachogianni T, & Fiotakis C (2009) 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Heal - Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 27:120–139. <https://doi.org/10.1080/10590500902885684>
- Vandenbossche J, Deroost N, Soetens E, & Kerckhofs E (2009) Does implicit learning in non-demented Parkinson's disease depend on the level of cognitive functioning? *Brain Cogn* 69:194–199. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2008.07.005>
- Vaziri H, & Benchimol S (1996) From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: The telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol* 31:295–301. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(95\)02025-X](https://doi.org/10.1016/0531-5565(95)02025-X)
- Vendrov AE, Vendrov KC, Smith A, et al. (2015) NOX4 NADPH Oxidase-Dependent Mitochondrial Oxidative Stress in Aging-Associated Cardiovascular Disease. *Antioxid Redox Signal* 23:1389–1409. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6221>
- Venkateshappa C, Harish G, Mythri RB, et al. (2012) Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: Implications for Parkinson's disease. *Neurochem Res* 37:358–369. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0619-7>

- Ventura MT, Casciaro M, Gangemi S, & Buquicchio R (2017) Immunosenescence in aging: Between immune cells depletion and cytokines up-regulation. *Clin Mol Allergy* 15:1–8. <https://doi.org/10.1186/s12948-017-0077-0>
- Vida C, Corpas I, De la Fuente M, & González EM (2011) Age-related changes in xanthine oxidase activity and lipid peroxidation, as well as in the correlation between both parameters, in plasma and several organs from female mice. *J Physiol Biochem* 67:551–558. <https://doi.org/10.1007/s13105-011-0100-8>
- Vida C, & De la Fuente M (2013) Stress-related Behavioural Responses, Immunity and Ageing in Animal Models. In: *Immunosenescence*. Springer New York, New York, NY, pp 125–144
- Vida C, Gonzalez E, & De la Fuente M (2014) Increase of Oxidation and Inflammation in Nervous and Immune Systems with Aging and Anxiety. *Curr Pharm Des* 20:4656–4678. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140130201734>
- Vida C, Martínez de Toda I, Cruces J, et al. (2017) Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox Biol* 12:423–437. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.005>
- Vida C, Martínez de Toda I, Garrido A, et al. (2018) Impairment of several immune functions and redox state in blood cells of Alzheimer’s disease patients. Relevant role of neutrophils in oxidative stress. *Front Immunol* 8:1974. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01974>
- Vida M (2016) Estudio de la xantina oxidasa y otros parámetros de estado redox en el envejecimiento cronológico, prematuro y patológico en ratón
- Vijg J, & Montagna C (2017) Genome instability and aging: Cause or effect? *Transl Med Aging* 1:5–11. <https://doi.org/10.1016/j.tma.2017.09.003>
- Viña J, Sastre J, Pallardó F V., et al. (2006) Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders. Protective effect of estrogens. *Free Radic Res* 40:1359–1365. <https://doi.org/10.1080/10715760600952851>
- Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, et al. (2007) A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 14:157–162. <https://doi.org/10.1159/000110640>
- Viveros MP, Fernández B, Guayerbas N, & De la Fuente M (2001) Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J Neuroimmunol* 114:80–88. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(00\)00457-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(00)00457-4)
- Võikar V, Kõks S, Vasar E, & Rauvala H (2001) Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* 72:271–281. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00405-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00405-4)
- Vrachnis N, Zygouris D, Iliodromiti Z, et al. (2014) Probing the impact of sex steroids and menopause-related sex steroid deprivation on modulation of immune senescence. *Maturitas* 78:174–178. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.04.014>
- Vranová HP, Mareš J, Nevrlý M, et al. (2010) CSF markers of neurodegeneration in Parkinson’s disease. *J Neural Transm* 117:1177–1181. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0462-z>
- Waldmann TA (2006) The biology of interleukin-2 and interleukin-15: Implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 6:595–601. <https://doi.org/10.1038/nri1901>
- Walf AA, & Frye CA (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2:322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Walford RL (1969) The immunologic theory of aging. *Immunol Rev* 2:171–171. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1969.tb00210.x>
- Wang GQ, Zhou YZ, Wang YY, et al. (2019) Age-Associated Dopaminergic Neuron Loss and Midbrain Glia Cell Phenotypic Polarization. *Neuroscience* 415:89–96. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.07.021>
- Wang W, Yang H, Johnson D, et al. (2017) Chemistry and biology of ω -3 PUFA peroxidation-derived compounds. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 132:84–91. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2016.12.004>
- Weinstein Y, Ran S, & Segal S (1984) Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *J Immunol* 132:656–661

- Weiskopf D, Weinberger B, & Grubeck-Loebenstein B (2009) The aging of the immune system. *Transpl Int* 22:1041–1050. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x>
- Weismann A (1891) *Essays upon heredity and kindred biological problems*. at the Clarendon Press, Oxford : <https://doi.org/10.5962/bhl.title.101564>
- Wen Z, Shimojima Y, Shirai T, et al. (2016) NADPH oxidase deficiency underlies dysfunction of aged CD8⁺ Tregs. *J Clin Invest* 126:1953–1967. <https://doi.org/10.1172/JCI84181>
- Wendeln A-C, Degenhardt K, Kaurani L, et al. (2018) Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature* 556:332–338. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0023-4>
- Wenisch C, Patruta S, Daxböck F, et al. (2000) Effect of age on human neutrophil function. *J Leukoc Biol* 67:40–45. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.1.40>
- Wheeler C, Seksenyan A, Koronyo Y, et al. (2014) T-Lymphocyte Deficiency Exacerbates Behavioral Deficits in the 6-OHDA Unilateral Lesion Rat Model for Parkinson’s Disease. *J Neurol Neurophysiol* 05: <https://doi.org/10.4172/2155-9562.1000209>
- Whitacre CC (2001) Sex differences in autoimmune diseases. *Horm Brain Behav Online* 2:2259–2291. <https://doi.org/10.1016/B978-008088783-8.00070-X>
- WHO (2018) Envejecimiento y Salud. In: WHO. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/envejecimiento-y-salud>
- Wijeyekoon RS, Kronenberg-Versteeg D, Scott KM, et al. (2018) Monocyte function in Parkinson’s disease and the impact of autologous serum on phagocytosis. *Front Neurol* 9:1–9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00870>
- Williams GC (1957) Pleiotropy , Natural Selection , and the Evolution of Senescence Author (s): George C . Williams. *Jstor* 11:398–411
- Winslow AR, Chen CW, Corrochano S, et al. (2010) α -Synuclein impairs macroautophagy: Implications for Parkinson’s disease. *J Cell Biol* 190:1023–1037. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003122>
- Woischnik M, & Moraes CT (2002) Pattern of Organization of Human Mitochondrial Pseudogenes in the Nuclear Chromosomes. *Sci World J* 2:27–30. <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.14>
- Wojda A, Ziętkiewicz E, & Witt M (2007) Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis* 22:195–200. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem002>
- Woytowicz E, Whittall J, & Westlake KP (2016) Age-related Changes in Bilateral Upper Extremity Coordination. *Curr Geriatr Reports* 5:191–199. <https://doi.org/10.1007/s13670-016-0184-7>
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, et al. (1996) Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18:173–179. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1996\)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3)
- Wu JC, & Manuelidis L (1980) Sequence definition and organization of a human repeated DNA. *J Mol Biol* 142:363–386. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90277-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90277-6)
- Yanes RE, Gustafson CE, Weyand CM, & Goronzy JJ (2017) Lymphocyte generation and population homeostasis throughout life. *Semin Hematol* 54:33–38. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2016.10.003>
- Yates FE (1994) Order and complexity in dynamical systems: Homeodynamics as a generalized mechanics for biology. *Math Comput Model* 19:49–74. [https://doi.org/10.1016/0895-7177\(94\)90189-9](https://doi.org/10.1016/0895-7177(94)90189-9)
- Younes-Mhenni S, Frih-Ayed M, Kerkeni A, et al. (2007) Peripheral blood markers of oxidative stress in Parkinson’s disease. *Eur Neurol* 58:78–83. <https://doi.org/10.1159/000103641>
- Zeevalk GD, Razmpour R, & Bernard LP (2008) Glutathione and Parkinson’s disease: Is this the elephant in the room? *Biomed Pharmacother* 62:236–249. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.01.017>
- Zglinicki T, & Martin-Ruiz C (2005) Telomeres as Biomarkers for Ageing and Age-Related Diseases. *Curr Mol Med* 5:197–203. <https://doi.org/10.2174/1566524053586545>
- Zhan B, Ma HY, Wang JL, & Liu CB (2015) Sex differences in morphine-induced behavioral sensitization and social behaviors in ICR mice. *Dongwuxue Yanjiu* 36:103–108.

- <https://doi.org/10.13918/j.issn.2095-8137.2015.2.103>
- Zhang HM, & Zhang Y (2014) Melatonin: A well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res* 57:131–146. <https://doi.org/10.1111/jpi.12162>
- Zhang J -R, Andrus PK, & Hall ED (1993) Age-Related Regional Changes in Hydroxyl Radical Stress and Antioxidants in Gerbil Brain. *J Neurochem* 61:1640–1647. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb09798.x>
- Zhang W-G, Jia L, Ma J, et al. (2018) Peripheral blood leukocyte telomere length is associated with age but not renal function: A cross-sectional follow-up study. *J Nutr Health Aging* 22:276–281. <https://doi.org/10.1007/s12603-017-0905-4>
- Zhang X (2017) Acid–Base Poker: A Card Game Introducing the Concepts of Acid and Base at the College Level. *J Chem Educ* 94:606–609. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00590>
- Zielinski ZAM, & Pratt DA (2017) Lipid Peroxidation: Kinetics, Mechanisms, and Products. *J Org Chem* 82:2817–2825. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b00152>
- Ziętkiewicz E, Wojda A, & Witt M (2009) Cytogenetic perspective of ageing and longevity in men and women. *J Appl Genet* 50:261–273. <https://doi.org/10.1007/BF03195682>
- Zubakov D, Liu F, Van Zelm MC, et al. (2010) Estimating human age from T-cell DNA rearrangements. *Curr Biol* 20:R970–R971. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.022>

ANEXO

A continuación se adjuntan los artículos derivados de la presente tesis doctoral:

ARTÍCULO 1



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Lymphoproliferation Impairment and Oxidative Stress in Blood Cells from Early Parkinson's Disease Patients

Carmen Vida ^{1,2,†}, Hikaru Kobayashi ^{1,2,†}, Antonio Garrido ^{1,2} , Irene Martínez de Toda ^{1,2}, Eva Carro ^{2,3}, José Antonio Molina ^{2,3} and Mónica De la Fuente ^{1,2,*}

¹ Department of Genetics, Physiology and Microbiology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain; mvida@ucm.es (C.V.); hkgarcia@ucm.es (H.K.); antoniogarridobio@gmail.com (A.G.); irene_mc90@hotmail.com (I.M.d.T.)

² Institute of Biomedical Research Hospital 12 Octubre (imas12), 28041 Madrid, Spain; carroevea@h12o.es (E.C.); cvillaiza@telefonica.net (J.A.M)

³ Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: mondelaf@ucm.es; Tel.: +34-913944989

† These authors contributed equally to this work.

Received: 28 December 2018; Accepted: 2 February 2019; Published: 12 February 2019



Abstract: In Parkinson's Disease (PD), the peripheral changes in the functional capacity and redox state of immune cells has been scarcely investigated, especially in the early PD stages. Aging is a risk factor for PD, and the age-related impairment of the immune system, based on a chronic-oxidative stress situation, is involved in the rate of aging. We analyzed several functions in isolated peripheral blood neutrophils and mononuclear cells from PD stage 2 patients, and compared the results to those in healthy elderly and adult controls. Several oxidative stress and damage parameters were studied in whole blood cells. The results showed an impairment of the lymphoproliferative response in stimulated conditions in the PD patients compared with age-matched controls, who also showed typical immunosenescence in comparison with adult individuals. Higher oxidative stress and damage were observed in whole blood cells from PD patients (lower glutathione peroxidase activity, and higher oxidized glutathione and malondialdehyde contents). Our results suggest an accelerated immunosenescence in PD stage 2, and that several of the parameters studied could be appropriate peripheral biomarkers in the early stages of PD.

Keywords: biomarkers; blood cells; immune functions; immunosenescence; lymphoproliferation; oxidative damage; oxidative stress; Parkinson's Disease

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a chronic progressive, age-related, neurodegenerative disorder that is clinically characterized by the presence of predominantly motor symptomatology (e.g., bradykinesia, rest tremor, etc.), together with a diversity of non-motor symptoms (e.g., pain, paresthesia, depression, etc.) [1,2]. Neuropathologically, PD is characterized by the degeneration of neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc), which results in a loss of dopamine (DA) [3], as well as by the presence of intraneuronal Lewy bodies, which are neuronal inclusions of aggregated α -synuclein and other ubiquitinated proteins [4]. Although the exact mechanism of development and progression of PD pathology is still unknown, epidemiological studies have revealed that PD is a multifactorial disease with a complex combination of genetic background and environmental factors, aggravated by aging, which is, to date, the most common risk factor for neurodegenerative diseases [5]. In this regard, PD is

the second most prevalent neurological disease, affecting at least 1% of the population over 50 years of age, and increases to 1–3% in subjects over 80 years of age [6,7]. Although medications alleviate PD symptoms, there is no cure nor are there clearly effective disease-modifying treatments [8]. There is no definitive biomarker or imaging test for PD and the diagnosis is determined from clinical observations and confirmed only by postmortem neuropathological analysis [8]. However, considerable efforts have been invested in the identification of peripheral biomarkers that can diagnose PD in the early stages of clinical development so that pharmacological interventions can be more effectively provided [8,9]. Unfortunately, by the time PD symptoms are clinically evident, 50–60% of neurons in the SNpc have been lost and DA levels in the striatum are depleted [8,10]. Since conducting studies in the early stages 1 and 2 of PD is difficult, most studies are performed using a mixed population with patients from different stages of PD (stages 2 to 5), which complicated the identification of early biomarkers of the onset and progression of PD.

Aging is accompanied by a decline in the nervous and immune systems, contributing to the deterioration of homeostasis and health [11,12]. For this reason, PD can be understood in the context of aging. Thus, the age-related decline of the immune system, which is called immunosenescence, should be considered in the development of this pathology. Most experimental data on immune changes with aging show a decline in innate and adaptive immune functions, which negatively affect the health of older adults, increasing morbidity and mortality [11,12]. Thus, there is an age-related increase in several leukocyte functions (e.g., adherence capacity and basal lymphoproliferation), whereas other functions decrease with age (e.g., phagocytosis, chemotaxis or stimulated proliferation) [11–13]. Given the bidirectional communication between the immune and the nervous systems [11,12], it is possible that the immunological variations contribute to the progressive neuronal dysfunction and PD pathology. Several studies supported that PD is also accompanied by a systemic disturbance, reflecting the damage in the brain. Although many contradictory results have been published, several studies have demonstrated an alteration in both innate and adaptive immune functions [14–16], deregulation of the cytokine production, as well as significant changes in subpopulation distributions of peripheral immune cells in PD patients compared with healthy elderly subjects [17–21]. This evidence suggests the possibility of developing potential therapies targeting the inflammatory and immune responses, whereas functional profiling of peripheral immune cells could provide important PD biomarkers [16]. It is crucial to identify and elucidate the disparity between the changes in innate and adaptive immunity throughout the different stages of PD, as well as to evaluate the impact of immunosenescence on the onset and progression of this disease, which remains incompletely clarified [17].

A chronic oxidative stress situation (a progressive imbalance between higher endogenous levels of oxidants and lower antioxidant defenses), which leads to the oxidative damage of cell molecules (lipids, proteins and DNA), is the basis of aging and several age-related diseases [11]. In this regard, oxidative stress has been implicated as a major mechanism in the pathogenesis and progression of PD [22–24]. This has been supported by several studies demonstrating an increase in oxidative stress and damage in several brain regions of PD patients [25–29]. Lower reduced glutathione (GSH) [27], altered activities of antioxidant enzymes, such as glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) [27,28], or increased oxidative damage of lipids, proteins, and DNA [27,29–31], have been described in the brains of advanced-stages PD patients. Other studies revealed altered oxidative stress markers in cerebrospinal fluid (CSF), serum, plasma, or red blood cells (RBCs) of PD patients [23,32–35]. However, the changes in the redox stage of peripheral immune cells from PD patients in early stages of the disease are still unclear.

Finally, whole blood (WB) cells, and particularly circulating leukocytes, reflect the major physiological changes in various body organs and systems [36]. Therefore, the assessment of several immune markers in peripheral WB represents an accessible and useful method of studying and monitoring the immune response in PD, as well as for identifying new biomarkers that could be predictive of the disease status and measures of disease severity and progression. In this context, recent studies proposed that measurement of the immune function profile in different types of peripheral

leukocytes, together with the evaluation of their oxidative-inflammatory state, could be useful early peripheral markers of the progression of neurodegenerative diseases [36,37]. However, this kind of study in the early stages of human PD is a subject that has scarcely been explored.

With the above in mind, the aim of the present work was to study the changes in several immune functions, and oxidative stress and damage parameters in different types of human blood immune cells at an early stage of PD pathology. As such, we performed immune functions assays on both isolated peripheral blood polymorphonuclear (mainly neutrophils) and mononuclear (mainly lymphocytes) leukocytes. The oxidative stress and damage parameters were assessed in WB cells, from patients diagnosed with PD stage 2 and age-matched controls (elderly healthy subjects), as well as in adult controls, to evaluate the differences due to aging.

2. Results

2.1. Impairment of Adaptive Immune Functions Presented in PD Stage 2 Patients

Several immune functions parameters were studied in isolated human blood neutrophils and mononuclear leukocytes from PD stage 2 patients, as well as from adult and elderly healthy subjects. The results are shown in Figures 1 and 2.

In general, all the immune parameters analyzed in this work (adherence, chemotaxis, and phagocytosis of neutrophils; the antitumor cytotoxic activity of natural killer (NK) cells; adherence, chemotaxis, and both basal and stimulated proliferative response of lymphocytes) deteriorate with aging. However, a differential pattern of the innate and adaptive immune responses was observed in PD stage 2 patients, which showed an impairment of the adaptive immune functions but not in the innate response compared with age-matched controls.

In the early stage of PD pathology, and unlike what is observed with aging, no significant differences were observed between PD patients and healthy controls of the same chronological age in any of the innate immune functions analyzed, such as adherence (Figure 1A,B), chemotaxis (Figure 1C,D), phagocytosis (Figure 1E,F), and NK cytotoxic activity (Figure 1G). However, with aging, elderly healthy subjects showed statistically significant lower values in both neutrophil ($p < 0.001$; Figure 1C) and lymphocyte ($p < 0.05$; Figure 1D) chemotaxis and the phagocytic index ($p < 0.001$; Figure 1E), as well as in NK cell cytotoxic activity ($p < 0.01$; Figure 1G), in comparison with healthy adult subjects. In contrast, higher values of neutrophil and lymphocyte adherence ($p < 0.05$; Figure 1A,B) were observed in elderly healthy subjects compared with adult controls.

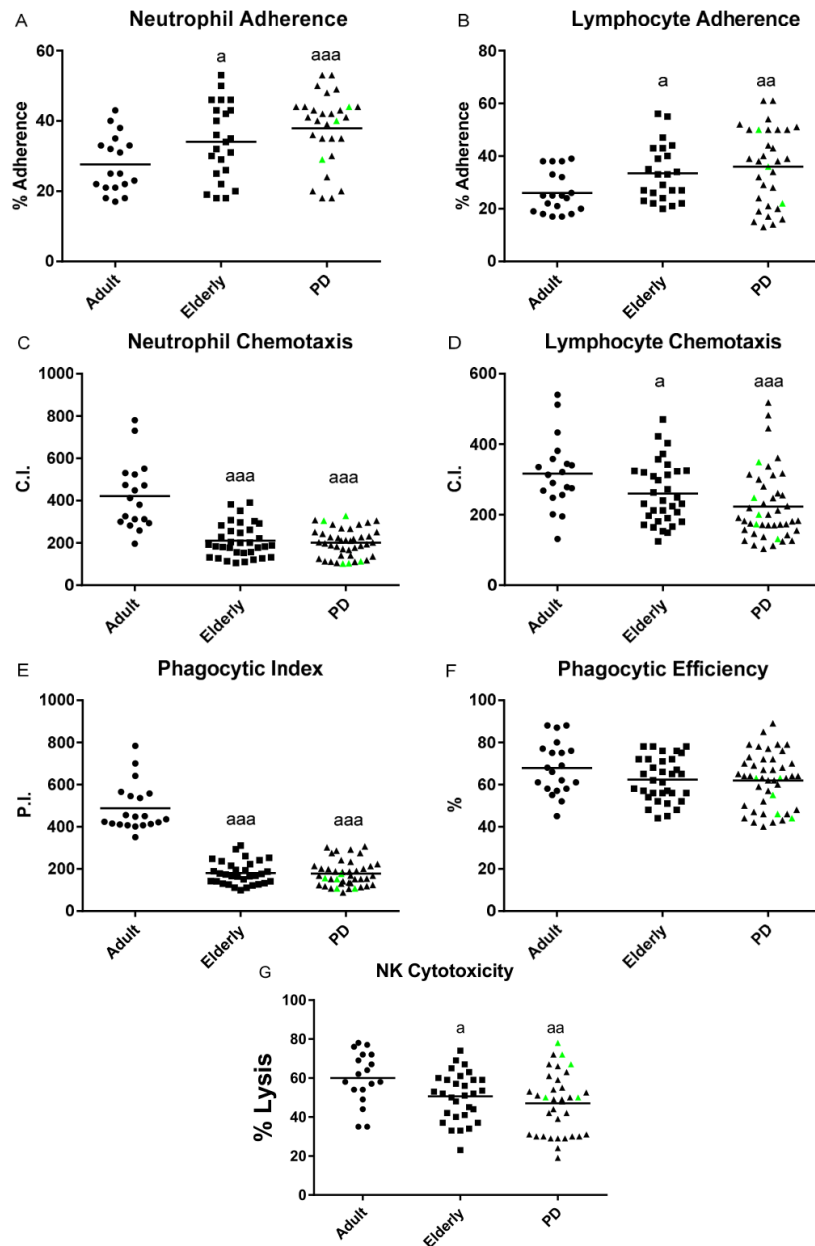


Figure 1. Immune function parameters in isolated peripheral blood neutrophils and mononuclear cells of Parkinson's Disease (PD) stage 2 patients, and adult and elderly healthy controls. Chemotaxis index (C.I.) of (A) neutrophils and (B) lymphocytes; (C) phagocytic index (P.I.) and (D) phagocytic efficiency (%) of neutrophils and (E) natural killer (NK) cytotoxic activity (% lysis). Data are shown as the mean (horizontal bar) of 18–45 values corresponding to the numbers of subjects analyzed in each group (20 adults, 34 elderly, and 45 PD). Each point represents the mean of duplicate assays. The green points represent the values in five PD patients treated with levodopa. a: $p < 0.05$, aa: $p < 0.01$, and aaa: $p < 0.001$ with respect to the value in adult subjects.

In contrast, with regards to adaptive immune functions (lymphoproliferation in basal and stimulated conditions), these functions were further affected in PD patients compared with their age-matched controls. The levels of both phytohaemagglutinin (PHA)- ($p < 0.001$; Figure 2A) and lipopolysaccharide (LPS)- ($p < 0.05$; Figure 2B) lymphoproliferation were significantly lower in PD patients than those observed in elderly controls. Similar results were observed in the lymphoproliferation capacity (% stimulation) ($p < 0.05$; Figure 2C,D). However, no significant differences were observed in basal lymphoproliferation between both experimental groups (3850 ± 2036 and 4009 ± 1973 c.p.m., PD stage 2 patients vs. elderly control, respectively). With aging, elderly subjects showed significantly lower values of both PHA- and LPS-stimulated lymphoproliferation ($p < 0.001$; Figure 2) compared with those observed in adult subjects. In contrast, higher values of basal lymphoproliferation ($p < 0.01$) were observed in elderly healthy subjects in comparison with adult controls (4009 ± 1973 and 1363 ± 452 c.p.m. in elderly vs. adult subjects, respectively).

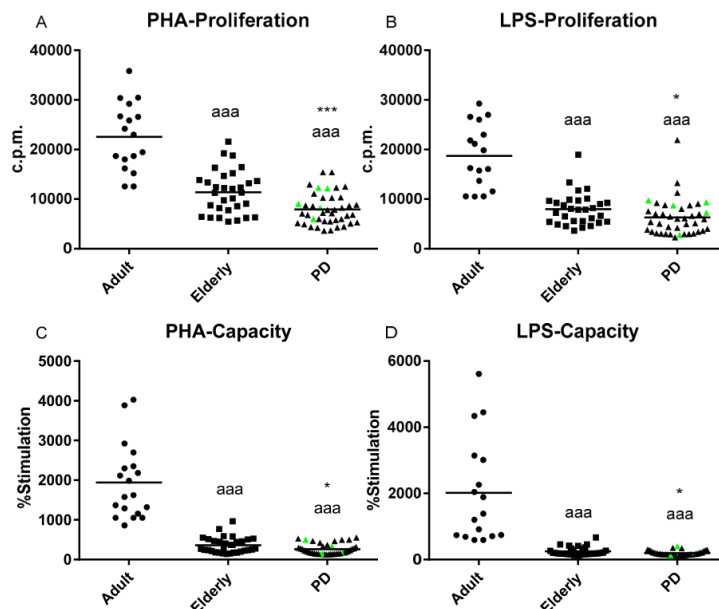


Figure 2. Stimulation of proliferation in response to phytohemagglutinin (PHA) and lipopolysaccharide (LPS) ($1 \mu\text{g/mL}$) in isolated peripheral blood mononuclear cells of Parkinson's Disease (PD) stage 2 patients, as well as of adult and elderly healthy controls. Lymphoproliferation (48 h incubation) in counts per minute (c.p.m.) with the mitogens (A) PHA and (B) LPS. Lymphoproliferation capacity (%) in response to (C) PHA and (D) LPS providing 100% to the c.p.m. in basal conditions. Data are shown as the mean (horizontal bar) of 16–45 values corresponding to the number of subjects analyzed in each group (20 adults, 34 elderly, and 45 PD). Each point represents the mean of duplicate assays. The green points represent the values in five PD patients treated with levodopa. aaa: $p < 0.001$ with respect to the value in adult subjects; * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ with respect to the value in elderly subjects.

2.2. Oxidative Stress and Lipid Damage in Whole Blood cells from PD Stage 2 Patients

Several oxidative stress and damage parameters were analyzed in isolated whole blood (WB) cells (containing both total RBCs and leukocyte populations) from PD stage 2 patients, as well as from adult and elderly healthy subjects. The results are shown in Figure 3.

In their WB cells, PD patients exhibited significantly lower and higher glutathione peroxidase (GPx) ($p < 0.01$; Figure 3A) and glutathione reductase (GR) ($p < 0.05$; Figure 3B) activities, respectively, as well as higher oxidized glutathione (GSSG) ($p < 0.05$; Figure 3D) and malondyaldehyde (MDA)

($p < 0.001$; Figure 3F) contents than elderly subjects. However, no statistically-significant differences were observed in GSH concentrations and GSSG/GSH ratios between PD and elderly individuals. Regarding aging, higher values of oxidative stress and damage were observed in WB cells of elderly subjects than in those of adults. Thus, GPx, GR, and GSH values were lower ($p < 0.001$, $p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively; Figure 3A–C) and GSSG/GSH ratios ($p < 0.05$; Figure 3E), as well as both GSSG ($p < 0.001$; Figure 3D) and MDA ($p < 0.05$; Figure 3F) levels were higher than those in adult subjects.

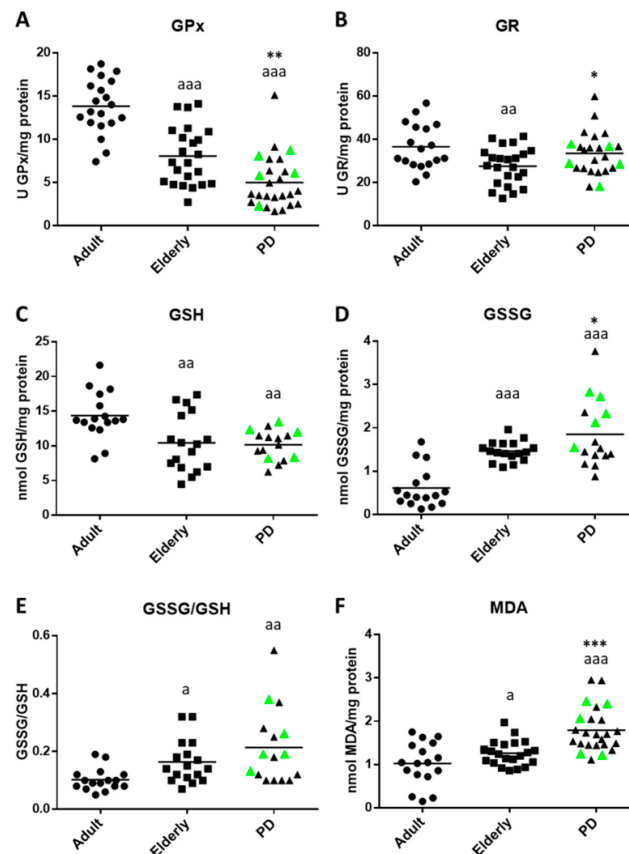


Figure 3. Oxidative stress and lipid peroxidation parameters in whole blood cells, containing both total red blood cells and leukocyte populations, of Parkinson’s Disease (PD) stage 2 patients, as well as of adult and elderly healthy subjects. (A) Glutathione peroxidase (GPx) and (B) glutathione reductase (GR) activities (U/mg protein); (C) intracellular reduced glutathione (GSH) concentrations and (D) oxidized glutathione (GSSG) contents (nmol/mg protein); (E) GSSG/GSH ratios; and (F) intracellular malondialdehyde (MDA) contents (nmol/mg protein). Data are shown as the mean (horizontal bar) of 16–23 values corresponding to the number of subjects analyzed in each group (20 adult, 23 elderly, 26 PD). Each value is the mean of duplicate assays. The green points represent the values in five PD patients treated with levodopa. a: $p < 0.05$, aa: $p < 0.01$, and aaa: $p < 0.001$ with respect to the value in adult subjects; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ with respect to the value in elderly subjects.

The study of the effect of treatment with antiparkinsonian medications, such as levodopa (L-DOPA), is not the focus of the present work. However, since five of the enrolled (highlighted in green in Figures 1–3) patients were taking L-DOPA for more than six months, and due to several studies having provided some evidence that levodopa treatment could affect the redox state and oxidative damage at peripheral levels (e.g., blood, plasma or peripheral blood mononuclear cells) [33,34,38],

we examined if L-DOPA treatment could affect to the oxidative state of these “medicated PD patients” in comparison to “non-medicated PD patients”. We observed that, in all the oxidative stress and damage parameters analyzed, in general, the five “medicated” PD stage 2 patients (see highlighted green points in Figure 3) showed similar values to the observed “non-medicated” PD subjects (Table 1). Similar results were also recorded for all the immune functions parameters analyzed; no statistical differences were observed in these parameters between both groups of PD patients (see highlighted green points Figures 1 and 2; Table 1). Therefore, our results reveal that L-DOPA therapy did not significantly influence the measured immune functions and oxidative stress in peripheral blood cells of PD stage 2 patients.

Table 1. Immune function parameters in isolated peripheral blood neutrophils (N) and mononuclear cells (L), and oxidative stress and lipid peroxidation parameters in whole blood cells from Parkinson’s Disease (PD) stage 2 patients, non-medicated and medicated with levodopa therapy for more than six months.

PD Stage 2 Patients	Non-Medicated	Medicated
Immune Functions Parameters	[24–40]	[3–5]
N adherence (%)	38 ± 10	35 ± 9
L adherence (%)	36 ± 14	34 ± 16
N chemotaxis (C.I.)	201 ± 10	218 ± 30
L chemotaxis (C.I.)	223 ± 15	213 ± 34
Phagocytosis index (P.I.)	177 ± 11	189 ± 24
Phagocytosis efficiency (%)	61 ± 4	56 ± 10
NK cytotoxic activity (% lysis)	47 ± 15	58 ± 19
Basal lymphoproliferation (cpm)	3827 ± 306	3931 ± 354
PHA-lymphoproliferation (cpm)	7920 ± 481	8090 ± 398
LPS-lymphoproliferation (cpm)	6306 ± 569	6629 ± 639
PHA-stimulated (%)	259 ± 21	284 ± 32
LPS-stimulated (%)	192 ± 18	203 ± 22
Oxidative Stress Parameters	[18–21]	[5]
GPx (U/mg protein)	5.02 ± 0.52	6.28 ± 1.23
GR (U/mg protein)	33.50 ± 9.70	31.24 ± 8.24
GSH (nmol/mg protein)	10.16 ± 2.10	12.24 ± 3.24
GSSG (nmol/mg protein)	1.85 ± 0.42	2.03 ± 0.54
GSSG/GSH	0.21 ± 0.09	0.23 ± 0.10
MDA (nmol/mg protein)	1.79 ± 0.52	1.68 ± 0.60

Note: Data are shown as the mean ± SD of several values corresponding to the numbers of subjects analyzed in each group (*n*). Chemotaxis index (C.I.); phagocytic index (p.I.); phytohemagglutinin (PHA) and lipopolysaccharide (LPS) lymphoproliferation in basal (c.p.m.) and stimulated (%) conditions; glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) activities; intracellular reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione contents; GSSG/GSH ratios; and intracellular malondialdehyde (MDA) contents. Statistical analysis did not reveal significant differences between both groups of PD patients.

3. Discussion

The state of the peripheral immune system in PD is increasingly being established as a hallmark of the disease [17,39]. Although several studies have reported alteration of both innate and adaptive immunity at the moderate and advance stages of PD, many contradictory results have been reported. Some authors point to an overactive immune function, whereas others postulate the existence of a general immune deterioration in PD compared to healthy individuals of the same age [16,20,40,41]. Most of these studies focused on the alteration of the adaptive immune response in which T cells play a key role in the neurodegenerative process of PD [15,17,42]. However, little is known about these changes in both innate and adaptive immunity in the early stages of PD. To the best of our knowledge, this is the first study that demonstrated a differential pattern of the peripheral immune responses in early stage 2 PD patients, which demonstrates an early impairment of both PHA- and LPS-stimulated lymphoproliferative responses, but not in their innate functions, compared with elderly

healthy subjects of the same chronological age. This suggests that PHA- and LPS-lymphoproliferation parameters, characteristic of adaptive immunity, could be useful early peripheral biomarkers of the appearance of PD. The decrease in the proliferative response of lymphocytes to mitogens (e.g., LPS and PHA), one of the most evident age-related changes of the immune system, has been associated with a higher risk of morbidity and mortality [13,43], and together with other parameters, defines the immune risk phenotype in humans [44,45]. In regards to aging, PD stage 2 patients and elderly controls showed the typical immunosenescence in comparison with adult individuals (lower chemotaxis, phagocytosis, NK activity, and stimulated-lymphoproliferation; higher adherence and basal lymphoproliferation) [11,13,43]. However, the age-related impairment observed in both PHA- and LPS-lymphoproliferative responses were more exacerbated in early PD patients than in elderly controls, suggesting that these subjects suffer an accelerated impairment of the acquired immunity at the early stage 2 of PD. In this regard, although strong clinical data support that peripheral inflammation appears to be an early event in the development of PD, the mechanism through which PD patients suffer an accelerated impairment of the peripheral acquired immunity in early stages of PD are not yet clear. The growing evidence for such possible mechanisms includes a decreased number of peripheral blood lymphocytes or alteration of cytokine production by peripheral blood cells [20,46–48]. For instance, a significant reduction in the B and T cells subpopulation repertoire, together with increased levels of pro-inflammatory cytokines, were observed in peripheral blood cells or serum of PD patients, as well as in animal models for PD [17–21,42,46].

With respect to PHA- and LPS-lymphoproliferative responses, our results agree with other studies that supported an impaired mitogenic response in peripheral immune cells from subjects with PD [40,49,50]. A marked decreased proliferation in response to a wide range of mitogens (LPS, PHA, or Concanavalin A) was observed in splenocytes and peripheral blood mononuclear cells (PBMNs) in mice and patients with PD [40,49,50]. Other authors pointed to a hyperactivity of T cells in response to LPS activation [20,41]. This lack of consensus could be due to the complex modulation of the adaptive immune response, as well as to the different stages of the disease on which these studies focused (mainly in a mixed population of subjects at different stages of PD). In the context of aging, age-related alterations in adaptive immunity have been extensively studied and T cells are extremely sensitive to immunosenescence [11,12]. T-lymphocyte proliferative responsiveness to antigens or mitogens decreases with age, which is due, at least in part, to a decreased expression of the costimulatory molecule CD28 and a lower production of T cell growth factor (IL-2) [51]. Considering these findings, the impairment of PHA- and LPS-lymphoproliferation observed in PD stage 2 patients could be the result of lower T cells count or variations in the IL-2 producing T cell population after mitogen stimulation, which may be due to a lack of co-stimulatory signals. Several studies have found differences between circulating leukocyte populations in PD patients compared with controls, postulating that other authors have found a significantly reduced secretion of IL-2 by PBMCs from PD patients following mitogen stimulation [40]. However, it is also important to highlight that, unlike observed with aging, no differences were observed in basal lymphoproliferation between PD stage 2 patients and the elderly control. Although we have not found any study on isolated PBMNs from PD patients, an increased basal proliferation was reported in lymphoblasts of moderate and severe PD subjects [52]. Basal lymphoproliferation provides information about the immune system overactivation, and it has recently been proposed as a useful age-related marker [43]. Therefore, our results suggest that the immune system of PD patients is not overactivated during the early stages of the disease, which could be attributed to the good maintenance of the basal proliferative response, potentially as a compensatory mechanism for the lack of effectiveness of lymphoproliferation in response to stimulus.

Our results revealed that PD stage 2 patients did not show an alteration in their peripheral innate immune responses, displaying similar neutrophils and lymphocyte adherence and chemotaxis, phagocytic capacity, as well as NK cytotoxic activity to those observed in age-matched controls. Although there is no study that, at early stages of PD, has evaluated similar innate immune functions as those analyzed in this work, an alteration in the innate response has been observed in peripheral

immune cells from mild and severe PD patients [15,17,41,53]. Thus, in contrast to our results, a reduction in the phagocytic activity of monocytes and an altered activation of NK cells were observed in these PD patients [41,54]. PD patients also showed an increased percentage of NK cells, which correlates with PD severity scores; however, in agreement with our results, no differences in the NK activity were observed in these PD patients in relation to age-match controls [53–55]. All these modifications to NK cell physiology suggest that they might play a role in the pathogenesis of PD. Since we cannot explain the possible mechanisms that PD patients use to preserve their innate functions at early stages of PD, further studies are needed to fully understand these mechanisms.

Chronic oxidative stress plays a key role in aging, as well as in the pathogenesis of PD [11,34,56]. Since the maintenance of a good redox state and a low accumulation of cellular damage are important for preserving immune function and achieving extreme old age [11,51], it is possible that the early deterioration of the stimulated proliferative response observed in PD stage 2 patients could be mediated by an increase in oxidative stress and damage affecting leukocytes. Higher levels of oxidative stress and lipid damage were observed in WB cells of PD patients in relation to age-match controls, identified as altered antioxidant GPx and GR activities and higher GSSG and MDA contents. Our results agree with those of other studies in which elevated production of oxidative compounds, increased markers of lipid peroxidation (e.g., MDA) damage, or the altered levels of antioxidant enzymes and compounds were also found in peripheral PBMNs, RBCs, serum and plasma of PD patients and animal models of PD [23,32–35]. However, because some studies showed an increase in oxidative stress [23,33,57–59], whereas other authors reported no changes [60], the significance of peripheral oxidative stress in PD remains to be clarified. These conflicting results may be due to the different methods used to measure systemic oxidative stress, lack of analyzing confounding factors that could influence the oxidative markers, the relatively small cohort in most studies, and the different PD stages during which the studies were completed. Notably, most studies were performed during the mild and severe stages of PD, or in a mixed population of patients in different stages of PD, so it was not possible to analyze redox state differences between early and late stages of PD.

The maintenance of adequate levels of antioxidants is essential to prevent or even manage changes in the redox balance throughout aging and during the onset and progression of PD. We analyzed the glutathione cycle, which is one of the main intracellular mechanisms for maintaining redox homeostasis [61]. In WB cells, PD stage 2 patients showed higher GSSG levels than elderly controls. However, GSH content and GSSG/GSH ratio were similar between both groups. This indicates that, during the early stages of PD, WB cells do not suffer a great alteration in their redox state (measured as GSSG/GSH ratio) as these cells are able to maintain optimal GSH levels, perhaps as a compensatory mechanism to manage the increase in oxidant production. Our results agree with some studies conducted in red blood cells (RBCs) in which increased GSSG levels [23], but not in total glutathione and GSH contents [23,38,62], were found in PD patients (mixed population of stages 1–4). The RBCs GSH is correlated with central nervous system GSH state and PD severity [61]. Our study also revealed that PD patients showed a different pattern in the activities of the GPx and GR antioxidant enzymes in WB cells, showing lower and higher GPx and GR activities, respectively, in comparison to elderly controls. Different studies have reported contradictory results. PD patients showed low GPx activity in WB cells [63], whereas no changes in GPx and GR activities were found in RBCs or plasma [64,65]. GPx is an enzyme that couples the oxidation of GSH to the detoxification of hydroperoxides, whereas the importance of GR lies in its ability to maintain GSH in its reduced form [64]. The higher GR activity observed in WB cells from PD stage 2 patients could be explained as a result of the activation of a compensatory response to cope with the high levels of GSSG observed in these cells. The lower GPx activity observed in these individuals may result in an accumulation of peroxides, which could contribute to causing lipid oxidative damage in these cells. This could explain the fact that the PD patients also showed higher MDA levels in their WB cells in relation to elderly controls. Our finding is also supported by other studies, which reported that MDA content significantly increases in plasma, serum, blood leukocytes or RBCs of PD patients [60,66–68]. In our study, the increased levels of MDA

in peripheral WB cells, together with the excessive GR activity observed in PD stage 2 patients, may indicate a systemic reaction related to chronic oxidative stress in the brain.

In this study, we analyzed different oxidative stress and damage parameters using samples of WB cells but not isolated blood leukocytes for several reasons: (1) this kind of sample better reproduces the *in vivo* conditions in which the immune cells are living; (2) WB samples are clinically more feasible, reproducible, cost effective, easy to implement, and apply compared to purified and isolated neutrophils and mononuclear blood leukocytes; (3) a previous study completed in our laboratory demonstrated a similar altered redox state and oxidative damage pattern in WB cells and isolated blood neutrophils from AD patients, suggesting that the estimation of these parameters in WB cells would be a useful biomarkers in the assessment of AD progression [36]; and (4) a recent study by our group (submitted for publishing) assessed WB cells from health men and women throughout aging, revealing increased oxidative stress and damage in elderly subjects in comparison to adults, suggesting that the measurement of these redox state parameters in WB cells could be good biomarkers of biological age. In this context, in relation to aging, our findings also demonstrate that several peripheral oxidative stress and damage markers increased in WB cells from both PD stage 2 patients and elderly controls in comparison with adult individuals (lower GPx and GR activities and GSH content; higher GSSG/GSH ratios and GSSG and MDA contents). However, since increased oxidative stress and damage were higher in WB cells of PD stage 2 patients than in elderly controls, this suggests that these parameters (GPx and GR activities and GSSG and MDA contents) could be used as possible early peripheral biomarkers of PD.

In conclusion, our study demonstrated a different pattern of altered immune response in early stage 2 of PD. Thus, PD patients showed an impairment of lymphoproliferation in stimulated conditions but not in the innate responses compared with age-matched controls. As occurs in aging, this deteriorated immune response could have an oxidative stress situation as their basis. Thus, our findings also revealed that this altered lymphoproliferation could be mediated by the higher oxidative stress and damage also observed in WB cells from PD stage 2 patients, which may reflect a systemic reaction probably related to a chronic oxidative stress situation in the brain. Therefore, our results support the idea that PD stage 2 patients show accelerated immunosenescence due to lower lymphoproliferation and higher oxidative stress and damage that these PD patients displayed in comparison to elderly subjects of the same chronological age. Due to (1) WB cells being easy to obtain and analyze in the clinical setting, and (2) several immune function parameters being described as good markers of the rate of aging, the process used may help with the early identification of accelerated aging in human, and may offer opportunities for prevention of premature death and age-related diseases [13]. Our results suggest that the assessment of several immune functions parameters in isolated blood neutrophils and mononuclear cells, together with the analysis of oxidative stress and damage parameters in WB cells, could be useful peripheral biomarkers of the onset and progression of PD. Additional studies are required in peripheral blood immune cells, especially in the early stages of PD to identify other potential prodromal and preclinical biomarkers of PD, which are crucial for early diagnosis of PD. This can help with the development of effective therapeutics and in the early intervention with proven therapies, which may help slow the onset of symptoms and reduce their intensity for as long as possible.

4. Materials and Methods

4.1. Study Subjects

For this cross-sectional study, 45 PD stage 2 patients (women/men, 15/30; mean age $\pm$ SD: 67 ± 12 years), as well as 34 elderly (women/men, 24/10; mean age $\pm$ SD: 74 ± 11 years) and 20 adult (women/men, 10/10; mean age $\pm$ SD: 40 ± 8 years) healthy volunteers were recruited by the Neurology Department of the Hospital 12 Octubre de Madrid, Spain, and were tested by a standardized neuropsychological battery. Diagnosis of sporadic PD was made according to the U.K. Parkinson's

Disease Brain Bank criteria and classified according to Hoehn and Yahr (HY) Rating Scale [9,69]. Subjects with parkinsonian symptoms due to vascular parkinsonism, or medicine- or toxin-induced parkinsonism were excluded. Notably, in the PD stage 2 group, there were 40 “unmedicated PD patients” (diagnosed with PD but not yet started on PD treatment) and 5 “medicated PD patients” (treated with PD medications, such as L-DOPA for more than six months). All patients were subjected to a clinical survey and physical examination. Individuals presenting with any of liver, renal, or cardiac dysfunction; cancer; malabsorption; autoimmune diseases; or with current infectious conditions (because immune functions parameters and oxidative stress markers in peripheral blood may be altered in such conditions) were excluded from both PD and control groups. All experiments were performed in accordance with guidelines and regulations of the Declaration of Helsinki. All procedures were approved by the corresponding Research Ethic Committee of the Biomedical Research Institute Hospital 12 Octubre (code: ES280790001164). Written informed consent was obtained from all participants or representatives.

4.2. Collection of Peripheral Whole Blood Cells and Isolation of Blood Neutrophils and Lymphocytes Leukocytes

Human samples (10 mL) of peripheral blood were collected using vein puncture and sodium citrate-buffered Vacutainer tubes (BD Diagnostic, Madrid, Spain). Blood extraction was performed between 8:00 a.m. and 11:00 a.m. to avoid circadian variations in immune parameters. On the one hand, 8 mL of peripheral blood was used for isolation of both polymorphonuclear (mainly neutrophils) and mononuclear (mainly lymphocytes) leukocytes following a previously described method [70]. Thus, neutrophil and lymphocyte cells were isolated using 1.119 and 1.077 g/cm³ density Histopaque (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) separation, respectively. Collected cells were counted (95% of viability determined using trypan blue staining) and adjusted to the corresponding final concentrations for the development of the different assays of immune functions. The immune functions assays were performed with fresh cells. Samples of whole blood (WB) cells, which contain the total red blood cells (RBCs) together with the total leukocyte populations, were obtained following a previously described procedure [36]. Several aliquots were prepared for the determination of redox state parameters, which were stored at −80 °C until used.

4.3. Adherence Capacity Assay

For the measurement of the adherence capacity of human peripheral blood neutrophils and lymphocytes, we followed a method previously described [70] with some slight modifications [36]. This method mimics, in vitro, cellular adherence to endothelium in vivo, using adherence columns consisting of a Pasteur pipet with 50 mg of nylon fibers. The percentage of adherent neutrophils and lymphocytes, expressed as Adherence Index (A.I.), was calculated according to the equation: AI: (leukocytes/mm³ total – leukocytes/mm³ effluent)/(leukocytes/mm³ total).

4.4. Chemotaxis Assay

The induced mobility or chemotaxis of neutrophils, macrophages and lymphocytes was evaluated according to the method previously described [36,70]. Cell suspensions were deposited in the upper compartment of a Boyden chamber separated by a filter of polycarbonate (3 µm in diameter; Merck, Madrid, Spain). The number of cells (neutrophils and lymphocytes) that migrated toward the chemoattractant agent, formyl-Met-Leu-Phe (fMLP, 10^{−8} M, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), deposited in the lower compartment of the chamber, was counted in the lower face of the filter that separates the two compartments of the chamber. This number is expressed as Chemotaxis Index (C.I.).

4.5. Phagocytosis Assay

Phagocytosis of inert particles (latex beads, 1.1 µm means particle size, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was assayed in phagocytes (isolated blood neutrophils) following a method previously described [36,70]. The number of particles ingested by 100 neutrophils was counted using an immersion

objective (100×) and this is expressed as phagocytic index (P.I.), whereas the number of ingesting neutrophils per 100 neutrophils is expressed as phagocytic efficiency (%).

4.6. Natural Killer (NK) Cytotoxicity Assay

The natural killer (NK) cell cytotoxicity was evaluated following an enzymatic colorimetric assay (Cytotox 96 TM Promega, Boehringer Ingelheim, Biberach, Germany) based on the determination of lactate dehydrogenase (LDH) released by the cytolysis of targets cells (human K562 lymphoma cells), using tetrazolium salts [70]. The results are expressed as the percentage of tumor cells killed (% lysis).

4.7. Lymphoproliferation Assay

The proliferation capacity of lymphocytes was evaluated by a standard method previously described by our laboratory [70]. The assay was assessed in both basal and stimulated conditions using mitogens [phytohemagglutinin (PHA) and lipopolysaccharide (LPS), 1 µg/mL, respectively; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain]. The results were calculated as ³H-thymidine uptake (c.p.m.) for basal and stimulated conditions, and are expressed as lymphoproliferation capacity (%) giving 100% to the c.p.m. in basal conditions.

4.8. Glutathione peroxidase (GPx) Activity Assay

The glutathione peroxidase (GPx) activity was determined according to the technique described by Lawrence and Burk [71] with several modifications [36]. The assays were performed with aliquots of frozen WB cells (200 µL, containing total RBCs and total leukocyte populations), which were resuspended with phosphate buffer saline 50 mM, pH 7.5 (300 µL), and centrifuged at 3200× g for 20 min at 4 °C. The total activity was determined using cumene hydroperoxide (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), which oxidized the glutathione regenerated by the addition of β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in its reduced form (β-NADPH, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), in the presence of glutathione reductase (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). The reaction was spectrophotometrically followed by the decrease in the absorbance at 340 nm. The protein contents were evaluated following the bicinchoninic acid protein assay kit protocol (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), using serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) as standard. The results are expressed as units of enzymatic activity per milligram of proteins (U GPx/mg protein).

4.9. Glutathione Reductase (GR) Activity Assay

The glutathione reductase (GR) activity was measured by the method described by Massey and Williams [72] with some modifications [36]. The assays were performed with aliquots of frozen WB cells (100 µL) that were resuspended with phosphate buffer saline 50 mM with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) 66 mM, pH 7.4 (300 µL), and centrifuged at 3200× g for 20 min at 4 °C. The total activity was spectrophotometrically measured through the oxidation of NADPH at 340 nm. The protein contents of the same samples were evaluated following the previously described protocol. The results are expressed as units of enzymatic activity per milligram of proteins (U GR/mg protein).

4.10. Glutathione Content Assay

Both reduced glutathione (GSH), the main non-enzymatic reducing agent of the organism, and oxidized glutathione (GSSG) forms of glutathione were determined using a fluorimetric assay previously described [73], with several modifications previously performed by our laboratory [36]. This method is based on the GSSG and GSH capacity for reaction with o-phthalaldehyde (OPT, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), at pH 12 and pH 8, respectively, resulting in the formation of a fluorescent compound. The assay was evaluated in aliquots of frozen WB cells (50 µL), which were resuspended in phosphate buffer saline 0.1 M, pH 7.4 (200 µL) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain).

In both GSH and GSSG measurements, the fluorescence emitted by each well was measured at 350 nm excitation and 420 nm emission. Protein content of the samples was determined following the previously described protocol. Results are expressed as nanomoles of GSH or GSSG per milligram of protein (nmol/mg protein). The GSSG/GSH ratio was calculated for each sample.

4.11. Lipid Peroxidation (MDA) Assay

Determination of malondialdehyde (MDA) levels was evaluated using the commercial MDA Assay Kit (Biovision, Milpitas, CA, USA), which measures the reaction of MDA with thiobarbituric acid (TBA) and the MDA-TBA adduct formation. To accomplish this, frozen human WB aliquots (100 μ L) were resuspended in MDA lysis buffer (200 μ L) with 0.1 mM butylated hydroxytoluene (BHT) (2 μ L), sonicated, and then centrifuged at $13,000 \times g$ for 10 min. The supernatants (200 μ L) from each sample were added to 600 μ L of TBA and incubated in a water bath at 95 °C for 60 min. Samples were cooled on ice for 10 min, and n-butanol (300 μ L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to create an organic phase in which the MDA molecules were placed. Samples were centrifuged for 10 min at $13,000 \times g$ at room temperature and the supernatants (300 μ L of upper organic phase) were collected and dispensed into a 96-well microplate for spectrophotometric measurement at 532 nm. MDA supplied in the kit was used as a standard, and MDA levels were determined by comparing the absorbance of samples with those of the standards. Protein content of the samples was determined following the previously described protocol. Results are expressed as nanomoles of MDA per mg of protein (nmol/mg protein).

4.12. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed in SPSS IBM, version 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). All tests were two-tailed, with a significance level of $p \leq 0.05$. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Normality of the samples and homogeneity of the variances were checked using the Kolmogorov–Smirnov test and Levene test, respectively. Differences due to PD pathology and age were studied using the Student *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc tests analysis or the non-parametric Kruskal–Wallis test. The Tukey test was used for post-hoc comparisons when variances were homogeneous, whereas its counterpart analysis, Games–Howell, was used with unequal variances when they were heterogeneous. Figures were built using GraphPad Prism 6 Software (LLC, San Diego, CA, USA).

Author Contributions: M.D.I.F. formulated the original problem, designed the work, provided direction and guidance, and critically reviewed the final version of the manuscript. C.V. provided input for experimental design, carried out experiments with patient samples, analyzed data results, and drafted the manuscript; H.K. carried out experiments with patient samples, analyzed data results and drafted the manuscript; A.G. and I.M.d.T. contributed to experiments with patient samples; E.C. and J.A.M. provided the samples for the experimental study; and J.A.M. made the clinical diagnosis of Parkinson’s Disease patients and control’s selection.

Acknowledgments: This work was supported by the grants of the Research group of UCM (910379) and FIS (PI15/01787) and FIS (PI18/00118) from the ISCIII-FEDER of the European Union, as well as was partially supported by the Fundación Neurociencias y Envejecimiento. We gratefully acknowledge all the participants in this study and the medical staff at Neurology Service in The Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

BCA	Bicinchoninic acid
BHT	Butylated hydroxytoluene
CSF	Cerebrospinal fluid
DA	Dopamine
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Reduced glutathione
GSSG	Oxidized glutathione
L-DOPA	Levodopa
LPS	Lipopolysaccharide
MDA	Malondialdehyde
NK	Natural killer
PD	Parkinson's Disease
PBMNs	Peripheral blood mononuclear cells
PHA	Phytohemagglutinin
SNpc	Substantia nigra pars compacta
WB	Whole blood cells

References

- Massano, J.; Bhatia, K.P. Clinical Approach to Parkinson's Disease: Features, Diagnosis, and Principles of Management. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, a008870. [\[CrossRef\]](#)
- DeMaagd, G.; Philip, A. Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. *Pharm. Ther.* **2015**, *40*, 504–532.
- Forno, L.S. Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1996**, *55*, 259–272. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Braak, H.; Ghebremedhin, E.; Rüb, U.; Bratzke, H.; Del Tredici, K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* **2004**, *318*, 121–134. [\[CrossRef\]](#)
- Greenamyre, J.T.; Hastings, T.G. Biomedicine: Parkinson's Divergent Causes, Convergent Mechanisms. *Science* **2004**, *304*, 1120–1122. [\[CrossRef\]](#)
- Driver, J.A.; Logroscino, G.; Gaziano, J.M.; Kurth, T. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology* **2009**, *72*, 432–438. [\[CrossRef\]](#)
- Pringsheim, T.; Jette, N.; Frolkis, A.; Steeves, T.D.L. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* **2014**, *29*, 1583–1590. [\[CrossRef\]](#)
- Maaroufa, C.L.; Beach, T.G.; Adler, C.H.; Shild, H.A.; Sabbaghd, M.N.; Wue, T.; Walker, D.G.; Kokjohn, T.A.; Roher, A.E.; Consortium, A.P. Cerebrospinal fluid biomarkers of neuropathologically diagnosed Parkinson's disease subjects. *Neurol. Res.* **2012**, *34*, 669–676. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Goetz, C.G.; Poewe, W.; Rascol, O.; Sampaio, C.; Stebbins, G.T.; Counsell, C.; Giladi, N.; Holloway, R.G.; Moore, C.G.; Wenning, G.K.; et al. Movement Disorder Society Task Force Report on the Hoehn and Yahr Staging Scale: Status and Recommendations. The Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* **2004**, *19*, 1020–1028. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bezard, E.; Dovero, S.; Prunier, C.; Ravenscroft, P.; Chalon, S.; Guilloteau, D.; Crossman, A.R.; Bioulac, B.; Brotchie, J.M.; Gross, C.E. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinelesioned macaque model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 6853–6861. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- 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*, 3003–3026. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- De la Fuente, M. Crosstalk between the nervous and the immune systems in health and sickness. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 4605–4607. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- 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*, 3110–3119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

14. Stone, D.K.; Reynolds, A.D.; Mosley, R.L.; Gendelman, H.E. Innate and Adaptive Immunity for the Pathobiology of Parkinson's Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 2151–2166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kannarkat, G.T.; Boss, J.M.; Tansey, M.G. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* **2013**, *3*, 493–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Joshi, N.; Singh, S. Updates on immunity and inflammation in Parkinson disease pathology. *J. Neurosci. Res.* **2018**, *96*, 379–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Costantini, E.; D'Angelo, C.; Reale, M. The role of immunosenescence in neurodegenerative diseases. *Mediat. Inflamm.* **2018**, 6039171. [[CrossRef](#)]
18. Baba, N.; Rubio, M.; Sarfati, M. Interplay between CD45RA+ regulatory T cells and TNF- in the regulation of human Th17 differentiation. *Int. Immunol.* **2010**, *22*, 237–244. [[CrossRef](#)]
19. Wheeler, C.; Seksenyan, A.; Koronyo, Y.; Rentsendorj, A.; Sarayba, D.; Wu, H.; Gragg, A.; Siegel, E.; Thomas, D.; Espinosa, A.; et al. T-Lymphocyte Deficiency Exacerbates Behavioral Deficits in the 6-OHDA Unilateral Lesion Rat Model for Parkinson's Disease. *J. Neurol. Neurophysiol.* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)]
20. Reale, M.; Iarlori, C.; Thomas, A.; Gambi, D.; Perfetti, B.; Di Nicola, M.; Onofri, M. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain. Behav. Immun.* **2009**, *23*, 55–63. [[CrossRef](#)]
21. Scalzo, P.; de Miranda, A.S.; Guerra Amaral, D.C.; de Carvalho Vilela, M.; Cardoso, F.; Teixeira, A.L. Serum Levels of Chemokines in Parkinson's Disease. *Neuroimmunomodulation* **2011**, *18*, 240–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Jenner, P.; Olanow, C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* **1996**, *47*, S161–S170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Younes-Mhenni, S.; Frih-Ayed, M.; Kerkeni, A.; Bost, M.; Chazot, G. Peripheral blood markers of oxidative stress in Parkinson's disease. *Eur. Neurol.* **2007**, *58*, 78–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ciccone, S.; Maiani, E.; Bellusci, G.; Diederich, M.; Gonfloni, S. Parkinson's Disease: A Complex Interplay of Mitochondrial DNA Alterations and Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 2388–2409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gilgun-Sherki, Y.; Melamed, E.; Offen, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* **2001**, *40*, 959–975. [[CrossRef](#)]
26. Mythri, R.B.; Venkateshappa, C.; Harish, G.; Mahadevan, A.; Muthane, U.B.; Yasha, T.C.; Srinivas Bharath, M.M.; Shankar, S.K. Evaluation of Markers of Oxidative Stress, Antioxidant Function and Astrocytic Proliferation in the Striatum and Frontal Cortex of Parkinson's Disease Brains. *Neurochem. Res.* **2011**, *36*, 1452–1463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Venkateshappa, C.; Harish, G.; Mythri, R.B.; Mahadevan, A.; Bharath, M.M.S.; Shankar, S.K. Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: Implications for Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* **2012**, *37*, 358–369. [[CrossRef](#)]
28. Jenner, P.; Olanow, C.W. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **1998**, *44*, S72–S84. [[CrossRef](#)]
29. Dexter, D.T.; Holley, A.E.; Flitter, W.D.; Slater, T.F.; Wells, F.R.; Daniel, S.E.; Lees, A.J.; Jenner, P.; Marsden, C.D. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: An HPLC and ESR study. *Mov. Disord.* **1994**, *9*, 92–97. [[CrossRef](#)]
30. Good, P.F.; Hsu, A.; Werner, P.; Perl, D.P.; Olanow, C.W. Protein nitration in Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1998**, *57*, 338–342. [[CrossRef](#)]
31. Schapira, A.H.; Cooper, J.M.; Dexter, D.; Clark, J.B.; Jenner, P.; Marsden, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **1990**, *54*, 823–827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ilić, T.; Jovanović, M.; Jovčić, A.; Tomović, M. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Vojnosanit. Pregl.* **1998**, *55*, 463–468. [[PubMed](#)]
33. Agil, A.; Durán, R.; Barrero, F.; Morales, B.; Araújo, M.; Alba, F.; Miranda, M.T.; Prieto, I.; Ramírez, M.; Vives, F. Plasma lipid peroxidation in sporadic Parkinson's disease. Role of the L-dopa. *J. Neurol. Sci.* **2006**, *240*, 31–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Prigione, A.; Begni, B.; Galbussera, A.; Beretta, S.; Brighina, L.; Garofalo, R.; Andreoni, S.; Piolti, R.; Ferrarese, C. Oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease: Negative correlation with levodopa dosage. *Neurobiol. Dis.* **2006**, *23*, 36–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Vinish, M.; Anand, A.; Prabhakar, S. Altered oxidative stress levels in Indian Parkinson's disease patients with PARK2 mutations. *Acta Biochim. Pol.* **2011**, *58*, 165–169.

36. Vida, C.; Martínez de Toda, I.; Garrido, A.; Carro, E.; Molina, J.A.; De la Fuente, M. Impairment of Several Immune Functions and Redox State in Blood Cells of Alzheimer's Disease Patients. Relevant Role of Neutrophils in Oxidative Stress. *Front. Immunol.* **2018**, *8*, 1974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Maté, I.; Cruces, J.; Giménez-Llort, L.; De La Fuente, M. Function and redox state of peritoneal leukocytes as preclinical and prodromic markers in a longitudinal study of triple-transgenic mice for Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2014**, *43*, 213–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Saito, Y.; Akazawa-Ogawa, Y.; Matsumura, A.; Saigoh, K.; Itoh, S.; Sutou, K.; Kobayashi, M.; Mita, Y.; Shichiri, M.; Hisahara, S.; et al. Oxidation and interaction of DJ-1 with 20S proteasome in the erythrocytes of early stage Parkinson's disease patients. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–11. [[CrossRef](#)]
39. Mackie, P.; Lebowitz, J.; Saadatpour, L.; Nickoloff, E.; Gaskill, P.; Khoshbouei, H. The dopamine transporter: An unrecognized nexus for dysfunctional peripheral immunity and signaling in Parkinson's Disease. *Brain Behav. Immun.* **2018**, *70*, 21–35. [[CrossRef](#)]
40. Bessler, H.; Djaldetti, R.; Salman, H.; Bergman, M.; Djaldetti, M. IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed. Pharmacother.* **1999**, *53*, 141–145. [[CrossRef](#)]
41. Grozdanov, V.; Bliederauser, C.; Ruf, W.P.; Roth, V.; Fundel-Clemens, K.; Zondler, L.; Brenner, D.; Martin-Villalba, A.; Hengerer, B.; Kassubek, J.; et al. Inflammatory dysregulation of blood monocytes in Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol.* **2014**, *128*, 651–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Calabrese, V.; Santoro, A.; Monti, D.; Crupi, R.; Di Paola, R.; Latteri, S.; Cruzzocore, S.; Zappia, M.; Giordano, J.; Calabrese, E.J.; et al. Aging and Parkinson's disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. *Free Rad. Biol. Med.* **2018**, *115*, 80–91. [[CrossRef](#)]
43. De Toda, I.M.; Vida, C.; De La Fuente, M. An appropriate modulation of lymphoproliferative response and cytokine release as possible contributors to longevity. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1598. [[CrossRef](#)]
44. Wikby, A.; Ferguson, F.; Forsey, R.; Thompson, J.; Strindhall, J.; Lofgren, S.; Nilsson, B.O.; Ernerudh, J.; Pawelec, G.; Johansson, B. An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: Impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.* **2005**, *60*, 556–565. [[CrossRef](#)]
45. De la Rosa, O.; Pawelec, G.; Peralbo, E.; Wikby, A.; Mariani, E.; Mocchegiani, E.; Tarazona, R.; Solana, R. Immunological biomarkers of ageing in man: Changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology* **2006**, *7*, 471–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Stevens, C.H.; Rowe, D.; Morel-Kopp, M.C.; Orr, C.; Russell, T.; Ranola, M.; Ward, C.; Halliday, G.M. Reduced T helper and B lymphocytes in Parkinson's disease. *J. Neuroimmunol.* **2012**, *252*, 95–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Fiszer, U.; Mix, E.; Fredrikson, S.; Kostulas, V.; Link, H. Parkinson's disease and immunological abnormalities: Increase of HLA-DR expression on monocytes in cerebrospinal fluid and of CD45RO+ T cells in peripheral blood. *Acta Neurol. Scand.* **1994**, *90*, 160–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kluter, H.; Vieregge, P.; Stolze, H.; Kirchner, H. Defective production of Interleukin-2 in patients with idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **1995**, *133*, 134–139. [[CrossRef](#)]
49. Marttila, R.J.; Eskola, J.; Soppi, E.; Rinne, U.K. Immune functions in Parkinson's disease, lymphocyte subsets, concanavalin A-induced suppressor cell activity and in vitro immunoglobulin production. *J. Neurol. Sci.* **1985**, *69*, 121–131. [[CrossRef](#)]
50. Bieganowska, K.; Członkowska, A.; Bidziński, A.; Mierzevska, H.; Korlak, J. Immunological changes in the MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *J. Neuroimmunol.* **1993**, *42*, 33–37. [[CrossRef](#)]
51. Arranz, L.; Caamano, J.H.; Lord, J.M.; De la Fuente, M. Preserved Immune Functions and Controlled Leukocyte Oxidative Stress in Naturally Long-lived Mice: Possible Role of Nuclear Factor Kappa B. *J. Gerontol. Ser. Biol. Sci. Med. Sci.* **2010**, *65A*, 941–950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Esteras, N.; Alquézar, C.; Bartolomé, F.; de la Encarnación, A.; Bermejo-Pareja, F.; Molina, J.A.; Martín-Requero, Á. G1/S Cell Cycle Checkpoint Dysfunction in Lymphoblasts from Sporadic Parkinson's Disease Patients. *Mol. Neurobiol.* **2015**, *52*, 386–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Niwa, F.; Kuriyama, N.; Nakagawa, M.; Imanishi, J. Effects of peripheral lymphocyte subpopulations and the clinical correlation with Parkinson's disease. *Geriatr. Gerontol. Int.* **2012**, *12*, 102–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Mihara, T.; Nakashima, M.; Kuroiwa, A.; Akitake, Y.; Ono, K.; Hosokawa, M.; Yamada, T.; Takahashi, M. Natural killer cells of Parkinson's disease patients are set up for activation: A possible role for innate immunity in the pathogenesis of this disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **2008**, *14*, 46–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Jiang, S.; Gao, H.; Luo, Q.; Wang, P.; Yang, X. The correlation of lymphocyte subsets, natural killer cell, and Parkinson's disease: A meta-analysis. *Neurol. Sci.* **2017**, *38*, 1373–1380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Dias, V.; Junn, E.; Mouradian, M.M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J. Parkinsons. Dis.* **2013**, *3*, 461–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ilic, T.; Jovanovic, M.; Jovicic, A.; Tomovic, M. Indices of Oxidative Stress in the Peripheral Blood of De Novo Patients with Parkinson's Disease. In *Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease*; Fisher, A., Hanin, I., Yoshida, M., Eds.; Plenum Press: New York, NY, USA, 1999; pp. 779–787. ISBN 0306459035.
58. Migliore, L.; Petrozzi, L.; Lucetti, C.; Gambaccini, G.; Bernardini, S.; Scarpato, R.; Trippi, F.; Barale, R.; Frenzilli, G.; Rodilla, V.; et al. Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurology* **2002**, *58*, 1809–1815. [[CrossRef](#)]
59. Chen, C.M.; Liu, J.L.; Wu, Y.R.; Chen, Y.C.; Cheng, H.S.; Cheng, M.L.; Chiu, D.T. yee Increased oxidative damage in peripheral blood correlates with severity of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *33*, 429–435. [[CrossRef](#)]
60. Ahlskog, J.E.; Uitti, R.J.; Low, P.A.; Tyce, G.M.; Nickander, K.K.; Petersen, R.C.; Kokmen, E. No evidence for systemic oxidant stress in Parkinson's or Alzheimer's disease. *Mov. Disord.* **1995**, *10*, 566–573. [[CrossRef](#)]
61. Mischley, L.K.; Standish, L.J.; Weiss, N.S.; Padowski, J.M.; Kavanagh, T.J.; White, C.C.; Rosenfeld, M.E. Glutathione as a Biomarker in Parkinson's Disease: Associations with Aging and Disease Severity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 9409363. [[CrossRef](#)]
62. Serra, J.A.; Domínguez, R.O.; de Lustig, E.S.; Guareschi, E.M.; Famulari, A.L.; Bartolomé, E.L.; Marschoff, E.R. Parkinson's disease is associated with oxidative stress: Comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients. *J. Neural Transm.* **2001**, *108*, 1135–1148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Abraham, S.; Soundararajan, C.C.; Vivekanandhan, S.; Behari, M. Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease. *Indian J. Med. Res.* **2005**, *121*, 111–115. [[PubMed](#)]
64. Sharma, A.; Kaur, P.; Kumar, B.; Prabhakar, S.; Gill, K.D. Plasma lipid peroxidation and antioxidant status of Parkinson's disease patients in the Indian population. *Parkinsonism Relat. Disord.* **2008**, *14*, 52–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Sudha, K.; Rao, A.V.; Rao, S.; Rao, A. Free radical toxicity and antioxidants in Parkinson's disease. *Neurol. India* **2003**, *51*, 60–62. [[PubMed](#)]
66. Sanyal, J.; Bandyopadhyay, S.K.; Banerjee, T.K.; Mukherjee, S.C.; Chakraborty, D.P.; Ray, B.C.; Rao, V.R. Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2009**, *13*, 129–132. [[PubMed](#)]
67. Kalra, J.; Rajput, A.H.; Mantha, S.V.; Prasad, K. Serum antioxidant enzyme activity in Parkinson's disease. *Mol. Cell. Biochem.* **1992**, *110*, 165–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Cristalli, D.O.; Arnal, N.; Marra, F.A.; de Alaniz, M.J.T.; Marra, C.A. Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *J. Neurol. Sci.* **2012**, *314*, 48–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Hoehn, M.; Yahr, M. Parkinsonism: Onset, progression and mortality. *Neurology* **1967**, *17*, 427–442. [[CrossRef](#)]
70. De la Fuente, M.; Hernanz, A.; Guayerbas, N.; Victor, V.M.; Arnalich, F. Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic. Res.* **2008**, *42*, 272–280. [[CrossRef](#)]
71. Lawrence, R.A.; Burk, R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *71*, 952–958. [[CrossRef](#)]
72. Massey, V.; Williams, C.H. On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 4470–4480. [[PubMed](#)]
73. Hissin, P.J.; Hilf, R. Effects of estrogen to alter amino acid transport in R3230AC mammary carcinomas and its relationship to insulin action. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 3381–3387. [[PubMed](#)]



ARTÍCULO 2

Biogerontology (2021) 22:49–62
<https://doi.org/10.1007/s10522-020-09902-x>



RESEARCH ARTICLE

Sex-related differences in behavioural markers in adult mice for the prediction of lifespan

Hikaru Kobayashi · Irene Martínez de Toda · Luis Sanz-San Miguel ·
Mónica De la Fuente 

Received: 24 July 2020 / Accepted: 9 October 2020 / Published online: 16 October 2020
© Springer Nature B.V. 2020

Abstract Finding biomarkers to assess the rate of ageing and consequently, to forecast individual lifespan is a challenge in ageing research. We recently published a mathematical model for lifespan prediction in adult female mice using behavioural parameters such as internal locomotion and time spent in open arms in the hole board (HB) and elevated plus maze (EPM) tests, respectively. Nevertheless, it is still not known if these behavioural variables could be useful in forecasting lifespan in male mice. Therefore, two

groups of ICR-CD1 mice, male and female were subjected to the EPM, HB and T-maze tests at the adult age. Mice were monitored until they died and individual lifespans were registered. In general, adult male mice showed more anxiety-like behaviours than females. The mathematical model previously developed in females was validated with the female cohort, but found to be suboptimal for lifespan prediction in males. Thus, a new model for male lifespan prediction was constructed including the behavioural variables that were predictive of lifespan in males: time in the central platform of the EPM, inner locomotion, number of groomings and number and duration of head-dippings in the HB. These results confirm that the higher the anxiety-like behaviour at the adult age, the shorter the lifespan.

Hikaru Kobayashi and Irene Martínez de Toda contributed equally to this research.

H. Kobayashi · I. Martínez de Toda ·
M. De la Fuente (✉)
Department of Genetics, Physiology and Microbiology
(Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology,
Complutense University, Madrid, Spain
e-mail: mondelaf@bio.ucm.es

H. Kobayashi · I. Martínez de Toda · M. De la Fuente
Institute of Investigation Hospital 12 Octubre, Madrid,
Spain

I. Martínez de Toda
Applied Molecular Medicine Institute, School of
Medicine, Universidad San Pablo CEU, CEU
Universities, Madrid, Spain

L. Sanz-San Miguel
Department of Statistics and Operational Research,
Faculty of Mathematics, Complutense University, Madrid,
Spain

Keywords Male and female mice behaviour ·
Lifespan prediction · Anxiety and exploratory
behaviour · Multiple lineal regression

Introduction

It is known that the rate of ageing and therefore, the expected lifespan differs between individuals with the same chronological age (Collier and Coleman 1991). Because of this, chronological age proves to be an unreliable tool in the estimation of the rate of ageing.

This leads to the necessity of finding appropriate biomarkers that will allow us to better evaluate this rate and to forecast individual lifespan. Since life expectancy data are difficult to collect in humans due to their long lifespan, mice, which have a mean longevity of around two years, are more suitable for the study and validation of biomarkers for the prediction of lifespan.

However, the question that remains is, which set of parameters have the potential to be accurate for the prediction of lifespan? It is known that ageing is accompanied by the progressive deterioration of the three main homeostatic systems: the endocrine, immune and nervous systems, which lose their regulatory capacity resulting in an increase of morbidity and mortality (Chahal and Drake 2007; De la Fuente and Miquel 2009). Therefore, it can be hypothesized that the early emergence of age-related changes in these homeostatic systems would influence the final lifespan achieved.

In fact, parameters concerning the performance of the homeostatic systems have been suggested as markers of the rate of aging, both in humans and mice. Such parameters include blood hormone levels (Bae et al. 2008), lymphocyte subsets (Miller 2001) and immune function parameters (Martínez de Toda et al. 2016). In order to evaluate the performance of the homeostatic systems in mice, the one that can be easily assessed, by carrying out behavioural tests, is the functioning of the nervous system. These tests provide cheap, non-invasive and easy-to-access data (Gilad and Gilad 1995; Dellu et al. 1996).

Actually, some behavioural indices have been postulated as markers of premature ageing in rodents. This is the case of the fear of novelty in rats (*neophobia*) (Cavigelli and McClintock 2003) or anxiety/emotionality in mice measured in the T-maze (Viveros et al. 2001, 2007). Thus, groups of rodents with a higher fear of novelty or a higher anxiety at the adult age showed a shorter lifespan than those with lower emotionality. For its importance as a readout of the function of the nervous system, its proven relevance in ageing and its accessibility, in this study we focused on the behavioural performance of mice at the adult age. Two of the most commonly used tests to assess the anxiety state and exploratory capacities in rodents are the elevated plus maze (EPM) and the hole board (HB) tests, respectively (File and Day 1972; Walf and Frye 2007).

However, very few studies investigated the applicability of behavioural parameters to predict individual lifespans by the construction of mathematical models. In this regard, it was recently demonstrated by our research group that two behavioural indices, namely internal locomotion in the HB test and time spent in open arms in the EPM test, measured at the adult age in female ICR-CD1 mice, can be combined into a mathematical model to predict individual lifespan in female mice (Martínez de Toda et al. 2019). Nevertheless, it is still not known if the above mentioned indices could also be used for lifespan prediction in males, considering the behavioural differences that have previously been reported between male and female mice (Frick and Gresack 2003; Tanaka 2015; Yokota et al. 2017).

Therefore, male and female ICR-CD1 mice, were subjected to the elevated plus maze, the hole board and the T-maze tests at the adult age (40 weeks-old). Both groups were monitored individually throughout the ageing process until they died and individual lifespans were registered. This approach allowed us firstly to investigate the behavioural differences between male and female adult ICR-CD1 mice and secondly, to ascertain the applicability and reproducibility of the previously developed mathematical model for females in the new group of male and female mice, respectively. Finally, it allowed us to identify the strongest behavioural parameters for lifespan estimation in males by developing a mathematical model using multiple linear regression (MLR) with the behavioural indices obtained in adult male mice.

Methods

Experimental animals

Two groups of male (N = 43) and female (N = 45) outbred ICR-CD1 mice (*Mus musculus*) were obtained from Janvier Labs (Germany) at the age of 30 ± 4 weeks. They were housed in separate rooms, under standard conditions in $21.5 \times 46.5 \times 14.5$ cm transparent polycarbonate cages with a wire mesh top, between 4 and 6 mice per cage. Standard wood chip bedding was used, with a reversed day/night cycle of 12:12 h (lights off at 0800 h) with access to standard pelleted food (Envigo Teklad, USA) and tap water ad libitum. These mice were left to acclimatize to the

new housing conditions for 10 weeks and then subjected to the behavioural tests described below. Mice were subjected to each test only once at the adult age of 40 ± 4 weeks and were maintained in the same housing conditions until their natural deaths, which were registered (observed lifespan).

Anxiety and exploratory behavioural tests

All tests were performed in a different room as the housing room and after a period of acclimatization to the experimentation room of 1 h. The three tests were performed on individual mice in increasing order of potential stress produced in the animals in order to have the minimal possible impact in the following tests (i.e. T-maze first, then EPM and HB last) (Crawley 2008) and the ones done by Martínez de Toda et al. (2019) for maximum reproducibility. Mice were individually tested once per test, with an interval of one week between each test. All tests were performed between 0830 and 1130, so that behaviour was not affected by circadian rhythms and the apparatus was cleaned between mice with 70% ethanol and then water to remove possible olfactory cues from the previous mouse.

T-maze

The T-maze is a T-shaped structure with a vertical arm of 27×10 cm and a horizontal arm of 64×10 cm, which are bordered by 19 cm high black wooden walls. The base of the apparatus is made of 0.5 cm diameter metal rods perpendicular to the orientation of each arm, each being separated by a 0.5 cm gap. Mice were placed one by one in the lower part of the vertical arm facing the wall, under red ambient light with a 20 W dim white spotlight and were allowed to explore the maze. The point in time at which all four paws of the mouse crossed to the horizontal arm was recorded as a measure of the spontaneous exploratory capacity.

Elevated plus maze

The Elevated Plus-Maze (EPM) was acquired from Panlab (Spain) and consists of a cross shape composed of two opposed open arms (OA) and two opposed

closed arms (CA), each of 30×5 cm black wood. The CAs are surrounded on three sides by 40 cm high black wooden walls meanwhile the OAs lacked walls. These arms intersect at a central platform (CP) that measures 5×5 cm (also in black). The set-up is elevated 40 cm from the floor. Mice were placed individually on the CP facing an OA and were left to explore freely for 5 min under red light with a 75 W bright white spotlight. To ensure minimum interference, the scientist left the experimentation room and the test was recorded on video and was later used to obtain the parameters of total time spent in OAs, total time spent in CAs, total time spent in the CP, as well as the number of entries into each type of section (OA, CA and CP), an entry being considered when all four paws were placed into the same section.

Hole board test

The Hole Board (HB) is an enclosed square-shaped black board ($60 \times 60 \times 45$ cm) divided into 36 squares (10×10 cm), with four circular holes (3.8 cm in diameter) in the corners of the four central squares, each containing a white plastic object to motivate inspection by the mice. The 20 squares adjacent to a wall segment were considered “external” and the rest “internal” squares. Mice were placed one by one in a corner facing the wall and left to freely explore for 5 min under red light with a 75 W bright white spotlight and was video recorded. The following parameters were analysed: horizontal exploration, measured by total locomotion (total number of squares crossed), internal and external locomotion as total number of squares crossed and as a percentage of the total locomotion. Moreover, vertical exploration, measured by the number and duration of positions in which the mouse raises its body more than 45° on its hind paws (rearings with or without support from walls) was also assessed. As a measure of “directed exploration” the number and duration of positions in which the mouse introduces its head into a hole (head-dippings) were recorded. The number and duration of positions in which the mouse grooms its face, body or both (groomings) were also quantified.

All measured variables are summarized in Table 1.

Table 1 Variables measured in each behavioural test

Test	Parameter	Description
T-maze	Time to cross the intersection	Time (s) needed for the mouse to cross the metal rod separating the vertical and the horizontal arms with its four paws
Elevated Plus Maze	Time spent in CP	Time (s) of permanence in the central platform under the four paws criteria
	Time spent in OA	Time (s) of permanence in either of the open arms under the four paws criteria
	Time spent in CA	Time (s) of permanence in either of the closed arms under the four paws criteria
	Number of entries into the CP	Number of crossings to the central platform from any other section
	Number of entries into OA	Number of crossings to open arms from the central platform
	Number of entries into CA	Number of crossings to closed arms from the central platform
Hole Board	Total locomotion	Total number of squares traversed through under the four paws criteria
	Inner locomotion	Number of squares traversed through in areas not directly adjacent to the wall
	Outer locomotion	Number of squares traversed through in areas directly adjacent to the wall
	Percentage of inner locomotion	Inner locomotion divided by total locomotion times 100
	Percentage of outer locomotion	Outer locomotion divided by total locomotion times 100
	Number of supported rearings	Number of positions in which the mouse stands on the rear paws lifting its body more than 45° from the ground supported against a wall
	Time in supported rearing position	Accumulated permanence (s) in supported rearing positions
	Number of unsupported rearings	Number of rearing positions without support from walls
	Time in unsupported rearing position	Accumulated permanence (s) in unsupported rearing positions
	Number of head-dippings	Number of positions in which the mouse inserts its head into a hole up to its ears
	Time in head-dipping position	Accumulated permanence (s) in head-dipping positions
	Number of groomings	Number of positions in which the mouse grooms itself
	Time in grooming position	Accumulated permanence (s) in grooming positions

CP central platform; OA open arms, CA closed arms

Statistical procedures

Behavioural comparison between males and females

The observed lifespans of male and female groups were recorded employing a Kaplan–Meier survival plot and were compared using a log rank test.

The normality of the behavioural performance of each sex was evaluated using a *Kolmogorov–Smirnov* test and the homoscedasticity using a *Levene* test (data not shown). Comparisons between the variables of

each sex were carried out using a two-tailed *Student's t* test for unpaired samples with a minimum significance level of $p < 0.05$.

Validation and cross-sex confirmation of the previous female mathematical model

The cross-validations were evaluated using Pearson's correlation coefficient applying the previous female two-parameter model (Eq. 1, as described in Martínez

de Toda et al. (2019) with the newly obtained male and female data.

$$\begin{aligned} \text{Estimated lifespan} = & 11.833 + 0.378 \\ & \times (\text{Internal locomotion}) \\ & + 0.202 \\ & \times (\text{Time spent in open arms}). \end{aligned} \quad (1)$$

New behavioural model construction for males and validation

The new mathematical model was generated using Multiple Linear Regression (MLR) with SPSS 21 (IBM SPSS Statistics) with a forward step-wise method, in which the variable most useful for prediction is selected and the variables most fitting with the observed lifespan, considering those previously introduced, are successively selected with a threshold of $p < 0.05$. The observed lifespan was used as a dependent variable and the rest as independent variables.

This newly generated male model was validated as well by the Pearson's correlation coefficient comparing the observed vs the estimated lifespan in the male group.

Results

Behavioural comparison between males and females

The results obtained in the different behavioural parameters analysed in adult male and female ICR-CD1 mice are shown in Figs. 1 and 2 as well as in Table 2.

Exploratory behaviour

Differences due to sex were observed with respect to the exploratory behaviour in both horizontal and vertical exploration in the HB (Fig. 1). Horizontal exploration was measured by the raw amount of square divisions traversed in the HB test, in which females performed a significantly higher locomotion in the inner ($p < 0.05$, Fig. 1a) but not in the outer regions of the board ($p = 0.206$, Fig. 1b), nor in the

total count of traversed squares, than males (total locomotion, $p = 0.646$, Table 2). However, with respect to vertical exploration, represented by the number (Fig. 1c) and time (Fig. 1d) of unsupported rearing positions, male mice had a higher number and duration of rearing than females ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). Nevertheless, no significant differences were found between male and female mice regarding goal-directed exploration, measured by the number and duration of head-dipping positions (data shown in Table 2).

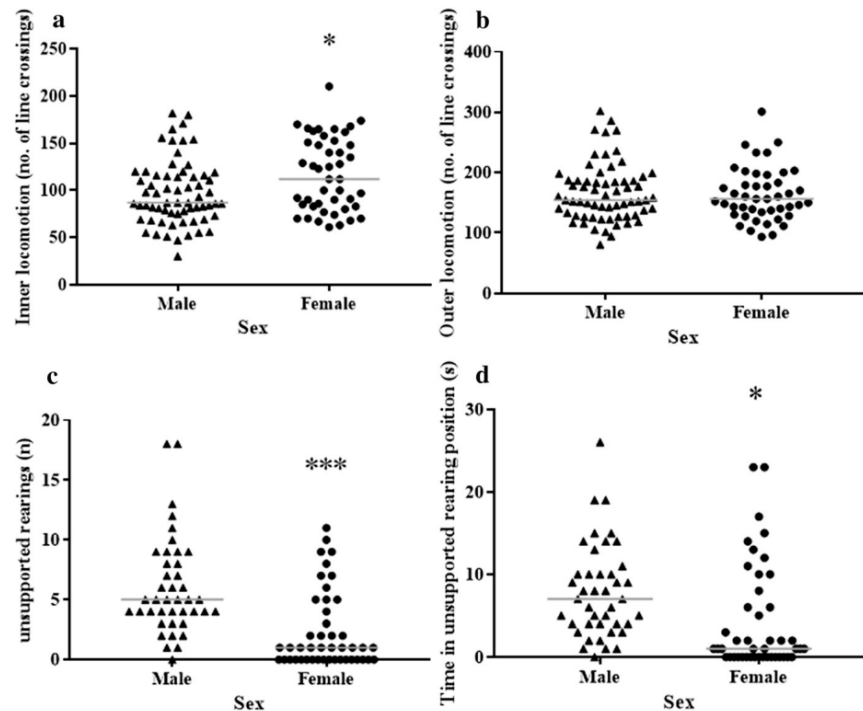
Anxiety-like behaviour

Other variables that can be categorized as anxiety-like parameters are shown in Fig. 2. First, inner and outer locomotion were obtained as a percentage, dividing the number of internal or external crossed squares by the total squares crossed in the HB. It was observed that female mice had a higher percentage of inner locomotion and lower outer locomotion than males ($p < 0.001$, Fig. 2a, b, respectively). With respect to the number of grooming behaviours in the HB, these were more abundant in females compared to males ($p < 0.001$, Fig. 2c), but there were no statistically significant differences in total time performing grooming behaviours (data shown in Table 2). Regarding rearings in the HB, males spent more time than females in rearing positions supported against the wall ($p < 0.001$, Fig. 2d), but there were no statistically significant differences in the total number of supported rearings each sex performed (data shown in Table 2). In addition, male mice took significantly longer average times to reach the intersection between arms in the T-maze test than females ($p < 0.05$, Fig. 2e). And concerning the derived indices from the EPM, it was found that male mice spent more time in the CP of the maze than females ($p < 0.001$, Fig. 2f), whereas no statistically significant differences were observed regarding the time spent or the number of entries in open or closed arms (data shown in Table 2).

Mice survival

In this study, male mice lived between 48 and 115 weeks (mean $\pm$ standard deviation of 79 ± 15 weeks) and females between 41 and 132 weeks (78 ± 24 weeks). Kaplan–Meier survival curves showed no statistical difference between male

Fig. 1 Comparison of exploration-related parameters between adult male and female ICR-CD1 mice. **a** Number of inner squares and **b** Number of outer squares crossed in the HB test; **c** Number of unsupported rearings and **d** Time in unsupported rearing position in the HB test. Individual data for each mouse and the median of the values obtained for each parameter are depicted. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$



and female survival ($\chi^2 = 0.199$, $p = 0.655$, data not shown).

Application of the model for female mice lifespan prediction previously developed to the new batches of both sexes

The previously published mathematical model for lifespan prediction in female mice (Martínez de Toda et al. 2019) was applied to the new two cohorts of male and female mice used in this study and represented in a scatter plot. This resulted in a *Pearson's* correlation coefficient of 0.774 ($p < 0.001$) between predicted and observed lifespan for females and a *Pearson's* correlation coefficient of 0.421 ($p = 0.005$) for male mice (Fig. 3).

Generation of a male lifespan prediction model based on behavioural indices

To develop a mathematical model for the estimation of the lifespan of male mice based on their behavioural data gathered at the adult age, a Multiple Lineal Regression model (MLR) was used. The first and most predictive variable selected was the time spent in the

CP of the EPM, which accounted for 43.3% of the observed variance in lifespan. With the introduction of the second variable (percentage of internal locomotion in the HB) the explained variance increased to 50.5%. The number of head-dippings was selected as the third variable and it rose to 56.6%. The fourth variable was the number of groomings performed in the HB, which increased the explained variance to 61.8%, and the fifth and final variable included (duration of head-dippings) resulted in an increase of the explained variance in individual lifespan of the model to 63.6%. These results are summarized in Table 3.

Therefore, the equation obtained for male lifespan prediction based on behavioural data is shown in Eq. 2.

$$\begin{aligned} \text{Estimated lifespan} = & 48.8 + 0.33 \\ & \times (\text{Time in central platform}) + 0.77 \\ & \times (\text{Percentage of internal locomotion}) - 1.52 \\ & \times (\text{Number of head - dippings}) - 3.42 \\ & \times (\text{Number of groomings}) + 0.15 \\ & \times (\text{Duration of head - dippings}). \end{aligned} \quad (2)$$

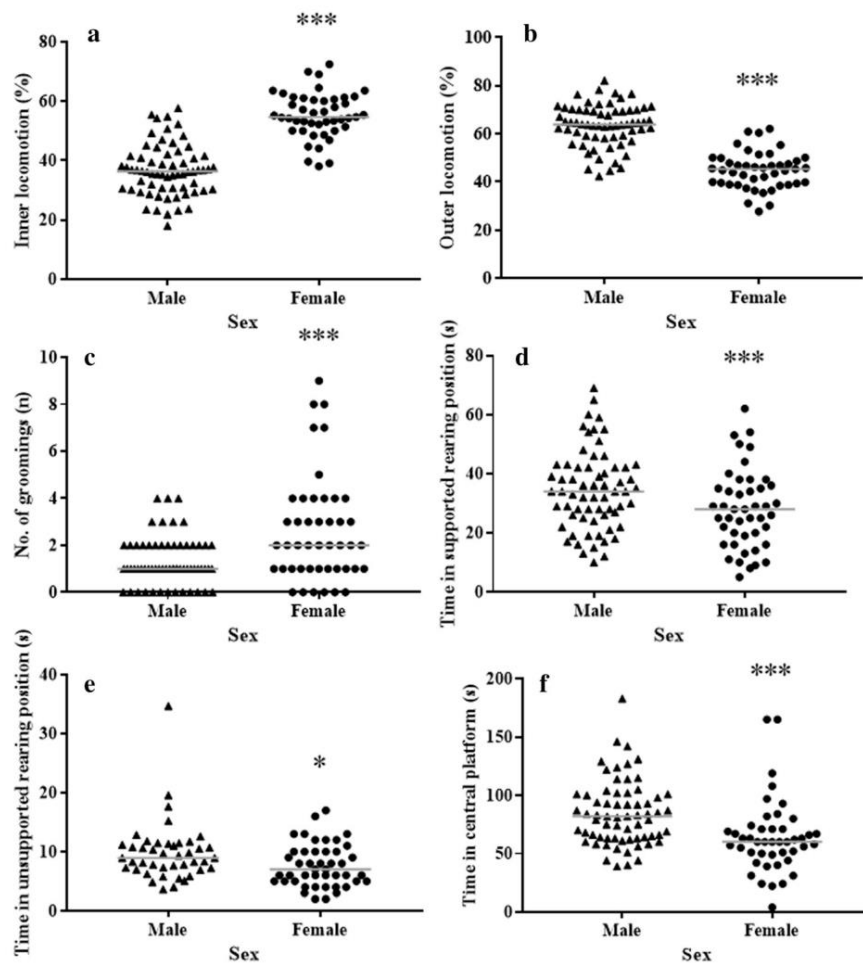


Fig. 2 Comparison of anxiety-related parameters between adult male and female ICR-CD1 mice. **a** Percentage of inner locomotion and **b** Percentage of outer locomotion in the HB. **c** Number of groomings in the HB. **d** Time in supported rearing

positions in the HB. **e** Time needed to reach the intersection in the T-maze. **f** Time spent in CP in the EPM. Individual data for each mouse and the median of the values obtained for each parameter are depicted. *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$

Table 2 Behavioural variables in which no statistically significant differences were found between adult male and female ICR-CD1 mice

Variable	Male		Female	
	Mean	SEM	Mean	SEM
Total locomotion	266	10	273	9
No. of supported rearing positions (n)	25.8	1.5	21.4	1.8
No. of head-dippings (n)	17.3	0.8	18.2	0.9
Time in head-dipping position (s)	50.4	3.5	56.6	4.8
Time to reach centre squares (s)	35.1	3.7	29.0	3.7
Time in grooming position (s)	6.0	0.9	7.0	0.9
Time in closed arms (s)	125.7	5.6	143.8	9.6
Time in open arms (s)	91.6	5.6	104.8	10.4
No. of closed-arm entries	11.4	0.5	10.5	0.6
No. of open-arm entries	8.7	0.7	7.7	0.7

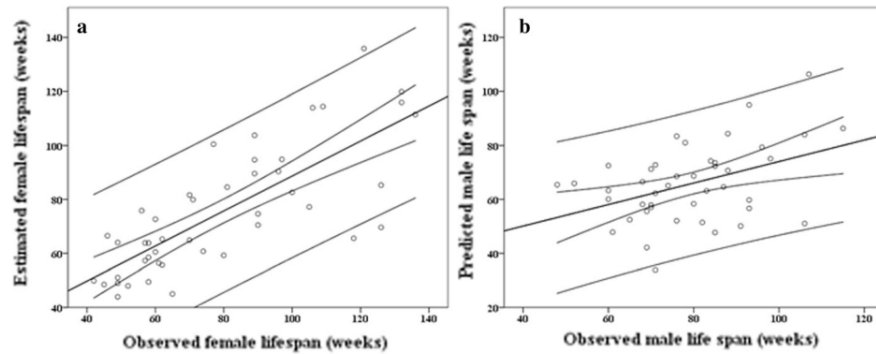


Fig. 3 Correlations between observed and predicted lifespans when applying the mathematical model previously developed with female mice, to the new cohorts of female (**a**) and male mice (**b**) of this study. The closest lines are the mean 95% confidence interval and the furthest lines correspond to the

individual 95% confidence intervals. The application of the previous female mathematical model to the new female mice results in a *Pearson's* correlation coefficient of 0.774 with a *p* value lower than 0.001 and a *Pearson's* correlation coefficient of 0.421 with a *p* value of 0.005 for males in the new cohorts

Table 3 The generated lifespan prediction model in male mice

Steps	1 variable	2 variables	3 variables	4 variables	5 variables
R ²	44.7%	52.9%	59.7%	65.5%	67.9%
Adjusted R ²	43.3%	50.5%	56.6%	61.8%	63.6%
Constant ($\hat{\beta}_0$)	42.8(6.6)	29.1(8.0)	37.9(8.3)	49.3(9.0)	48.8(8.8)
Time in central platform ($\hat{\beta}_1$)	0.44(0.08)***	0.33(0.08)***	0.35(0.08)***	0.32(0.07)***	0.33(0.07)***
Internal locomotion (%) ($\hat{\beta}_2$)	—	0.64(0.24)*	0.74(0.23)**	0.75(0.22)***	0.77(0.21)***
Number of head-dippings ($\hat{\beta}_3$)	—	—	— 0.81(0.32)*	— 1.00(0.31)**	— 1.52(0.43)***
Number of groomings ($\hat{\beta}_4$)	—	—	—	— 3.53(1.40)*	— 3.42(1.37)*
Duration of head-dippings ($\hat{\beta}_5$)	—	—	—	—	0.15(0.09)

Each column depicts each additional variable introduced in the model and the rows contain the R² and adjusted R² values for each of the sets of variables considered and the coefficients for each variable with the standard mean error in brackets

p* < 0.05 *p* < 0.005 ****p* < 0.001

Validation of the male-model

To test whether the newly generated male lifespan prediction model correlated better with the observed lifespan of the male mice, the observed and predicted values of the lifespan of each mouse were represented in a scatter plot (Fig. 4). The correlation between the model and male data was assessed by *Pearson's* correlation coefficient with a value of 0.824 and a significance of *p* < 0.001. However, when this newly generated mathematical model was applied to female mice only a non-significant (*p* = 0.238) *Pearson's* correlation coefficient of 0.180 was obtained.

Discussion

To our knowledge, this study represents the first attempt at forecasting the individual lifespan of male mice at the adult age using easily accessible, non-invasive procedures, such as behavioural performance. The importance of knowing the approximate lifespan of a mouse at the adult age based on behavioural parameters is threefold. Firstly, this would enable the testing of the effects that a given treatment, or a lifestyle factor has on the lifespan of each individual mouse, without having to wait until the natural death of the animal. Secondly, the pre-estimation of the expected lifespan of individual mice

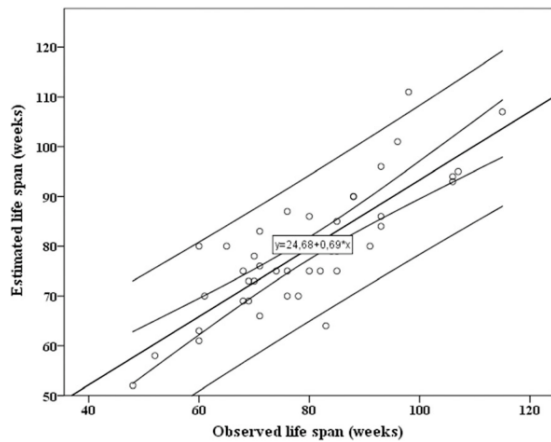


Fig. 4 Correlation between observed and estimated lifespan calculated with the newly generated five-variable model in the same cohort of male mice. The central line and equation represent the regression equation, the next closest lines are the mean 95% confidence intervals and the widest lines correspond to the individual 95% confidence intervals. The *Pearson's* correlation coefficient value was 0.824 with a significance of $p < 0.001$

would allow us to homogenize control and experimental groups and therefore would diminish the heterogeneity of data. Thus, this would help to reduce the number of animals needed for an effective experiment. And thirdly, the identification of these predictive parameters could be of assistance in finding out the underlying mechanisms between a specific variable and longevity in males.

There have been previous attempts at predicting remaining lifespan in male mice based on behavioural and physiological parameters. However, these have been carried out in old or about-to-die mice (Ingram et al. 1982; Ray et al. 2010; Fahlström et al. 2012). More recently, some lifespan prediction models based on frailty characteristics have also been developed (Kane et al. 2019). Such lifespan prediction model reaches a slightly lower explained variance than the one described in this study but employs measurements dependant on varying degrees of technical equipment, personal expertise and possibly experimenter influence or bias. Additionally, most of the studies were performed using inbred mice, which tend to be more phenotypically homogeneous and would result in a more reproducible outcome (Phelan 1992). However, that homogeneity would limit the conclusions about the general ageing process in a more genetically diverse context, such as in humans. In the present

study, we have used mice of the outbred ICR-CD1 strain and lifespan prediction has been carried out at the adult age. The earlier the lifespan prediction, the longer possibility of intervention, which could, in fact, show more beneficial effects. Supporting this idea, it was found that an environmental enrichment intervention in adult mice resulted in an increased lifespan, whereas the same strategy applied in old age was unable to increase longevity (Arranz et al. 2010). In addition, physical training in young mice was reported to have life-long benefits, even if the training was discontinued later on (Warden et al. 2007).

The differences between male and female have been always apparent but, only recently a consciousness has arisen for clinical and preclinical trials to be made in both sexes (Clayton and Collins 2014). Moreover, changes in yearly cycles (circannual rhythms) can have an important effect in many biological performances (Mate et al. 2014). These facts underscore the importance of carrying out these kinds of tests in both sexes and during a similar time of the year.

Previously published studies investigating behavioural differences between males and females in other strains, have shown conflicting results. For instance, some authors report females spending more time in the open arms (OA) of the EPM than males (Frick et al. 2000; Caldarone et al. 2008; Fahlström et al. 2011, 2012). Other authors describe less time spent in OA by females (Frick et al. 2000). Whilst some other studies found no substantial differences between the sexes (Fahlström et al. 2011, 2012). Thus, we decided to first investigate the differences between male and female mice subjected to several behavioural tests, namely the EPM, the HB and the T maze. The addition of the T maze from the previous study by Martinez de Toda et al. (2019) is justified as it was described as being useful for the detection of anxiety-like behaviours which ultimately influence the rate of ageing and lifespan (Viveros et al. 2001).

With respect to exploratory behaviours, the results demonstrate that males performed better in vertical exploration than females (measured as number and duration of unsupported rearings), which in turn, performed more horizontal explorations (measured as total inner locomotion in the HB test), whereas there were no differences regarding the outer and the total locomotion between sexes. Different studies reported conflicting results in horizontal exploration not only

between the sexes, but also between strains (Gioiosa et al. 2007; Arndt et al. 2009). However, regarding the vertical component of exploration, our results agree with what has been reported for this, and other strains of mice (An et al. 2011). Indeed, this together with the fact that males tend to show greater neuromuscular vigour and coordination than females (Viveros et al. 2001) could lead one to think that both sexes show a similar drive towards exploration within the scope of their capabilities, males performing more rearings to explore distant spaces and females engaging in closer inner exploration.

In regard to anxiety-like behaviour, it was found that female mice spend a higher percentage of time exploring the inner region of the HB test than males, while males spend a higher percentage of time exploring the outer region of the HB test than females. Because mice have a natural aversion to the brightly lit centre of an open field, the higher the exploration of the inner space in the hole board test, the less the anxiety-like behaviour (Kassed and Herkenham 2004). This suggests that males are more anxious than females. However, when looking at the number of groomings performed by each sex, it was found that females performed more grooming behaviours than males. This is striking as it has been previously reported that increased self-grooming correlates with an enhanced anxiety-like state (D'Amato and Pavone 1992; Kalueff and Tuohimaa 2005). However, other studies have reported for this and other strains, that the basal performance of this parameter is not comparable between males and females. Thus, conclusions about anxiety levels between sexes may not be made regarding groomings (Zhan et al. 2015; Amodio et al. 2019).

Whereas unsupported rearings are considered an exploratory behaviour, supported rearings against the wall can be considered as an attempt by the mouse to escape a stressful situation and therefore they can be considered as an anxiety-like behaviour (Lever et al. 2006). Thus, the fact that male mice perform higher supported rearings than females reinforces the idea of males being more anxious.

Regarding the T-maze test, it has been postulated that the longer the time that a mouse needs to cross the intersection of the T, the higher the anxiety-like behaviour (Guayerbas et al. 2000). This is due to the fact that when anxious mice are placed in a new environment, they normally show freezing behaviour

which makes them need more time to cross the intersection. Again, male mice took a longer time to cross the intersection of the T-maze than females.

In the EPM test, the time spent in closed arms is a classic indicator of anxious behaviour, given that mice feel safer in these arms protected by walls (Rodgers and Dalvi 1997). Nevertheless, we observed no differences with respect to this parameter between male and female mice. However, it was found that male mice spent more time than females in the CP of the EPM test. The CP can be considered a protected space (Rodgers and Johnson 1995), due to the partial lack of surrounding walls, but with easy access to enclosed areas. It is regarded as a readout of the decision making and waiting capacities in rats, although significantly affected by and related to the basal anxiety of the lab animals (Cruz et al. 1994; Clément et al. 2007; Casarrubea et al. 2015). Thus, it seems that males need more time than females in terms of decision making.

The next aim of our study was to investigate whether the previously developed mathematical model for lifespan prediction in female mice (Martínez de Toda et al. 2019) would be applicable to male mice. The behavioural indices that the female mathematical model included were the time spent in open arms in the EPM test and the total inner locomotion in the HB test, both variables with a positive constant, meaning the higher these parameters the longer the predicted individual lifespan. When applied to the new data gathered from male mice, it was found to be useful for prediction ($p = 0.005$) although not as accurate in males as in females (Pearson's correlation coefficient 0.421 and 0.774, respectively). Nevertheless, this result demonstrates that the lower the anxiety-like behaviour a male mouse shows at the adult age, the longer it lives, as was previously demonstrated for female mice.

Still, we decided to use all the behavioural variables recorded at the adult age in male mice and through multiple linear regression developed a new model for males to identify if there were any other behavioural indices more related to final achieved lifespan in males. The selected variables were (in order of robustness into the mathematical model): time spent in the CP, percentage of inner locomotion, number of head-dippings, number of groomings and duration of head-dippings. The only variables that negatively

affected life expectancy were number of head-dippings and number of groomings.

As previously mentioned, the time spent in the CP can be regarded as an indication of the decision making and waiting capacities (Cruz et al. 1994; Casarrubea et al. 2015). Thus, it seems that the longer the time to think about and decide the next section to visit, the longer the lifespan in male mice. However, although it is an intriguing fact, the reasons behind this phenomenon are beyond the scope of this study. The next variable selected, percentage of inner locomotion, agrees with the previous study developed in female mice (Martínez de Toda et al. 2019). However, regarding head-dipping behaviours, the variables obtained seem controversial. On the one hand, the higher the number of head-dippings a mouse performs the shorter it lives but, on the other hand, the higher the time spent in head-dipping behaviour, the longer it lives. This may reflect that a greater commitment to exploration of a hole instead of short and repetitive glances could be the indication of a healthy nervous system. This is also hinted at by a study by Magaji et al., in which resveratrol treatment, one of the most widely accepted drugs to extend lifespan (Sinclair 2005), caused a reduction in the number of head-dipping behaviours in the same strain of mice (Magaji et al. 2017). This agrees with our result that fewer head-dippings correlate with longer lifespans. However, since resveratrol can have such pleiotropic effects, it is still too early to reach a conclusion about the causality of this behaviour in the context of organism longevity. Finally, the obtained model suggests that the higher the number of grooming behaviours, the shorter the lifespan in male mice, reinforcing the idea that grooming behaviour correlates with an enhanced anxiety-like state (D'Amato and Pavone 1992; Kalueff and Tuohimaa 2005).

To sum up, the variables that related most strongly with the age of natural death were anxiety-like behaviours, as the percentage of internal locomotion in the HB, time spent in CP of the EPM and number of groomings in the HB, demonstrating that the lower the anxiety-like behaviour a male mouse shows at the adult age, the longer it lives, as was previously shown for female mice (Viveros et al. 2001; Martínez de Toda et al. 2019).

Nevertheless, the new mathematical model developed for lifespan prediction in male mice was shown to not be useful for females. The discrepancies

between male and female models remark the differences between sexes not only in the behavioural performance, but also in the sex-dependent role each behavioural variable play in the development of ageing itself.

One of the reasons male lifespan prediction needed more variables and resulted in a lower explained variance than in females, may be attributed to the natural aggressiveness of males when compared to females. As recently described by Razzoli et al., dominant-subordinate status among male mice can have important effects on age-related damage accumulation, such as increased senescence markers, metabolic and cardiovascular disorders and generally lower life expectancies (Razzoli et al. 2018). Even if partially mitigated by using littermates cohabitating in the same cage since birth, this aggressive behaviour could lead to wounds and infections with unforeseeable or unpreventable effects that could alter individual observed lifespans and therefore, compromise the predictive capacity of any model.

As limitations to this research, future studies with additional cohorts of male mice are needed to perform the cross-validation of the proposed lifespan prediction model. In addition, although previous studies have demonstrated that mice with anxiety have higher oxidative stress and worse immune functionality (Viveros et al. 2001, 2007; Masood et al. 2008), to further confirm the reliability of the results, information on the correlation of the selected behavioural variables with recognized markers of aging, such as those of oxidative stress or immunosenescence, will be required.

Nevertheless, the results of the present study show that first, male ICR-CD1 mice at the adult age display a different behaviour when compared to their age-matched female counterparts. Thus, males show symptoms of an increased anxiety-like state as seen in higher parameters of percentage of outer locomotion and time in supported rearing position in the HB, as well as time to reach the intersection in the T maze and time spent in the CP of the EPM, compared to females, although no difference in time spent in OA was seen. Secondly, the previously published lifespan prediction model based on behavioural data at the adult age in female mice was shown to have a significant correlation with observed lifespan in adult male mice, although with a lower accuracy than that observed in females, and conversely, the newly

generated ‘male’ lifespan prediction model was unsuccessful at predicting female lifespan, highlighting the importance of using both sexes in ageing studies. In addition, it was found that a different set of behavioural indices, such as time spent in the CP of the EPM, percentage of locomotion in the inner region of the HB, number of groomings and number of and duration of head-dippings in the HB were best for male lifespan prediction. The fact that time in CP of the EPM, rather than in OA, is more predictive of longevity in males may point towards different molecular mechanisms involved in dealing with decision making and anxiety in males and females.

Although further studies are needed to understand how behaviour affects lifespan in a sex-dependent manner, this study could potentially become a useful time-saving tool in longitudinal mice studies conducted on this strain and may help to decode the intrinsic pathways regulating the decline experienced during the physiological ageing process.

Author contributions HK and IMT performed the material collection, analysed and interpreted the generated data and drafted the manuscript. LSM gave insight and supervised the mathematical model construction, and revised the manuscript. MDF conceived and design this study, funded the project and critically supervised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This work was supported by grants of FIS (PI15/01787) from the ISCIII-FEDER of the European Union and of UCM-Research Group.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Authors report no conflict of interest.

Ethical approval All procedures were approved by the Animal Experimentation Committee of the Universidad Complutense de Madrid.

Informed consent All authors have given explicit consent for publication of the current manuscript.

References

- Amodeo DA, Pahua AE, Zarate M et al (2019) Differences in the expression of restricted repetitive behaviors in female and male BTBR T + tf/J mice. *Behav Brain Res* 372:112028. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112028>
- An X-L, Zou J-X, Wu R-Y et al (2011) Strain and sex differences in anxiety-like and social behaviors in C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Exp Anim* 60:111–123. <https://doi.org/10.1538/expanim.60.111>
- Arndt SS, Laarakker MC, van Lith HA et al (2009) Individual housing of mice—Impact on behaviour and stress responses. *Physiol Behav* 97:385–393. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.008>
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I et al (2010) Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Res* 13:415–428. <https://doi.org/10.1089/rej.2009.0989>
- Bae CY, Kang YG, Kim S et al (2008) Development of models for predicting biological age (BA) with physical, biochemical, and hormonal parameters. *Arch Gerontol Geriatr* 47:253–265. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2007.08.009>
- Caldarone BJ, King SL, Picciotto MR (2008) Sex differences in anxiety-like behavior and locomotor activity following chronic nicotine exposure in mice. *Neurosci Lett* 439:187–191. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.023>
- Casarrubea M, Faulisi F, Sorbera F, Crescimanno G (2015) The effects of different basal levels of anxiety on the behavioral shift analyzed in the central platform of the elevated plus maze. *Behav Brain Res* 281:55–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.021>
- Cavigelli SA, McClintock MK (2003) Fear of novelty in infant rats predicts adult corticosterone dynamics and an early death. *Proc Natl Acad Sci* 100:16131–16136. <https://doi.org/10.1073/pnas.2535721100>
- Chahal HS, Drake WM (2007) The endocrine system and ageing. *J Pathol* 211:173–180
- Clayton JA, Collins FS (2014) Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature* 509:282–283. <https://doi.org/10.1038/509282a>
- Clément Y, Joubert C, Kopp C et al (2007) Anxiety in mice: a principal component analysis study. *Neural Plast*. <https://doi.org/10.1155/2007/35457>
- Collier TJ, Coleman PD (1991) Divergence of biological and chronological aging: evidence from rodent studies. *Neurobiol Aging* 12:685–693. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(91\)90122-Z](https://doi.org/10.1016/0197-4580(91)90122-Z)
- Crawley JN (2008) Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron* 57:809–818. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.001>
- Cruz APM, Frei F, Graeff FG (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49:171–176. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90472-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90472-3)
- D’Amato FR, Pavone F (1992) Role of anxiety in subordinate male mice sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 43:181–185. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(92\)90655-Y](https://doi.org/10.1016/0091-3057(92)90655-Y)
- De la Fuente M, Miquel J (2009) An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* 15:3003–3026. <https://doi.org/10.2174/138161209789058110>
- Dellu F, Mayo W, Vallée M et al (1996) Behavioral reactivity to novelty during youth as a predictive factor of stress-induced corticosterone secretion in the elderly: a life-span

- study in rats. *Psychoneuroendocrinology* 21:441–453. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(96\)00017-0](https://doi.org/10.1016/0306-4530(96)00017-0)
- Fahlström A, Yu Q, Ulfhake B (2011) Behavioral changes in aging female C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* 32:1868–1880. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.003>
- Fahlström A, Zeberg H, Ulfhake B (2012) Changes in behaviors of male C57BL/6J mice across adult life span and effects of dietary restriction. *Age (Omaha)* 34:1435–1452. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9320-7>
- File SE, Day S (1972) Effects of time of day and food deprivation on exploratory activity in the rat. *Anim Behav* 20:758–762. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(72\)80148-9](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(72)80148-9)
- Frick KM, Burlingame LA, Arters JA, Berger-Sweeney J (2000) Reference memory, anxiety and estrous cycling in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience* 95:293–307. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00418-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00418-2)
- Frick KM, Gresack JE (2003) Sex differences in the behavioral response to spatial and object novelty in adult C57BL/6 mice. *Behav Neurosci* 117:1283–1291. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.6.1283>
- Gilad GM, Gilad VH (1995) Strain, stress, neurodegeneration and longevity. *Mech Ageing Dev* 78:75–83. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(94\)01529-U](https://doi.org/10.1016/0047-6374(94)01529-U)
- Gioiosa L, Fissore E, Ghirardelli G et al (2007) Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm Behav* 52:307–316. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.05.006>
- Guayervas N, Sánchez AI, Gamallo A, Miquel J, De la Fuente M (2000) Mouse performance in an exploratory activity test as a longevity biomarker. In: Orellana JM (ed) *Animal Research Welfare. Laboratory Animals Ltd, London*, pp 159–162
- Ingram DK, Archer JR, Harrison DE, Reynolds MA (1982) Physiological and behavioral correlates of lifespan in aged C57BL/6J mice. *Exp Gerontol* 17:295–303. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(82\)90019-5](https://doi.org/10.1016/0531-5565(82)90019-5)
- Kalueff AV, Tuohimaa P (2005) Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *Eur J Pharmacol* 508:147–153. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.11.054>
- Kane A, Schultz MB, Mitchell S et al (2019) Machine learning analysis of mouse frailty for prediction of biological age and life expectancy. *Innov Aging* 3:S903–S903. <https://doi.org/10.1093/geroni/igz038.3299>
- Kassed CA, Herkenham M (2004) NF- κ B p50-deficient mice show reduced anxiety-like behaviors in tests of exploratory drive and anxiety. *Behav Brain Res* 154:577–584. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.03.026>
- Lever C, Burton S, O’Keefe J (2006) Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev Neurosci* 17:111–133. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2006.17.1-2.111>
- Magaji MG, Iniaghe LO, Abolarin M et al (2017) Neurobehavioural evaluation of resveratrol in murine models of anxiety and schizophrenia. *Metab Brain Dis* 32:437–442. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9927-6>
- Martínez de Toda I, Maté I, Vida C et al (2016) Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity. *Aging (Albany NY)* 8:3110–3119. <https://doi.org/10.18632/aging.101116>
- Martínez de Toda I, Vida C, Sanz San Miguel L, De la Fuente M (2019) When will my mouse die? Life span prediction based on immune function, redox and behavioural parameters in female mice at the adult age. *Mech Ageing Dev* 182:111125. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.111125>
- Masood A, Nadeem A, Mustafa SJ, O’Donnell JM (2008) Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 326:369–379. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.137208>
- Mate I, Madrid J, Fuente M (2014) Chronobiology of the neuroimmunoendocrine system and aging. *Curr Pharm Des* 20:4642–4655. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140130201131>
- Miller RA (2001) Biomarkers of aging: prediction of longevity by using age-sensitive T-cell subset determinations in a middle-aged, genetically heterogeneous mouse population. *J Gerontol Ser A* 56:B180–B186. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.4.B180>
- Phelan JP (1992) Genetic variability and rodent models of human aging. *Exp Gerontol* 27:147–159. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(92\)90039-3](https://doi.org/10.1016/0531-5565(92)90039-3)
- Ray MA, Johnston NA, Verhulst S et al (2010) Identification of markers for imminent death in mice used in longevity and aging research. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 49:282–288
- Razzoli M, Nyuyki-Dufe K, Gurney A et al (2018) Social stress shortens lifespan in mice. *Aging Cell*. <https://doi.org/10.1111/accel.12778>
- Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21:801–810. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00058-9)
- Rodgers RJ, Johnson NJT (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52:297–303. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00138-M](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00138-M)
- Sinclair DA (2005) Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev* 126:987–1002. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.03.019>
- Tanaka T (2015) Sex differences in exploratory behaviour of laboratory CD-1 mice (*Mus musculus*). *Scand J Lab Anim Sci* 41:1–6
- Viveros MP, Arranz L, Hernanz A et al (2007) A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *NeuroImmunoModulation* 14:157–162. <https://doi.org/10.1159/000110640>
- Viveros MP, Fernández B, Guayervas N, De la Fuente M (2001) Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J Neuroimmunol* 114:80–88
- Walf AA, Frye CA (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2:322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Warden SJ, Fuchs RK, Castillo AB et al (2007) Exercise when young provides lifelong benefits to bone structure and strength. *J Bone Miner Res* 22:251–259. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061107>

- Yokota S, Suzuki Y, Hamami K et al (2017) Sex differences in avoidance behavior after perceiving potential risk in mice. *Behav Brain Funct* 13:9. <https://doi.org/10.1186/s12993-017-0126-3>
- Zhan B, Ma HY, Wang JL, Liu CB (2015) Sex differences in morphine-induced behavioral sensitization and social

behaviors in ICR mice. *Dongwuxue Yanjiu* 36:103–108. <https://doi.org/10.13918/j.issn.2095-8137.2015.2.103>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Otras publicaciones relacionadas con la presente tesis:

González-Bermúdez B, González-Bermúdez B, Kobayashi H, et al. (2020) Single-cell biophysical study reveals deformability and internal ordering relationship in T cells. *Soft Matter* 16:5669–5678. <https://doi.org/10.1039/d0sm00648c>

