

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



**EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA
MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN
INMUNITARIA.
CAMBIOS CON LA EDAD**

TESIS DOCTORAL

M^a MÓNICA DE LA FUENTE DEL REY

2015




D. SALVADOR VINIEGRA BOVER, Dr. en Ciencias Químicas y Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Efecto de los antioxidantes en la modulación de la función inmunitaria. Cambios con la edad”** desarrollado por **Dña. M^a MÓNICA DE LA FUENTE DEL REY**, para optar al grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández de Elche, que ha sido realizado bajo mi dirección y supervisión, con la codirección y estrecha colaboración del profesor **Dr. D. JAIME MIQUEL CALATAYUD** ([†]20 de mayo de 2015), Dr. en Farmacia y Profesor jubilado de la Universidad Miguel Hernández de Elche, se encuentra en condiciones de ser defendido ante el tribunal correspondiente designado por la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Lo que firmo a los efectos oportunos en Alicante a 11 de junio de 2015.


Fdo.: Salvador Viniegra Bover



JOAQUÍN IBAÑEZ BALLESTEROS, Director del Departamento de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

INFORMA:

Que da su consentimiento a la lectura de la tesis doctoral presentada por Doña **M^a MÓNICA DE LA FUENTE DEL REY** titulada: "Efecto de los antioxidantes en la modulación de la función inmunitaria. Cambios con la edad", que se ha desarrollado dentro del programa de Doctorado de Medicina Experimental de este Departamento.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, lo firmo en Sant Joan d'Alacant a once de junio de dos mil quince.

Fdo. Joaquín Ibáñez Ballesteros
Director del Departamento de Fisiología

El presente trabajo ha sido posible gracias a las subvenciones concedidas por los siguientes proyectos :

“Acción de los antioxidantes sobre el envejecimiento celular en el sistema inmune. Papel de las mitocondrias”. Concedido por el FISs (Nº. 95/1623) para los años: 1995 y 1996. Investigador Principal: M. De la Fuente.

“Efecto de la ingestión de antioxidantes sobre la función inmune en el envejecimiento. Relación con la respuesta al estrés y la función mitocondrial” Concedido por el FISs (Nº. 97/2078) para los años: 1997-1999. Investigador Principal: M. De la Fuente.

“Protección neuroinmune por antioxidantes en el envejecimiento y el estrés oxidativo”. (Acción Coordinada 090): “Neuroprotección por antioxidantes en el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas”. Concedido por la Comunidad de Madrid (Nº 08.5/015/1997) para los años 1998-1999. Investigador Principal: M. De la Fuente. Coordinador: M. De la Fuente.

“Efecto de la suplementación con antioxidantes tíolicos en un modelo murino de inmunosenescencia prematura”. Concedido por DANONE/UCM (PR238/00-9448) para el año 2001. Investigador Principal: M. De la Fuente.

“Papel del estrés oxidativo en la inmunosenescencia. Protección por antioxidantes y repercusión en la longevidad“. Concedido por la Comunidad de Madrid (Nº 08.5/0061/2001 1) para los años 2002-2003. Investigador Principal: M. De la Fuente.

“Implicaciones del estrés oxidativo en la inmunosenescencia. Efecto protector de los antioxidantes”. Concedido por el MCYT (Nº BFI2001-1218) para los años 2002-2004. Investigador Principal: M. De la Fuente.

“Mecanismos de inmunosenescencia y su papel en la longevidad. Efecto de los antioxidantes”. Concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) (Nº BFU2005-06777) para los años 2005-2008. Investigador Principal: M. De la Fuente.

Grupo de Investigación de la UCM: Envejecimiento, Neuroinmunología y Nutrición (ENEROINN). Nº 910379. Validado muy positivamente por la ANEP en febrero del 2006 y en las sucesivas evaluaciones. Proyectos anuales desde 2006 a la actualidad (2015). Directora del Grupo de Investigación de la UCM: M. De la Fuente.

RED Temática de Envejecimiento y Fragilidad del Instituto de Salud Carlos III: RETICS 2006. RETICEF (RD06/0013/0003). Valorada favorablemente en las evaluaciones anuales y concesión desde 2007 hasta el 2011. Investigador Principal del Grupo: Mónica De la Fuente.

“Implicación de las células inmunitarias en el proceso de envejecimiento”. Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) (Nº BFU2008-04336) para los años 2009-2011. Investigador Principal: M. De la Fuente.

“Modelos de envejecimiento prematuro en ratones. Mecanismos inmunitarios implicados y estrategias para aumentar la longevidad”. Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (nº BFU2011-30336) para los años 2012-2014 (prorroga 2015). Investigador Principal: M. De la Fuente.

RED Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS 2012) de Fragilidad y Envejecimiento del Instituto de Salud Carlos III y FEDER (Unión Europea). RETICEF (RD12/0043/0018). Valorada favorablemente en las evaluaciones anuales y concesión desde 2012 hasta la actualidad (2015). Investigador Principal del Grupo: Mónica De la Fuente.

“Effects in vivo and in vitro of 4 biscuits rich in polyphenols on several immune and oxidative functions in mouse”. DANONE VITAPOLE (Francia). Nº 389/2003 y Nº 278/2004 (ampliación) para los años 2003 a 2005. Investigador Principal: M. De la Fuente.

**PÁGINA INICIAL DE LA MEMORIA DE ESTA TESIS
REALIZADA CUANDO SE IBA A PRESENTAR, EN 2010, Y QUE
POR CIRCUNSTANCIAS DIVERSAS SE HA RETRASADO 5
AÑOS**

**EN EL CENTENARIO DEL NACIMIENTO DEL POETA
MIGUEL HERNANDEZ (1910-1942)**

A mi padre *In Memoriam*



¡Y que corto se hace el pasado!
y la vida, ¡Qué corta se ha hecho!
si al pasar por la larga vereda
nos paramos siquiera un momento
y miramos atrás recordando
lo que andado por ella tenemos.
El pasado pasó sin sentirse,
el presente esfumose en el viento,
el futuro se acerca volando
y la vida es un soplo, un momento.

A las aladas almas de las rosas
del almendro de nata te requiero,
que tenemos que hablar de muchas
cosas,
compañero del alma, compañero.

Tres peldaños (10 versos escogidos
de los 142 del poema).
Teodosio de la Fuente, 1950

(Elegia a Ramón Sijé. Miguel Hernández)



INTERNATIONAL
YEAR OF LIGHT
2015

AÑO INTERNACIONAL
DE LA LUZ 2015

**TESIS DEFENDIDA EN EL
AÑO INTERNACIONAL DE LA LUZ**

Porque la vida es el fuego
Porque la vida es el agua
Y la vida se consume
Si es que no se sabe amarla

Porque la vida es el aire
Que mantiene nuestra llama
Y es el sol que da energía
Y es la **luz** que le acompaña.
Y es la noche en su descanso

Y es la ilusión del mañana
Y es el presente real
Que el pasado cimentara.

Federico García Lorca (1898-1936).
Poeta y dramaturgo español.

A Jaime Miquel (7/01/29-20/05/15)
In Memoriam
Con mi agradecimiento, admiración
y respeto al que fue maestro,
compañero
y amigo.



Quinto centenario del nacimiento de Teresa de Cepeda y Ahumada (Teresa de Jesús) (1515-1582). Doctora *Honoris Causa* por la Universidad de Salamanca. Proclamada Doctora de la Iglesia en 1970 por Pablo VI. Patrona de los escritores en lengua española. Patrona de la Real Academia de Doctores de España.

AGRADECIMIENTOS

Puede parecer mentira, pero este apartado de la tesis es uno de los más difíciles de escribir, al menos para mí. Esta tesis es peculiar, lo sé, y es el fruto, en principio, de un antiguo deseo desde que fui profesora en una Facultad de Medicina, de poder desarrollar un doctorado en el ámbito médico. Pero, en el dilatado tiempo transcurrido desde los inicios de los cursos correspondientes en el programa de Medicina Experimental de la Universidad de Alicante hasta el presente momento, este reto ha sido algo más. Por una parte, el cumplir un deseo compartido con mi padre, hace tiempo, de ver algún reflejo en mí de la labor que cómo médico pudo desarrollar mi abuelo, su padre, del que siempre se sintió tan orgulloso. Tras fallecer mi padre en el 2006, no tenía más remedio que hacer, aunque fuese ahora, lo que él hubiese querido ver realizado. Pero hay algo más, está el convencimiento de que este reto me ha permitido hacer más lento mi propio proceso de envejecimiento. Es posible que ya sea cronológicamente mayor para presentar una tesis, pero la motivación de hacerlo, en base a lo antes comentado, me ha servido para mantener una ilusión, algo tan necesario en la vida.

Como en todos los agradecimientos de una tesis primero quiero darlos a los directores de la misma. Es un placer, aunque hoy esté lleno de tristeza por la pérdida, poder dar las gracias al Dr. Jaime Miquel. Te debo mucho Jaime, no sólo en lo referente al entusiasmo y motivación que siempre me brindaste para que presentara esta tesis, especialmente porque has sido un gran compañero y sobre todo un excelente amigo. Gracias por haber compartido tantas charlas sobre el proceso de envejecimiento, por llegar a asumir que el sistema inmunitario puede tener algo que decir en ese proceso, y por esas estimulantes conversaciones sobre temas que aun no siendo científicos hemos disfrutado con ilusión, como nuestro común amor por la literatura. Sé que ya no estás con nosotros, pero siempre estarás en mí con mi recuerdo y cariño. A mi director, el Dr. Salvador Viniegra, quiero agradecerle su generosidad y su gran disposición para ayudarme en todo lo referente a la culminación y presentación de esta

tesis, siempre entendiendo esta “locura” mía. Sin sus consejos en estos últimos meses la finalización y defensa de la tesis me hubiera costado mucho más. Gracias a vosotros podré ver realizado uno de mis sueños.

Quiero recordar en este punto al ya Doctor Alfonso Solís, quien contribuyó de forma importante, en una ya lejana cena en Alicante a mi decisión de llevar a cabo esta tesis. Gracias por todos estos años de amistad, aunque haya sido a kilómetros de distancia. También a mi querida amiga Araceli Díez, compañera de fatigas en la realización de los cursos del programa de doctorado en la Universidad de Alicante y de los tramites necesarios para poder presentar la tesis, quiero agradecerle tanta ayuda y tanto cariño como siempre me ha brindado.

Toca ahora agradecer a todos los estudiantes, becarios y doctores que trabajando bajo mi dirección en el laboratorio de “Inmunología y Gerontología Experimental” del Departamento de Fisiología de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid han hecho posible que yo dispusiese de los datos que se recogen en esta tesis. Lógicamente, los resultados que se presentan no forman parte de ninguna Tesis Doctoral, Tesis de Licenciatura, DEA o TFM de los realizados en el laboratorio que dirijo. Es posible que esto haya supuesto que no sean precisamente los resultados científicamente más relevantes llevados a cabo en mi laboratorio, los que forman parte de mi tesis, no importa, están en las de aquellos a quienes les dirigí en su formación investigadora. Por tanto, estoy contenta de lo que he conseguido y quiero agradecerse a todos los que me han ayudado en ello. De forma especial a las Doctoras Mónica Del Rio y Dolores Ferrández, las primeras tesis doctorales que dirigí cuando me incorporé como catedrática a la Universidad Complutense de Madrid. Su ayuda en los primeros experimentos de esta tesis ha sido muy importante. También a las Doctoras Sonia Medina, Carmen Vallejo, Noelia Guayerbas, Isabel Baeza, Lorena Arranz y al Dr Victor Manuel Victor, todos ellos excelentes investigadores a los que tuve el orgullo de dirigir sus tesis. El ya Doctor Rafael Correa, la ya Doctora Marina Penélope Catalán y las licenciadas: Gema Ruedas, Manuela Carazo, Marina Gavin, Marta Miñano, Belén Blanco, Pedro Cobo, María Sol Burgos y Carmen

Sánchez. Todos me han ido ayudado a la realización de esta tesis a la vez que les iba enseñando lo que es ese maravilloso mundo de la investigación. Tiempo después llegaron al laboratorio otros becarios a los que dirigí sus tesis y que permitieron, con su trabajo, ir completando la visión del papel que el sistema inmunitario puede jugar en el envejecimiento. No quiero dejar de nombrar a la Dra. Patricia Alonso, la Dra. Marta Puerto, la Dra. Carmen Alvarado, el Dr. Pedro Álvarez, el Dr. Rashed Masnasra y la Dra. Ianire Maté. También, quisiera mencionar a las futuras doctoras como Nuria De Castro y Oskarina Hernández y a los que están en este momento haciendo sus tesis bajo mi dirección: Julia Cruces, Antonio Garrido, León Siboni, Caroline Husche, Mercedes García e Irene Martínez de Toda. Todos ellos, y otros como Carmen Vida, están haciendo posible que mantenga la ilusión por este apasionante trabajo que tengo y que, coincidiendo con lo que ya indicó Confucio: “Elije un trabajo que te guste y no tendrás que trabajar ni un solo día de tu vida“, me haga tener siempre la sensación de que a pesar de la cantidad de horas que le dedico, soy muy afortunada por estar todo ese tiempo disfrutando.

Le toca el turno a mi familia, y si ya mencioné a mi padre, el motor principal de que exista esta tesis, quiero expresar también a mi madre su comprensión con mi trabajo. Aún no entiendo nada de lo referente a mi profesión, asume perfectamente lo que representa para mi, lo que me demuestra que el cariño es comprensión. De forma especial quiero dar las gracias a mi hijo, por su paciencia durante tantos años, en los que mi dedicación al trabajo le ha robado parte del tiempo que podríamos haber estado juntos. Él ha sabido entender el valor de la intensidad y el amor en el tiempo compartido y sabe que siempre estoy y estaré a su lado. A Ángel, la persona con la que comparto mi vida, le quiero agradecer su presencia a mi lado. Aunque en principio siempre trató de convencerme de abandonar esta tarea, como lo ha intentado, con toda su buena intención, con otros retos personales y profesionales en los que me he embarcado, creo que poco a poco se va dando cuenta de lo mucho que yo necesito tener metas que alcanzar. Gracias, porque, a pesar de sus frecuentes protestas y mis reiteradas y enérgicas disertaciones sobre cómo entiendo la vida, el amor incondicional que me tiene ha sido y es un gran soporte vital para mi.

Podría seguir escribiendo agradecimientos pues en realidad nada se consigue si no hay otras personas que, de una manera u otra, te permiten hacerlo. Sé que hay muchos amigos y amigas que están en esa parte de mi cerebro que sustenta el cariño. No puedo nombraros a todos, pero ya sabéis que os quiero y os agradezco vuestra amistad, la cual es fundamental para mi.

Para terminar quisiera expresar mi agradecimiento a muchos componentes del Departamento de Fisiología de la UMH y del Rectorado de esta Universidad por facilitarme en todo momento los tramites de esta tesis y por la amabilidad con la que me han ido resolviendo todos los “problemillas” que han ido surgiendo. Gracias también a Ianire Maté y, especialmente, a Julia Cruces por la ayuda que me han brindado con los últimos “toques” del manuscrito.





1. INTRODUCCIÓN GENERAL

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”.

Isaac Newton (1642-1727). Físico y matemático inglés.

“Si me ofreciesen la sabiduría con la condición de guardarla para mí sin comunicarla a nadie, no la querría”.

Lucio Anneo Séneca (2AC-65DC). Filósofo latino.

A. ANTECEDENTES DEL TEMA EN EL QUE SE HA DESARROLLADO LA PRESENTE TESIS

Para poder hacer un mejor seguimiento de los trabajos que constituyen la presente tesis titulada “*Efecto de los antioxidantes en la modulación de la función inmunitaria. Cambios con la edad*”, y de la justificación de la unidad temática que constituyen los mismos, se va a recoger en la primera parte de esta “Introducción General” los antecedentes que hay en cada uno de los aspectos en los que se han desarrollado las investigaciones. Por ello, en primer lugar se indicarán conceptos generales sobre el funcionamiento del sistema inmunitario y la comunicación de este sistema con los otros sistemas reguladores (el nervioso y el endocrino), sobre los oxidantes y antioxidantes, el envejecimiento, la inmunosenescencia y finalmente sobre lo que se conoce sobre el papel de los antioxidantes en la función inmunitaria y sus variaciones al envejecer.

1.1. EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA COMUNICACIÓN NEUROINMUNOENDOCRINA. UNA BREVE PRESENTACIÓN

1.1.1. El sistema inmunitario

Desde que nacemos nos encontramos continuamente expuestos a padecer infecciones y procesos cancerosos, frente a los cuales sucumbiríamos si no fuera porque disponemos de ese complejo sistema que al reconocer nuestra particular identidad nos defiende de lo extraño, los antígenos, ya sean microorganismos invasores o células que se nos malignizan. Este sistema está constituido por una gran variedad de células (leucocitos) y moléculas capaces de reconocer y eliminar un número ilimitado de diferentes agentes extraños al organismo. El conjunto de mecanismos que se ponen en marcha para llevar a cabo esa función se conoce como “respuesta inmunitaria”. En esta respuesta se da una primera fase de reconocimiento del antígeno, para posteriormente llevarse a cabo una activación de las células y moléculas que van a permitir la eliminación del mismo. Esta activación, que supone la segunda fase de la respuesta inmunitaria, es un conjunto de procesos que se encuentran perfectamente regulados, ya que una activación descontrolada de los leucocitos podría suponer, y de hecho lo hace, la aparición de enfermedades o la muerte del individuo. La tercera y última fase, la efectora, supone la destrucción de lo extraño, lo cual implica la generación de un proceso de inflamación y oxidación que va a permitir la eliminación de los antígenos (Figura 1). Es

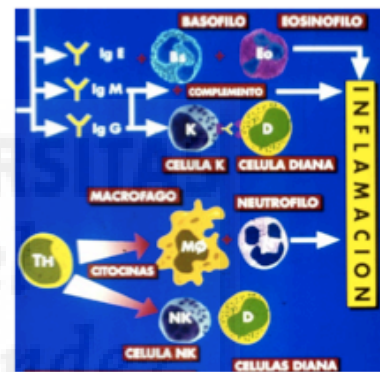
evidente que tan importante como generar una buena respuesta inmunitaria capaz de eliminar los agentes infecciosos y las células malignizadas, lo es el poder cortar esa respuesta una vez ha cumplido su misión.

FASES DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

1. RECONOCIMIENTO DE LO EXTRAÑO (ANTÍGENO)



2. ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN DE LA RESPUESTA



3. FASE EFECTORA: ELIMINACIÓN DE LO EXTRAÑO (GENERACIÓN DE INFLAMACIÓN Y OXIDACIÓN)

Fig.1. Fases de la respuesta inmunitaria.

El sistema inmunitario se divide funcionalmente en innato o inespecífico y adquirido o específico. La respuesta inespecífica se desarrolla y actúa de forma indiscriminada e inmediata frente a cualquier agente extraño que ha conseguido pasar las barreras naturales de nuestro cuerpo. Estas barreras de las superficies epiteliales externas e internas, como la piel o las mucosas (fundamentalmente las del tracto respiratorio y digestivo), constituyen auténticas barreras “físicas”, pero además “químicas”, al liberar moléculas con función defensiva. Tengamos en cuenta, también, la barrera “biológica” que representa la microbiota normal de esas localizaciones mencionadas. Además de defendernos de los patógenos externos, la respuesta innata actúa frente a toda célula del organismo que se ha transformado en cancerosa. Esta respuesta, que es rápida pues se desencadena en segundos y dura pocas horas, se lleva a cabo por una serie de células y factores solubles, estando entre las primeras los fagocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos, así como las células dendríticas) y las “Natural Killer” (NK) (o asesinas

naturales). Entre los segundos se debe mencionar a las proteínas del complemento, a la lisozima, a algunas citoquinas, mediadores de la inflamación y las proteínas de fase aguda. Todas esas células llevan a cabo una primera línea de defensa frente a lo extraño. Los fagocitos ingieren y destruyen los agentes infecciosos y las células NK se unen directamente a células tumorales y las programan para su destrucción por apoptosis. En la respuesta innata hay unos mecanismos de actuación más inmediata (pocos minutos) a los que les siguen otros de respuestas tempranas inducidas (con una duración de 4 a 96 horas). En estos últimos se da un reclutamiento de células efectoras, que reconocen lo extraño y se activan para llevar a cabo la eliminación de los antígenos, aunque no proporcionan una inmunidad de protección duradera.

La respuesta específica es responsabilidad de los linfocitos, considerados por tal motivo como “células principales” del sistema inmunitario. Tanto los linfocitos B como los T reconocen los antígenos. En el caso de los B estos antígenos se encuentran libres, mientras que en el de los linfocitos T, si los mismos son T CD4 o colaboradores (T “*helper*”, Th) el antígeno tiene que estar siendo presentado por una célula presentadora (CPA), que son las células dendríticas, los propios fagocitos antes comentados y los linfocitos B (que también pueden actuar como CPA). Si los linfocitos T son T CD8 o citotóxicos reconocen el antígeno mostrado por cualquier célula diana que ha sido infectada o transformada en cancerosa. Tras el reconocimiento del antígeno se producen factores que permiten neutralizarlo (es lo que hacen los anticuerpos específicos que generan los linfocitos B tras transformarse en células plasmáticas) o regular la respuesta inmunitaria, como lo hacen las diferentes citoquinas que liberan los linfocitos. La inmunidad adquirida o adaptativa, con una duración de días a semanas, tiene una serie de características que permiten su funcionamiento y le dan su peculiaridad. Además de un sistema de autorregulación perfectamente diseñado para evitar que la respuesta de activación que realiza frente a los antígenos se extienda en el tiempo y el espacio, posee una gran especificidad, diversidad, capacidad de discriminación y dispone de memoria. Los linfocitos pueden reconocer, gracias a sus receptores específicos, millones de moléculas antigénicas diferentes, distinguiendo incluso entre aquellas que tienen un enorme parecido estructural, y lo hacen con gran precisión, con especificidad. Al producirse los linfocitos (los B en la médula ósea y los T en el timo) se van dando toda una serie de combinaciones genéticas que permiten expresar en la membrana de los mismos, al madurar, millones de posibles receptores diferentes. Estos receptores (TCR en los linfocitos T y BCR, que son inmunoglobulinas de la clase M (IgM), en los B), distintos para cada uno de los millones de clones de linfocitos, reconocerán de forma muy

específica a los millones de diversos antígenos con los que se pueda contactar a lo largo de la vida. Además, con estos receptores se discrimina entre lo propio y lo extraño, decidiendo si se tolera, en el primer caso, o se destruye, en el segundo. Los linfocitos tienen memoria, gracias a la cual pueden recordar, cuando reconocen a un antígeno, si es la primera vez que entran en contacto con él, o si ya ha habido una interacción previa. Los linfocitos que nunca ha contactado con el antígeno se denominan “vírgenes” y cuando aparece un antígeno interaccionan con él aquellos linfocitos que tienen el receptor específico para el mismo, activándose. Este hecho se manifiesta mediante una proliferación para, de este modo, expandir ese clon linfoide. Unos cuantos de esos linfocitos activados pasan a ser células que llevan a cabo la respuesta destructora del antígeno, son los “efectores” mientras que otros pasan a ser linfocitos “memoria”, que no actúan en esa ocasión pero que ante la nueva aparición de ese antígeno específico responderán más rápidamente y con mayor fuerza frente al mismo. Esta capacidad de memoria es la base del funcionamiento de las vacunas. Por todo lo indicado el sistema inmunitario ha resultado ser fundamental en el mantenimiento de la homeostasis corporal, siendo un claro sistema regulador, en igualdad de condiciones con los sistemas reguladores clásicos como el sistema nervioso y el endocrino (De la Fuente, 2009a, 2010, 2011).

No es de extrañar ante lo indicado que en los años noventa del pasado siglo se estableciera al sistema inmunitario como un excelente marcador del estado de salud del individuo y consecuentemente de su longevidad (Waine et al., 1990).

1.1.2. La comunicación neuroinmunoendocrina

Los sistemas reguladores que controlan la homeostasis del organismo, el nervioso, el endocrino y el inmunitario, no trabaja aisladamente, sino que lo hace en íntima conexión. La comunicación bidireccional entre estos sistemas reguladores se confirmó científicamente en los años setenta con los trabajos de Besedovsky y sus colaboradores, al observar como los niveles de glucocorticoides se elevaban durante la respuesta inmunitaria produciendo un efecto supresor sobre la misma (Besedovsky et al., 1975, 1977). Posteriormente, éstos y otros investigadores confirmaron esa comunicación entre los sistemas homeostáticos (Besedovsky y Del Rey, 1996, 2007, 2011; De la Fuente, 1999; Ader, 2000; Blalock, 1984,1994,2005; Wrona, 2006). De este modo se estableció que el sistema inmunitario es el receptor de los estímulos que podemos llamar “no cognitivos”, esto es, de las infecciones, células malignizadas o extrañas, que aparecen en

el organismo. Este sistema responde a los mismos y comunica dicha información, a través de las citoquinas que produce, al sistema neuroendocrino con el que así se conecta. Por su parte, el sistema neuroendocrino es receptor de estímulos “cognitivos”, como luz, sonido, situación de estrés, etc., a los que responde, y sus mediadores (neurotransmisores y hormonas) llegan al sistema inmunitario informándole de la situación (Blalock, 1984). De este modo, poseemos un gran sistema neuroinmunoendocrino que permite el mantenimiento de la homeostasis corporal, y por tanto de la salud de los individuos. En este sistema de integración las células inmunitarias, por su capacidad de moverse y llegar a cualquier parte del organismo, constituyen nuestra “mente corporal”. La demostración científica de esa comunicación, ha permitido comprender, en base a los datos experimentales, toda una serie de hechos observados en la vida cotidiana. Es evidente que las situaciones de depresión, estrés emocional o ansiedad, provocadas por ejemplo por la pérdida de trabajo o de un ser querido, entre otras, se acompañan de una mayor propensión a padecer desde procesos infecciosos hasta cánceres o enfermedades autoinmunes. Esto supone que el sistema inmunitario se encuentra deteriorado y, consecuentemente, como posteriormente se comentará en mayor detalle, hay una peor salud y menor longevidad. Por el contrario, situaciones agradables o una “visión optimista” de la vida nos ayuda a superar enfermedades que tienen una base inmunitaria y, en general, a tener mejor salud (Barak, 2006; Arranz et al., 2007, 2009; Cruces et al., 2014a). Por otra parte, se ha confirmado que alteraciones en el sistema inmunitario, como puede suceder en un proceso infeccioso grave, modifican la funcionalidad del sistema nervioso, dándose la conducta de enfermedad o “*sickness behaviour*” (Dantzer, 2001), y pudiendo llegarse, en algunas situaciones extremas, a una esquizofrenia y otras patologías psiquiátricas (Gibney y Drexhage, 2013). Hoy se sabe que las células de los tres sistemas comparten receptores para los mediadores típicos de los otros y pueden sintetizar dichos mediadores. Se ha comprobado que los leucocitos producen neurotransmisores y hormonas y que las células nerviosas pueden producir citoquinas típicas de los leucocitos. Así, cualquier incidencia que podamos ejercer en el sistema inmunitario repercutirá en los sistemas nervioso y endocrino, y a la inversa. Es precisamente en el control de las respuestas a las múltiples situaciones de estrés emocional con las que nos enfrentamos en nuestra vida cotidiana donde parece tener mayor futuro las investigaciones y las terapias que se están llevando a cabo en este contexto. Una inadecuada respuesta al estrés va a repercutir en una mala salud inmunitaria y, en general, en la de los otros sistemas fisiológicos (Costa-Pinto y Palermo-Neto, 2010; Vida y De la Fuente, 2013).

1.2. COMPUESTOS OXIDANTES Y ANTIOXIDANTES. EL ESTRÉS OXIDATIVO

1.2.1. Compuestos oxidantes: los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

Un radical libre se puede definir como aquella especie química que posee uno o más electrones desapareados. Esta situación les confiere una alta capacidad de reacción, prácticamente con cualquier compuesto, lo que también condiciona su corta existencia. La denominación de ROS (del inglés: *reactive oxygen species*), acoge a un mayor número de moléculas que la de radicales libres de oxígeno, pues además de a éstos incluye a todas aquellas que durante su metabolismo pueden generar radicales libres, como sucede con el peróxido de hidrógeno (Figura 2).

El oxígeno, un gas necesario para la supervivencia de los organismos aerobios, puede ser potencialmente tóxico. Es lo que se conoce como “paradoja del oxígeno”. Aproximadamente el 2-3% del oxígeno utilizado se reduce (por adición de electrones) generándose el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), y posteriormente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una ROS que puede atravesar membranas y entrar en prácticamente todos los compartimentos celulares. Dicho peróxido puede, a su vez, escindir-se en el radical libre hidroxilo ($\cdot OH$), que parece ser el principal agente implicado en el daño a macromoléculas (Figura 2). Otras ROS que destacan son el oxígeno singlete (1O_2), el ácido hipocloroso ($HOCl$) y el ozono (O_3), los cuales contienen grupos reactivos pero no son radicales (Treinen y Smith, 1992; Vida et al., 2014).

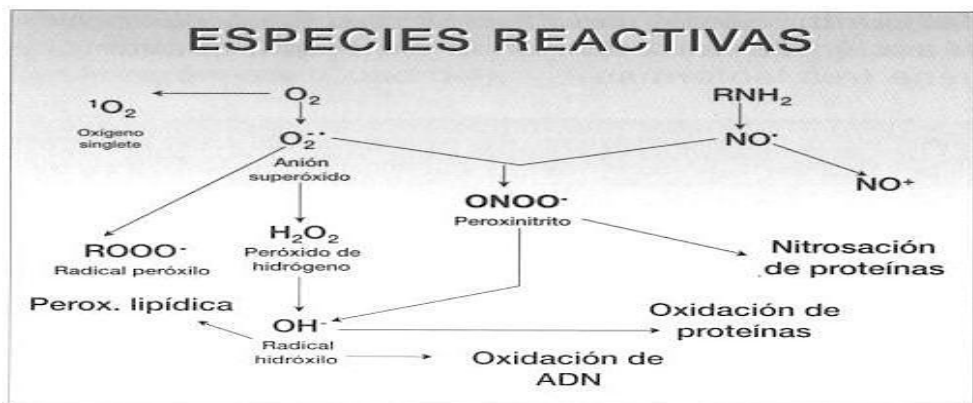


Fig. 2. Principales especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) con importancia biológica.

Además de las ROS existen las denominadas especies reactivas de nitrógeno (RNS, de las siglas en inglés, “*reactive nitrogen species*”). La generación catalítica de óxido nítrico (NO) por la enzima óxido nítrico sintetasa, va a ser clave en muchos procesos fisiológicos, pero también una fuente importante de oxidantes como el peroxinitrito (Figura 2).

1. 2.1.1. Fuentes endógenas y exógenas de ROS

Existen numerosos sitios de generación **endógena** de ROS, de los cuales, como más relevantes, se pueden citar: la cadena de transporte de electrones mitocondrial o cadena respiratoria (una de las fuentes más importantes de radicales libres en las células), los microsomas, los peroxisomas, el retículo endoplásmico, enzimas como la ciclooxigenasa o la xantina oxidasa, y las células inmunitarias, especialmente las fagocíticas (Phaniendra et al., 2015). Además, se puede mencionar la generación de ROS por reacciones de autooxidación, normalmente catalizadas por iones de metales de transición (Indo et al., 2014).

Como factores **exógenos** tenemos a la radiación ionizante, la luz ultravioleta, la contaminación, el ozono presente en el aire, el humo del tabaco, o los pesticidas, entre otros (Phaniendra et al., 2015).

1.2.1.2. Acciones oxidativas de las ROS

Todas las macromoléculas biológicas son susceptibles de ser blanco por parte de los radicales libres.

Daño oxidativo a los lípidos

Los procesos de peroxidación lipídica, los primeros que se observaron de los mecanismos de daño a macromoléculas, van a afectar a los lípidos de las membranas, y se desarrolla en tres etapas: 1) Iniciación, 2) Propagación y 3) Terminación. Así, esta peroxidación, que supone una reacción en cadena, puede extender el daño a muchas moléculas a lo largo de las membranas a partir de un foco inicial. La composición de ácidos grasos de esas membranas va a jugar un papel muy importante en los procesos de peroxidación lipídica, siendo los ácidos grasos poliinsaturados los más sensibles. Esto es especialmente importante en las mitocondrias y en las células inmunitarias, ya que presentan un elevado contenido en tales ácidos grasos y son la principal fuente de radicales libres (Meydani et al., 1995). Junto al daño directo a lípidos, la peroxidación

lipídica conlleva la formación de compuestos, producidos por fragmentación de ácidos grasos, como el malondialdehído (MDA), los cuales son capaces de reaccionar con otras macromoléculas, provocando un daño oxidativo secundario (Ayala et al., 2014).

Daño oxidativo a proteínas

La oxidación de proteínas, menos caracterizada que la de las otras macromoléculas, incluye la oxidación del esqueleto proteico y de los residuos de aminoácidos. Son frecuentes la oxidación de grupos sulfidrilo, la formación de grupos carbonilo, las reacciones con aldehídos, los entrecruzamientos proteína-proteína, la fragmentación peptídica y la conversión de aminoácidos en otros. El daño a las proteínas puede ser producido por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Cuando la proteína dañada es una enzima, generalmente provoca una pérdida de su actividad, convirtiéndola en una forma altamente susceptible a la degradación proteolítica por proteasas (Naudi et al., 2009; Trnkova et al., 2015).

Daño oxidativo al ADN

Debido a los continuos procesos de degradación y de nueva síntesis que tienen lugar en las proteínas y los lípidos, el efecto más deletéreo del ataque oxidativo se va a producir en el ADN, que presenta un sistema de reparación mucho más complejo que otras macromoléculas, con la consiguiente generación de mutaciones y alteraciones genómicas. Se considera daño al ADN aquellas modificaciones que alteran sus propiedades codificadoras ó su normal replicación y transcripción. Incluye procesos como deleciones, translocaciones, desmetilaciones, puentes cruzados entre cadenas de ADN ó entre ADN y proteínas, fragmentaciones, rotura simple ó doble de la cadena y modificación de las bases. Tanto las bases pirimidínicas como las púricas son susceptibles al ataque oxidativo, si bien las más sensibles son las primeras. La base más empleada como marcador de ataque oxidativo al ADN es la guanina. La oxidación de esta base en su carbono 8 da lugar a la formación de la base modificada 8-hidroxiguanina. Su nucleósido, la 8- hidroxí-2'-deoxiguanosina (8 oxodG), es el biomarcador más utilizado para cuantificar el daño oxidativo al ADN (Pisoschi y Pop, 2015). Además de las bases, los azúcares y las proteínas, histonas y no histonas, pueden resultar dañadas. Recientemente la desmetilación oxidativa del ADN ha recibido un creciente interés por su papel en la expresión génica a través de la desmetilación epigenéticas del ADN y el ARN y de las histonas (Zheng et al., 2014).

1.2.2. Defensas antioxidantes

La aparición del oxígeno en la Tierra supuso una presión evolutiva para los organismos que la habitaban entonces. A pesar de ser el oxígeno indispensable para el desarrollo de multitud de funciones, como la respiración mitocondrial para la obtención de ATP, dada su gran toxicidad al generar oxidación, los organismos o bien desaparecieron, o se vieron obligados a protegerse del mismo. Estos últimos optaron por refugiarse en ambientes donde no estuviera presente el oxígeno (organismos anaerobios) o, lo que hizo la gran mayoría de ellos, se adaptaron a vivir en esta nueva atmósfera que les proporcionaba mayor capacidad energética, pero desarrollando mecanismos endógenos de defensa que les permitieran protegerse de los efectos nocivos de este agente, así surgieron los antioxidantes.

Un **antioxidante** es la sustancia capaz de retrasar o de inhibir la oxidación de un sustrato oxidable cuando se encuentra presente en concentraciones bajas, en relación con las de éste último (Halliwell y Gutteridge, 1995). Así, los antioxidantes protegen a los sistemas biológicos frente a los efectos perniciosos de las reacciones que causan oxidaciones excesivas. Las defensas antioxidantes no son homogéneas, varían según el tejido, atendiendo al tipo de célula que lo constituye, estado fisiológico o requerimientos especiales. Estas defensas antioxidantes de origen endógeno pueden ser enzimáticas y no enzimáticas. No obstante, dada la abundante presencia de compuestos antioxidantes en vegetales y animales, muchos pueden ser incorporados al organismo mediante la dieta.

La forma de clasificar los antioxidantes es muy variada, puede ser por: endógenos (enzimáticos y no enzimáticos) y exógenos, liposolubles e hidrosolubles, etc. Seguidamente se hará mención a los más estudiados y especialmente a los que son objeto de la presente tesis.

1.2.3.1. Antioxidantes endógenos

Entre los antioxidantes endógenos enzimáticos, se pueden destacar (algunas aparecen en la Figura 3):

La **superóxido dismutasa (SOD)**, descubierta por McCord y Fridovich en 1969 en eritrocitos, es una de las primeras enzimas implicadas en la defensa antioxidante eliminando eficientemente el anión superóxido, transformándolo en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Existen varias formas moleculares de esta enzima, una de

las cuales es la Cu-ZnSOD, que contiene cobre y zinc en el centro activo, es dimérica y se localiza en citosol. Otra forma molecular es la Mn-SOD, que posee en su centro activo manganeso, es tetramérica y se localiza en las mitocondrias (Nordberg y Arnér, 2001).

La **catalasa (CAT)** está presente en casi todas las células aeróbicas siendo especialmente abundante en los eritrocitos y las células hepáticas. Principalmente se encuentra en peroxisomas, pero también, en menor abundancia en mitocondrias (Bai y Cederbaum, 2001). Su función principal es disminuir o anular la formación del radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno, cuya dismutación cataliza, impidiendo así su utilización en la reacción de Fenton (Halliwell, 1999; Vida et al., 2014).

La **glutación peroxidasa (GPx)** es una enzima que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y de los lipoperóxidos, utilizando glutación como sustrato reductor. En células de mamíferos se han descrito al menos 4 isoformas, las cuales contienen selenocisteína en su molécula. La amplia distribución y sus propiedades cinéticas avalan una contribución importante de esta enzima frente al daño oxidativo (Nordberg y Arnér, 2001; Deponete, 2013).

La **glutación reductasa (GR)** es la enzima que cataliza la reducción del glutación oxidado (GSSG) a expensas de NADPH, con lo que se consigue reciclar el glutación reducido (GSH). Este enzima, por tanto, mantiene elevada la relación GSH/GSSG en las células normales, impidiendo que se alcancen unos niveles de GSSG que podrían resultar muy tóxicos para las mismas (Deponete, 2013).

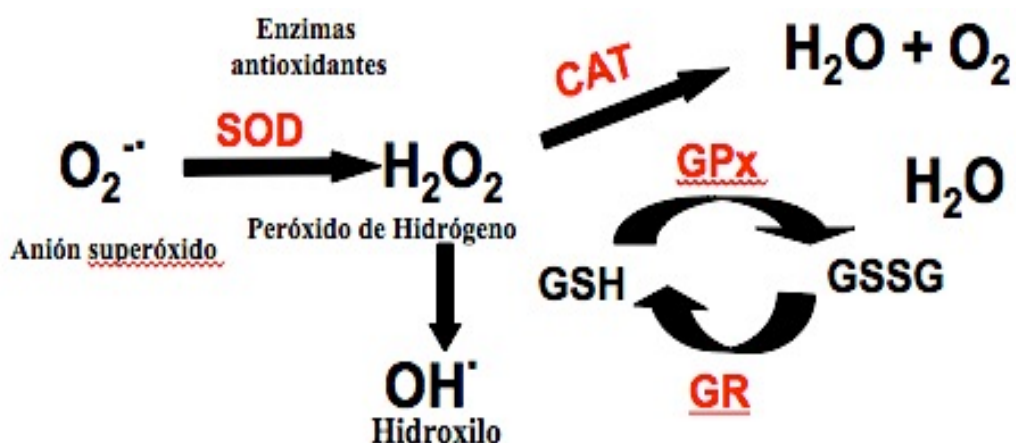


Fig. 3. Algunas defensas antioxidantes enzimáticas (SOD, CAT, GPx, GR) y no enzimáticas (glutación reducido: GSH). SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; GPX: glutación peroxidasa; GR: glutación reductasa.

Las **tioredoxinas (Trx)** son enzimas antioxidantes ubicuas que cataliza la reducción de uniones disulfuro, por lo que están implicadas en muchos procesos celulares dirigidos al mantenimiento de la salud. Incluyen una serie de isoenzimas que contienen selenocisteína en su centro activo, localizadas en diversos compartimientos celulares, pero también son extracelulares, y participan en una amplia gama de funciones redox en el organismo (Collet y Messens, 2010; Lu y Holmgren, 2014).

Entre los antioxidantes endógenos no enzimáticos se debe destacar:

El **glutatión (GSH)**, el principal tiol celular, fue descubierto por J. de Rey-Pailhade hace más de 100 años y su estructura (L-g-glutamyl-L-cisteinilglicina) (Figura 4) se dedujo en los años 30 del pasado siglo. El GSH se sintetiza a partir del L-glutamato, L-cisteína y glicina mediante la g-glutamyl-cisteína sintetasa y la GSH sintetasa en dos etapas consecutivas. El GSH está presente en el citoplasma, en donde se tienen los niveles más elevados de este antioxidante, pero también en el retículo endoplásmico, la mitocondria y en el núcleo, lo que le permite proteger a todas las macromoléculas, incluido el ADN, frente al daño oxidativo. Cuando las células se ven sometidas a una situación de estrés primero se consumen las reservas citosólicas y es la mitocondria la que conserva las últimas reservas de GSH. Esto prueba la relevancia de los niveles de GSH para un adecuado mantenimiento de la estructura y función mitocondrial.

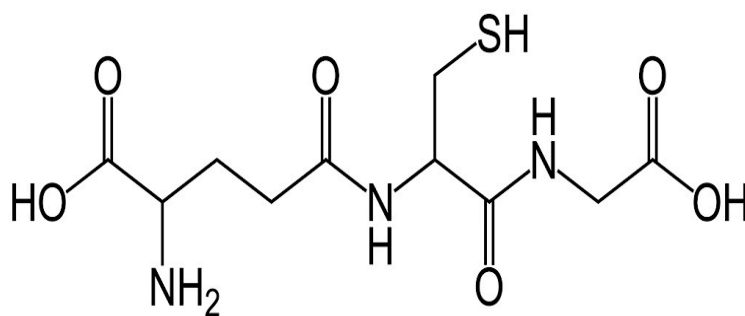


Fig. 4. Estructura del glutatión

La capacidad antioxidante del glutatión se debe a la actividad reductora del grupo tiólico de su cisteína que protege de la oxidación a los grupos -SH- de las proteínas. La reacción del GSH con el oxígeno da lugar a la forma oxidada (GSSG), la cual contiene un puente disulfuro. La continua generación de GSH, a partir de GSSG, con intervención de la glutatión reductasa (GR) y disponibilidad de equivalentes reductores, en forma de

NADPH, es esencial para preservar la integridad celular. El glutatión también puede ser reducido por la tiorredoxina. Antioxidantes, como el ácido lipoico y otros, contribuyen al aumento de la concentración celular de GSH, por su capacidad para reducir la cistina a cisteína, cuya disponibilidad es un factor limitante en la biosíntesis de glutatión.

El GSH tiene muchas funciones, es cofactor de un gran número de enzimas, participa en síntesis y conformación de proteínas, síntesis de ARN y ADN, en vías metabólicas, mantiene la integridad estructural y funcional de las membranas y es un excelente protector frente a ROS y RNS. Por tanto, unos niveles de GSH adecuados son esenciales para muchos procesos celulares desde la liberación de neurotransmisores a la detoxificación de carcinógenos, así como para la supervivencia celular, por lo que su disminución o el desequilibrio en la relación GSSG/GSH se relaciona con el envejecimiento y toda una serie de enfermedades (Viña, 1990; García de la Asunción et al., 1996; Kalinina et al., 2014).

La **tioprolina** (TP) o ácido tiazolidín-4-carboxílico es un aminoácido sulfúrico cíclico con estructura similar a la prolina (Ratner y Clarke, 1937) (Figura 5). Es un metabolito natural de origen hepático (Carvallini et al., 1956) que actúa como antioxidante secuestrando radicales libres (Bollier y Martin, 1972; Weber et al., 1982). La TP se encuentra presente en las mitocondrias y puede ser un importante donante de L-cisteína en la célula (Wlodek et al., 1995). De hecho, la administración oral de TP aumenta los niveles plasmáticos e intracelulares de cisteína, así como los niveles de GSH, tanto en individuos sanos (Porta et al., 1991), como en pacientes con VIH (Lederman et al., 1995). También lo hace en ratas alimentadas con una dieta deficiente en compuestos tiólicos (Jain et al., 1995) y en ratones con una deficiencia en la enzima clave en el metabolismo del glutatión, la gamma-glutamyl transpeptidasa (Held y Harding, 2003). La TP ha sido ampliamente estudiada como posible tratamiento frente al cáncer, al restaurar la inhibición por contacto en el crecimiento de las células cancerosas (Gosálvez et al., 1979; Tsuda, 1995; Satarug et al., 1996), controlando procesos carcinogénicos (Sasaki et al., 2007). Además, este antioxidante inhibe el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos, no tiene efectos embriotóxicos o teratógenos y puede ser utilizado en altas dosis sin producir toxicidad, lo que le hizo idóneo como agente terapéutico en el tratamiento de varias enfermedades hepáticas y en desordenes gastrointestinales, en los que el aumento de ROS y una deficiencia tiólica fueran importantes factores patogénicos (Weber et al., 1982).

La TP estimula la producción de ATP, lo que está en la base del papel estimulador de los procesos metabólicos que este antioxidante tiene en los organismos viejos, explicando su capacidad de aumentar la esperanza de vida de animales de experimentación (Oeriu y Vochitu, 1965; Miquel y Ecónomos, 1979) y de *Drosophila melanogaster* (Le Bourg, 2001). La administración de TP estimula también la biosíntesis de estrógenos en la glándula adrenal de ratas ovariectomizadas y la glicolisis y glucogénesis hepática en ratas viejas (Bartoc et al., 1975), habiendo sido propuesta su ingestión en la menopausia (Miquel et al., 2006). La ingestión de tioprolina aumenta la función neurológica y tiene capacidad anoréxica en ratones, lo que explicaría la supervivencia de los mismos tras su ingestión (Navarro et al., 2007).

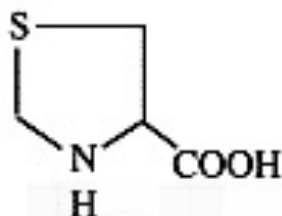


Fig. 5. Estructura de la tioprolina

La **taurina** (TAU) (ácido 2-aminoetanosulfónico) (Figura 6) es un aminoácido que se encuentra en estado libre en la mayoría de las células de mamíferos al no incorporarse a las proteínas, siendo especialmente llamativas las altas concentraciones que alcanza en el sistema nervioso central, en el cual es el aminoácido libre más abundante durante el desarrollo y el segundo, tras el glutamato, en la edad adulta (Huxtable, 1992). Proviene de dos fuentes, la síntesis en el propio animal y la dieta. Cada vía tiene un aporte diferente dependiendo del grupo animal que se considere y el tipo de dieta. En general, los herbívoros pueden sintetizar toda la taurina que necesitan (la TAU es inexistente en el reino vegetal) (Huxtable, 1992), mientras que los carnívoros necesitan obtenerla por la dieta (Lleu et al., 1994). Los omnívoros sintetizan una proporción de TAU variable y requieren el aporte alimenticio (Sturman, 1990). Así, la biosíntesis de TAU es muy elevada en roedores, intermedia en primates e inexistente en felinos para los que este aminoácido es esencial. En los seres humanos se necesita un aporte nutricional de TAU ya que su biosíntesis es insuficiente para mantener las concentraciones plasmáticas (Sturman, 1993; Chesney et al., 1998). La síntesis de TAU se lleva a cabo a partir de cisteína (Stipanuk y Ueki, 2011). Es un aminoácido relativamente inerte desde el punto de vista metabólico (Huxtable, 1992; Sturman y Chesney, 1995). Se presenta como una molécula de baja liposolubilidad y, por tanto, con dificultad para atravesar las membranas

biológicas (Huxtable, 1992). El papel fisiológico de la TAU quedó evidente al comprobarse que en los gatos, en los que es un aminoácido esencial, cuando eran alimentados con dietas deficitarias en taurina sufrían degeneración de la retina (Sturman et al., 1994) y cardiopatías (Pion et al., 1998). La TAU puede actuar como neurotransmisor (Mori et al., 2002), en la osmorregulación (Deleuze et al., 2005), en la captación de calcio (El Idrissi, 2008) y como antioxidante (Pasantés-Morales y Cruz, 1984; Huxtable, 1992). En este contexto, sus beneficiosos efectos controlando la obesidad (Murakami, 2015), la diabetes (Sirdah, 2015), la aterogénesis (Uitz et al., 2014) o en la función del músculo esquelético (Spriet y Whitfield, 2015), están siendo revisados actualmente. La homeostasis de la TAU en organelas y células permite entender sus múltiples papeles en diferentes procesos fisiológicos (Lambert et al., 2015).

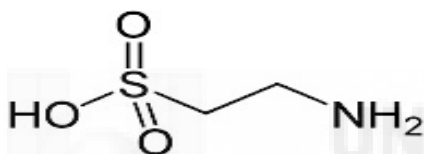


Fig. 6. Estructura de la taurina

1.2.3.2. Antioxidantes exógenos

Entre los numerosos antioxidantes exógenos, los biológicamente más conocidos son: la vitamina C, la vitamina E, el ácido lipoico, las ubiquinonas, los carotenoides, los polifenoles y los que contienen sulfuro y son aportadores de glutatión. Seguidamente se hará mención de algunos de ellos y más específicamente de los que han sido estudiados en la presente tesis.

Vitamina C

La **vitamina C** o **ácido ascórbico (AA)** (Figura 7) es un antioxidante hidrosoluble de bajo peso molecular que se presenta en forma de ascorbato en todos los compartimentos acuosos (citósol, plasma, líquido extracelular), considerándose como el antioxidante más importante y menos tóxico (Weber et al., 1996; Bendich, 1997). Se ha comprobado que su administración puede aumentar la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR) y disminuir el daño oxidativo,

aunque estos efectos no se dan a dosis muy altas (Barja et al., 1994; Polidori et al., 2004). Así, también se ha observado que puede ser, a altas concentraciones y en determinadas circunstancias, pro-oxidante y como tal estimula la peroxidación de biomoléculas, efectos observados *in vitro*, a concentraciones no fisiológicas y en presencia de metales como el hierro (Chakraborty et al., 2014).

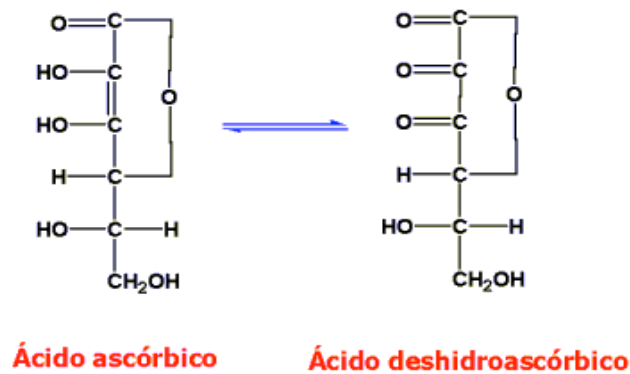


Fig. 7. Estructura química del ácido ascórbico y dehidroascórbico.

La vitamina C se encuentra especialmente en la fruta fresca, en particular en los cítricos, y en los vegetales (Bendich, 1997), es transportada de forma general dentro de las células en su forma oxidada, como ácido dehidroascórbico (DHA), a través de transportadores de glucosa, presentes en todas las células, y como ácido ascórbico en células especializadas mediante transportadores de ácido ascórbico dependientes de sodio (Vera et al., 1993; Liang et al., 2001). Cuando el DHA utiliza los transportadores de glucosa es rápidamente reducido por la dehidroascorbato reductasa y atrapado en el interior de las células, donde se acumula en forma de ácido ascórbico (Vera et al., 1993).

El ácido ascórbico (AA) es un micronutriente esencial para los seres humanos, los primates, las cobayas y otros animales, ya que han perdido la capacidad de sintetizar este compuesto como resultado de la mutación del gen que codifica la L-gulono- γ -lactona oxidasa, una enzima necesaria para la síntesis de esta vitamina a través de la ruta del ácido glucurónico (Woodall y Ames, 1997). Por tanto, la vitamina C, en esos animales, debe ser obtenida a través de la dieta. Sin embargo, la mayoría de los animales son capaces de sintetizar AA a partir de la glucosa en el hígado. En las especies en las que es una vitamina resulta crítico el funcionamiento de los sistemas antioxidantes que permiten su regeneración. Así, en células humanas, el principal sistema para reciclar el ascorbato

es el glutatión, pero existen mecanismos alternativos que funcionan en situaciones de estrés oxidativo, en las que se produce la depleción del tripéptido, como el sistema de las tiorredoxinas. De hecho, la concentración de ascorbato y glutatión se correlacionan de forma directa por ejemplo en los linfocitos humanos (Lenton et al., 2000), así al suplementar con vitamina C no solo se aumenta la concentración de ascorbato en estas células, también lo hace la del glutatión (Lenton et al., 2003).

Actualmente, se sabe que la vitamina C es el antioxidante hidrosoluble más importante en el plasma de los humanos y en las células de los mamíferos, con mecanismos de reciclaje y acumulación contra gradiente, lo cual sugiere que debe desempeñar importantes funciones intracelulares (Duarte y Lunec, 2005). De hecho, numerosos estudios epidemiológicos sugieren que la vitamina C disminuye la incidencia y mortalidad de dos de las enfermedades que más prevalecen en el ser humano como son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, lo que parece deberse principalmente a su actividad antioxidante, aunque no se descarta la participación de otros mecanismos (Carr y Frei, 1999; Fritz et al., 2014; Berger y Oudermans-van Straaten, 2015). Además, en el cerebro, la concentración de vitamina C es 10 veces superior a la presente en la sangre (Agus et al., 1997), lo cual sugiere que tiene que desempeñar funciones importantes en este órgano, ya que se tiene que producir un transporte contra gradiente que permita que se acumule en esas elevadas cantidades. Así, se sabe que mejora la función cognitiva y la memoria en ratones (Arzi et al., 2004). El ácido ascórbico no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica pero su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (DHA), sí puede entrar en el cerebro a través del transportador de glucosa GLUT-1 (que se expresa en las células endoteliales de dicha barrera) y allí queda retenido en forma de ácido ascórbico (Agus et al., 1997). Este mecanismo es similar al que utiliza el ácido ascórbico para entrar y acumularse en la mitocondria, protegiéndola de este modo frente al daño oxidativo (Sagun et al., 2005). Se ha comprobado que la suplementación de la dieta con vitamina C (durante 5 semanas), en cobayas, aumenta la actividad de determinados enzimas antioxidantes como la GPx y la GR, y disminuye el daño oxidativo tanto de proteínas como de lípidos en el hígado (Cadenas et al., 1994; Barja et al., 1994). Es importante destacar, que tras la ingestión de dosis muy bajas ó muy altas, se observaron efectos adversos tales como una disminución del peso corporal de los animales, una disminución de la actividad GR, así como una disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos de los lípidos de las membranas (Barja et al., 1994). La vitamina C tiene un papel relevante en el sistema inmunitario y en enfermedades inflamatorias crónicas (Sorice et al., 2014), evitando el daño oxidativo. Los efectos beneficiosos de la ingesta de

vitamina C a corto plazo tiene lugar también en sujetos con una concentración de ascorbato basal relativamente elevada, luego no es necesario presentar un estado de deficiencia para observar los efectos positivos derivados de la ingesta de esta vitamina (Polidori et al., 2004). A pesar de toda la bibliografía científica existente sobre la vitamina C, su papel en la salud y enfermedad es todavía un tema de debate (Berger y Oudermans-van Straaten, 2015).

Vitamina E

La **vitamina E** es el principal antioxidante de las membranas lipídicas, protegiendo a estas del daño peroxidativo. El término genérico vitamina E engloba una serie de moléculas naturales que poseen actividad antioxidante vitamina E, y que incluyen 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles (α , β , γ , δ , respectivamente) (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature) (Meydani et al., 2005) (Figura 8). Estas moléculas son sintetizadas exclusivamente por organismos fotosintéticos, incluyendo plantas superiores, y se encuentran en todos los tejidos verdes, aunque también hay cierta cantidad de vitamina E en las semillas. Se piensa que están involucradas en las respuestas frente al estrés oxidativo en los cloroplastos de las plantas (Zingg y Azzi, 2004). El alfa-tocoferol es la forma más abundante en la naturaleza y es además la forma que posee una mayor actividad biológica (Brigelius-Flohe y Traber, 1999). Además, el alfa-tocoferol es captado, transportado y retenido en el organismo de forma mucho más eficiente que otros derivados naturales ó sintéticos, y aunque el proceso de degradación es común para todas las formas, es el alfa-tocoferol el que se degrada en una proporción menor, lo cual podría explicar, al menos en parte, las diferencias observadas en relación con la actividad biológica de otros esteroisómeros (Brigelius-Flohe, 2005). La actividad de este compuesto se debe al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol (Maes et al., 1996), que al actuar como antioxidante se consume y se transforma en radical tocoferilo. Se ha propuesto que el ascorbato y el GSH, dos antioxidantes que actúan de manera cooperativa, serían los reductores fisiológicos del radical tocoferilo (Burton et al., 1983). Conviene resaltar, en este punto, que la importancia de un antioxidante no depende únicamente de su concentración y actividad sino también de su capacidad para interaccionar con los sistemas que lo regeneren (Brohée y Neve, 1995).

La vitamina E fue descrita por primera vez en 1922 por Evans y Bishop como un nutriente esencial para la reproducción de las ratas (Evans y Bishop, 1922). Fue redescubierta en los años 50 por Klaus Schwarz y situada en el contexto de los sistemas

celulares antioxidantes, junto con los aminoácidos que contienen grupos sulfuro y el selenio (Schwarz, 1965). En un principio el interés por esta vitamina se centró en su función antioxidante, como mecanismo de protección frente a la oxidación de los lípidos, evitando la propagación de la peroxidación lipídica que conlleva el deterioro funcional de las células (Tappel, 1962; Burton et al., 1983; Niki, 1987; Ingold et al., 1993; Packer, 1994). Su capacidad para detener el proceso de peroxidación lipídica es resultado de la reacción más rápida por parte de los tocoferoles y tocotrienoles con los radicales peroxilo, que la reacción de estos radicales con los ácidos grasos y las proteínas de membrana (Zingg y Azzi, 2004; Janisch et al., 2005). Así, la suplementación con vitamina E en situaciones de severo estrés oxidativo, previene la disfunción mitocondrial y disminuye el daño oxidativo (Ham y Liebler, 1997). Sin embargo, en los últimos 20 años se le han atribuido otras funciones alternativas, independientes de su función antioxidante. Estas incluyen la regulación de procesos de señalización celular, de determinadas actividades enzimáticas, así como de la expresión génica (Azzi, 2004; Zingg y Azzi, 2004; Brigelius-Flohe, 2005). Por ello, la vitamina E tiene gran importancia para el mantenimiento y desarrollo de muchas funciones fisiológicas, por lo que su deficiencia supone un deterioro del organismo en muchos aspectos y es un riesgo para padecer muchas enfermedades (Comstock et al., 1997; Traber, 1999, 2014).

Hay que tener en cuenta el hecho de que la concentración de vitamina E, tras una suplementación de la misma, puede variar en función de los tejidos y las regiones de la célula que se consideren, siendo el hígado, y especialmente sus mitocondrias, donde se encuentran las concentraciones más elevadas de esta vitamina tras su ingestión (Sumien et al., 2003). Es interesante destacar que la función de esta vitamina es específica para determinados tipos celulares, pudiendo llevar a cabo funciones opuestas sobre diferentes células. De este modo, la vitamina E inhibe la producción de PGE₂ en macrófagos pero es capaz de estimular la producción de esta molécula en células endoteliales (Wu et al., 2005).

La vitamina E es absorbida, con los lípidos de la dieta y la bilis, en el duodeno, no habiendo selectividad respecto al tipo de tocoferol al ser todos absorbidos por igual (Zingg y Azzi, 2004).

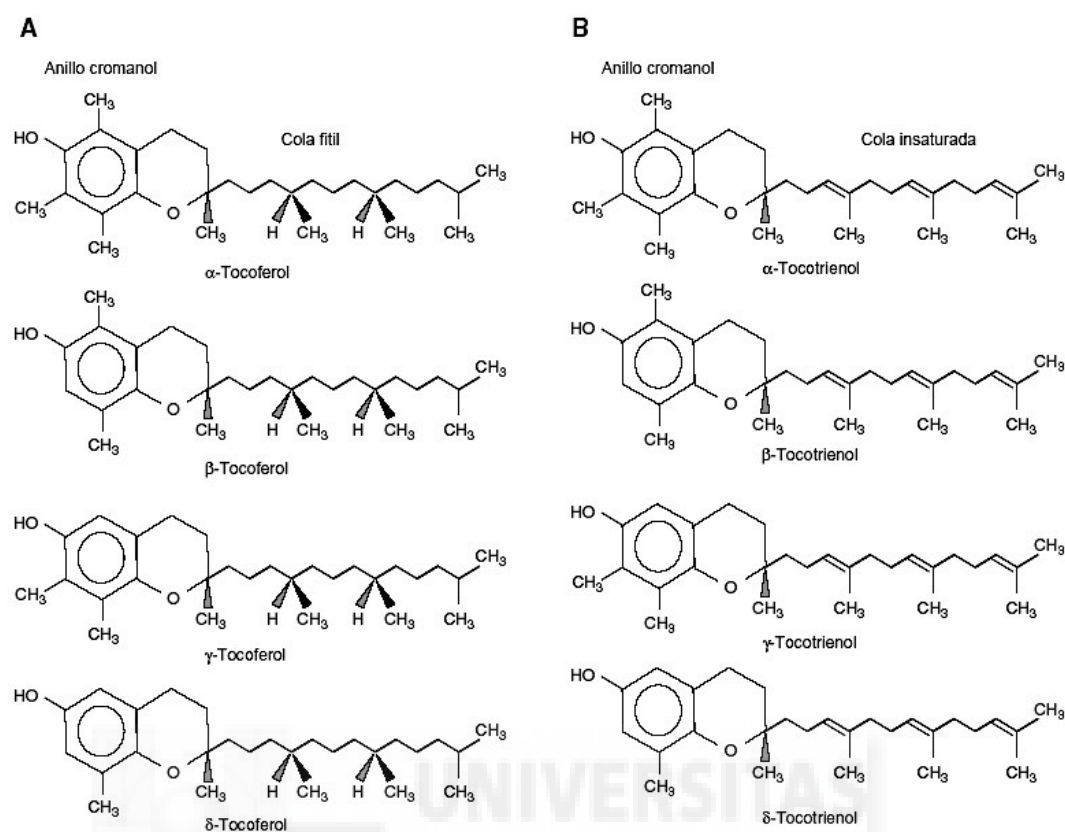


Fig. 8. Estructura química de los isómeros de la vitamina E

La vitamina E una vez absorbida es incorporada en los quilomicrones y tras entrar en la circulación, es específicamente reconocida y retenida en el hígado por la proteína citosólica α -TTP (α -tocopherol transfer protein), la cual determina los niveles plasmáticos de esta vitamina al controlar su incorporación a las VLDL. Así, la afinidad entre la proteína α -TTP y el α -tocoferol parece ser determinante en su actividad biológica (Mardones y Rigotti, 2004; Zingg y Azzi, 2004). La captación de la vitamina E por los diferentes tipos celulares tiene lugar a través del receptor de superficie clase B de tipo I (SR-BI), al menos en ratones, aunque se desconoce su presencia en los humanos (Mardones y Rigotti, 2004). Por último, todas las formas homólogas de la vitamina E son degradadas mediante el mismo mecanismo, que comienza con una ω -hidroxilación, catalizada por enzimas citocromo P450, seguida de una β -oxidación. Los productos finales son conjugados y eliminados por la orina (Brigelius-Flohe, 2005).

El papel de la vitamina E en la salud y la enfermedad sigue siendo objeto de debate. No obstante, los datos recientes indican que en un rango de 23-800 UI/día su

ingestión no afecta la mortalidad (Curtis et al., 2014) y puede tener efectos positivos en muchos aspectos fisiológicos, tanto en estado de salud como en algunas enfermedades (Rizvi et al., 2014).

Los polifenoles

Los **polifenoles** son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal que están formados por uno o más anillos fenólicos. Actualmente se conocen en torno a unos 8000 polifenoles, clasificados en 16 clases, de las cuales los más conocidos son los **estilbenos**, **ácidos fenólicos** y **flavonoides**, y siendo los dos últimos grupos en los que se encuentran un mayor número de compuestos polifenólicos, especialmente en los flavonoides. Tanto es así, que en algunas clasificaciones se habla de sólo dos grandes grupos de polifenoles, los flavonoides y los no-flavonoides. Existe una extensa literatura acerca de las diferentes y numerosas propiedades de los polifenoles, como agentes antioxidantes, antialérgicos, anti-inflamatorios, antivirales y anticarcinogénicos (Havsteen, 2002). Los mecanismos de acción de los polifenoles van más allá de la modulación de las rutas relacionadas con el estrés oxidativo. Un hecho importante a considerar es que dependiendo de su polaridad, absorción, metabolismo y formas circulantes, los polifenoles pueden actuar como antioxidantes en la fase acuosa o en el medio lipofílico (Eastwood, 1999), al tener un coeficiente de partición intermedio. Este coeficiente es una medida útil para determinar la función biológica de un compuesto, mostrando los antioxidantes liposolubles altos coeficientes de partición y los hidrosolubles bajos. Entre la enorme variedad de compuestos polifenólicos, muy presentes en la dieta humana al encontrarse en frutas, verduras y bebidas (vino, té, café, chocolate,..), se van a comentar brevemente los grupos mencionados haciendo mayor hincapié en los ácido fenólicos y los flavonoides, todos ellos con una clara capacidad barredora de radicales libres.

Dentro de los **estilbenos**, el compuesto más conocido y el que está recibiendo mayor atención es el **resveratrol**, presente en el vino tinto, en la uva y en los cacahuetes. Se sabe que posee propiedades antioxidantes, pero también antitumorales y estrogénicas, presentando efectos beneficiosos en la obesidad, diabetes, alteraciones neurológicas, y se ha comprobado aumenta la longevidad saludable (Gambini, 2007; Kovacic y Somanathan, 2010; Park y Pezzuto, 2015; Bhullar y Hubbard, 2015).

Los **ácidos fenólicos** son polifenoles que pueden ser clasificados en derivados del **ácido benzoico** y derivados del **ácido cinámico**, siendo los segundos los más comunes.

Todos ellos presentan una fuerte capacidad antioxidante y son considerados de gran importancia nutricional. Algunos de estos ácidos fenólicos, especialmente los encontrados en los cereales, serán descritos brevemente a continuación.

El **ácido ferúlico** es un derivado del ácido cinámico (Figura 9A), cuyo potencial antioxidante deriva de su capacidad para detener de forma eficaz las reacciones en cadena de los radicales libres, lo que se ha observado en macrófagos y neuronas en cultivos (Ogiwara et al., 2002). El ácido ferúlico de la dieta presenta una buena farmacocinética en los seres humanos, sin embargo, en ratas, aunque es absorbido tras la administración oral, su biodisponibilidad está muy disminuida, probablemente debido al acceso limitado de las enzimas del tracto digestivo al sustrato fenólico (Adam et al., 2002).

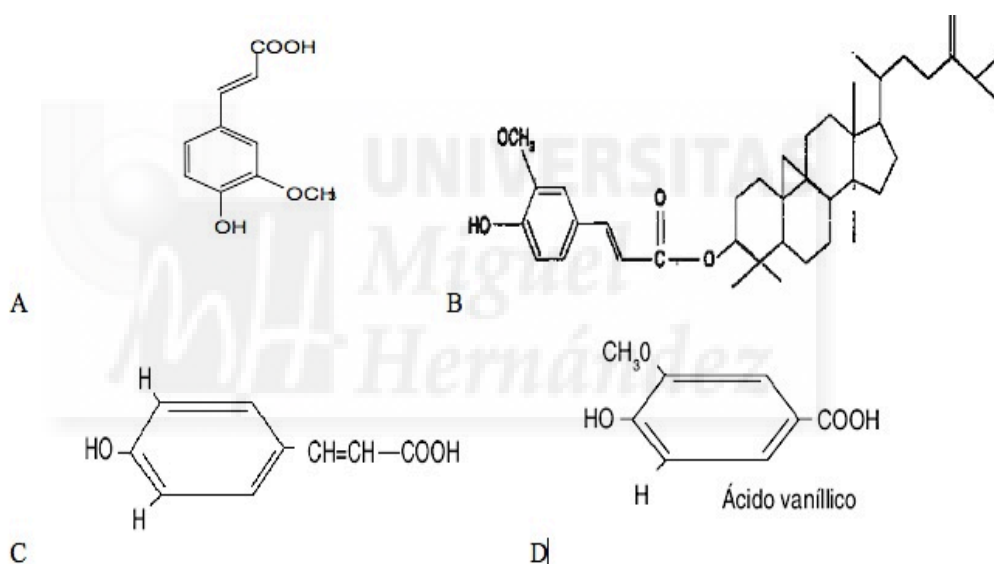


Fig. 9. Estructura de varios antioxidantes fenólicos. A: Ácido ferúlico. B: Orizanol. C: Cumárico. D: Vanílico.

El **orizanol** es un éster del ácido ferúlico (Figura 9B) con una importante actividad antioxidante, que se ha manifestado eficaz en el tratamiento de la aterosclerosis. El **ácido p-cumárico** es otro miembro de la misma familia de los anteriores, derivado en este caso del ácido fenólico (Figura 9C). Presenta capacidad antioxidante, protegiendo del estrés oxidativo al neutralizar radicales libres y, consecuentemente, inhibir la peroxidación

lipídica y disminuir el daño al ADN (Guglielmi et al., 2003; Abdel-Wahab et al., 2003). El **ácido vanílico** (Figura 9D) pertenece también a la familia de los ácidos fenólicos, siendo un antioxidante capaz de inhibir la peroxidación lipídica, con una actividad más elevada en la forma esterificada que en la forma libre (Baublis et al., 2000). El **ácido sinápico** (Figura 10) es otro de los ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico que presenta una potente actividad antioxidante, con alta capacidad para inhibir la oxidación de las LDL (Andreasen et al., 2001).

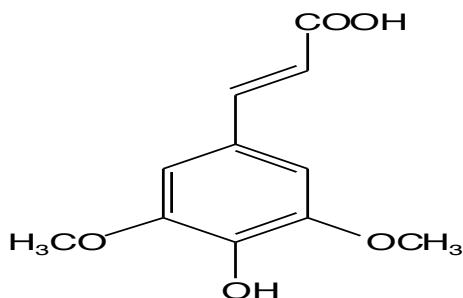


Fig. 10. Estructura del ácido sinápico

El **ácido p-hidroxibenzoico** es también un ácido fenólico, pero derivado del ácido benzoico, que además de mostrar propiedades antibacterianas e hipoglucémicas, es un importante antioxidante natural (Phan et al., 2001). Se podría mencionar también otros ácidos fenólicos como el **ácido gálico** que es un derivado del ácido benzoico, con capacidad antifúngica, antioxidante y antiinflamatoria (Kwon et al., 2004).

Los **flavonoides**, son el grupo de compuestos polifenólicos más abundantes, que desde el punto de vista estructural (Figura 11) tienen un anillo bencénico (A) inserto en un anillo heterocíclico (C) que tiene en C2 un grupo fenilo. Son componentes esenciales de la dieta que contribuyen a la regulación del estado redox celular y poseen propiedades antialérgicas, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales, anticarcinogénicas, antiinflamatorias y antioxidantes, con un claro papel inhibidor de la peroxidación lipídica (Middleton et al., 2000; Rice-Evans, 2001).

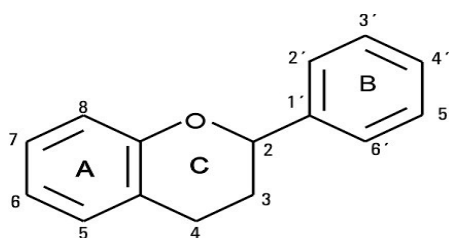


Fig. 11. Estructura básica de un flavonoide

Los flavonoides más abundantes de la dieta son los flavanoles (como la catequinas), pero también se pueden encontrar flavonoles (como la quercetina), flavanonas (como la naringenina), flavonas (como la apigenina) e isoflavonas (como la genisteína). La biodisponibilidad de estos compuestos es muy variable (Scalbert et al., 2002). Todos estos compuestos presentan propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias. Así, las **catequinas** (Figura 12A), pueden inhibir factores de transcripción, como NF-kB y AP-1, enzimas “pro-oxidantes” tales como la oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), la ciclo-oxigenasa (COX) o la xantina oxidasa (XO), e inducir enzimas antioxidantes, como la glutatión S-transferasa o la SOD (Frei y Higdon, 2003). La epigallocatequina-3-galato (EGCG), un importante componente del té verde, reduce de forma significativa los niveles plasmáticos de ADN y proteínas oxidadas, siendo un relevante antioxidante, anti-inflamatorio, anticancerígeno e inmunoregulador (Brausi et al., 2008; Gu et al., 2013). La **rutina** (Figura 12B) es un glucósido de la quercetina capaz de neutralizar de forma eficaz la producción de radicales libres y disminuye el daño oxidativo e inflamatorio (Shen et al., 2002; Selloum et al., 2003).

Otro flavonol relevante de la dieta, aunque no se estudie en la presente tesis, es la **quercetina**. Muestra una elevada actividad antioxidante (Hu et al., 2000) y anti-inflamatoria (Shen et al., 2002), lo que hace tenga un papel importante en la prevención de enfermedades neurodegenerativas, mejorando la memoria y cognición, como se ha comprobado en ratones envejecidos (Patil et al., 2003).

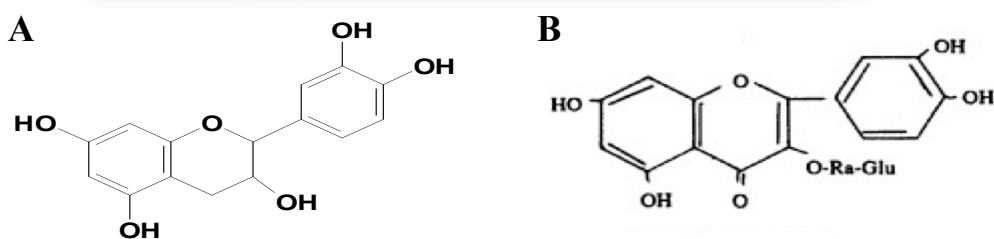


Fig. 12. Estructura de varios flavonoides: A. Catequina, B: Rutina.

Otros antioxidantes

El **ácido lipoico** y su forma reducida, el ácido dihidrolipoico son potentes antioxidantes capaces de eliminar ROS (Packer et al., 2001). La interacción del ácido lipoico con otros antioxidantes *in vivo*, evita los síntomas de deficiencia de vitamina C y E. Los **carotenos**, que como los tocoferoles son muy lipofílicos, son antioxidantes en las

membranas celulares y en las lipoproteínas. Se han detectado importantes funciones de estos compuestos y resultados paradójicos (Gammone et al., 2015). El **licopeno** es un potente antioxidante de la familia de los carotenoides, muy abundante en el tomate, con elevada capacidad para proteger al ADN y la proteínas del daño oxidativo (Pirayesh Islamian y Mehrall, 2015). Aunque la **ubiquinona** o **coenzima Q/Q₁₀** es el único antioxidante liposoluble que se sintetiza en el organismo, y presenta una importante capacidad para evitar la peroxidación lipídica y eliminando el anión superóxido y los radicales lipídicos (Packer et al., 2001), muchas investigaciones se focalizan en su papel protector, especialmente mitocondrial, por aporte exógeno (Miquel, 2002; Enriquez y Lenaz, 2014).

Antioxidantes exógenos que contienen sulfuro

N-acetilcisteína

La **N-acetilcisteína (NAC)** es una forma acetilada del aminoácido cisteína (Figura 13), que le hace ser mucho más estable que este aminoácido. Un estudio que compara la NAC con otros compuestos con cisteína revela que solamente el 16% de la NAC se oxida en el estómago, mientras lo hace el 75-100% de los otros (Bonahomi y Gazzaniga, 1980). La NAC es un precursor de la síntesis de glutatión (De Flora et al., 1991) y estimula la actividad de la enzima glutatión reductasa, que cataliza la regeneración del tripéptido. También estimula las enzimas detoxificantes (GSH S-transferasas, diaforasas, etc) (De Flora et al., 1995) y otras antioxidantes como las enzimas SOD, CAT y GPx (Zaragoza et al., 2000).

La capacidad antioxidante de la NAC está claramente demostrada, neutralizando directamente radicales libres producidos en procesos inflamatorios (Gressier et al., 1994). Esta acción antioxidante también se pone de manifiesto en situaciones de un fuerte estrés oxidativo como el shock endotóxico (Victor y De la Fuente, 2003a; Víctor et al., 2003a,b,2005). No obstante, altas dosis de NAC pueden demostrar un efecto pro-oxidante (Sprong et al., 1998). La NAC es capaz de aumentar la supervivencia celular (Yan y Green, 1998). Se sabe que la NAC reduce la activación de NF-kB, la cual, puede ser desencadenada por varios factores entre los que destacan las ROS (Cotgreave, 1997; Kim et al., 2000; Víctor et al., 2003a), demostrando ser una buena terapia anti-inflamatoria. Así, aunque el uso más extendido de la NAC ha sido como agente mucolítico, los efectos beneficiosos del tratamiento con NAC a nivel clínico son en la actualidad ampliamente aceptados para muchas enfermedades (Banaclocha, 2001; Dodd et al., 2008; Lasram et

al., 2015). Se ha comprobado que la NAC aumenta las actividades del complejo I y IV en mitocondrias sinápticas de ratones envejecidos, lo que sugiere una acción directa de éste antioxidante tiólico en la cadena respiratoria mitocondrial, efecto que ocasiona un aumento en disponibilidad de ATP, y por lo tanto, una protección en el mantenimiento de la capacidad bioenergética mitocondrial (Banaclocha, 2001).

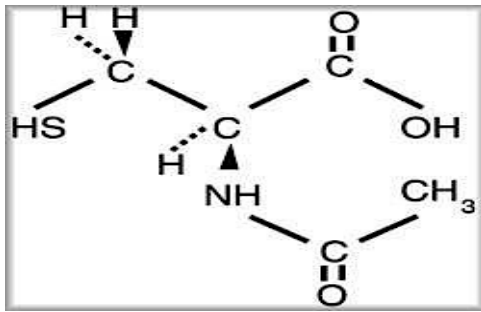


Fig. 13. Estructura de la N-acetilcisteína

1.2.3. El estrés oxidativo

Se denomina estrés oxidativo a la situación en la que las células están expuestas a un ambiente pro-oxidante que ha sobrepasado los mecanismos de defensa antioxidante llegándose a un desequilibrio del balance oxidantes/antioxidantes en favor de los primeros, afectándose el estado redox celular (Sies, 1986). Las concentraciones endógenas de ROS, que inevitablemente se producen al utilizar el oxígeno, deben ser moduladas por la presencia de las defensas antioxidantes con las que cuentan las células, pero estas defensas no son eficaces al 100%, y por ello en condiciones normales pueden detectarse ROS, y por tanto, las células se encuentran sometidas a un estrés oxidativo crónico, lo que llevaría a una acumulación en el daño celular. Un hecho importante a destacar es que las ROS, dependiendo de cantidad, localización y duración pueden ejercer desde efectos de daño oxidativo (en alta cantidad) a regular cascadas de señalización celular necesarios para la vida (en más baja cantidad) (Brieger et al., 2012). Así, un cierto grado de estrés oxidativo es un hecho en todas las células, incluso en las de individuos jóvenes y sanos (Sies, 1986; Sohal y Weindruch, 1996), pero el problema es el exceso de ROS y la presencia de un claro estrés oxidativo, lo que conduce al envejecimiento y la enfermedad.

1.3. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

1.3.1. Definición del envejecimiento y la longevidad

No es fácil definir el proceso de envejecimiento, de hecho, hay numerosas definiciones, pero en todas se recoge la misma idea: cambios que se van sucediendo en nuestras células y tejidos con el paso del tiempo, que suponen una pérdida progresiva de rendimiento fisiológico y una incapacidad para mantener la homeostasis, aumentándose el riesgo de tener enfermedades y de muerte. Por ello, aunque el envejecimiento no es una enfermedad, los cambios que experimenta el organismo con el paso del tiempo facilitan el padecerla. El eminente gerontólogo Strehler (1977), indicó cuatro reglas para el envejecimiento: es universal (tiene lugar en todos los individuos), es endógeno o intrínseco (las causas del proceso tienen un origen interno), es progresivo (la tasa de cambios es similar a lo largo de todo el proceso), y es deletéreo (tiene un acusado carácter perjudicial para el individuo, aunque no para la especie).

Actualmente, en el caso del ser humano, el envejecimiento, está resultando ser un problema en los países “desarrollados”. Esto se debe a que en ellos los avances alcanzados en el ámbito sanitario y social están permitiendo aumentar nuestra “longevidad media”, la cual es actualmente en España de algo más de ochenta años en las mujeres y de casi ochenta en los hombres, cifras que, lógicamente varían según el país considerado (De la Fuente, 2005). La longevidad media o “esperanza de vida media”, representa la media de años que viven los individuos de una población y depende, prioritariamente, de factores de estilo de vida. Dado que empezamos a envejecer una vez que hemos alcanzado nuestra edad reproductora, los 20 años en el ser humano, el periodo más largo de nuestra vida es en el que pasamos envejeciendo. El proceso de envejecimiento culmina al cumplirse el tiempo que representa la “esperanza de vida máxima” o “longevidad máxima”, esto es, la edad máxima alcanzable por los individuos pertenecientes a una especie concreta, hecho que viene determinado genéticamente. Como miembros de la especie *Homo sapiens sapiens* podemos llegar a los más o menos 120 años que ya indicaba el Génesis podría vivir el hombre. Así, los avances sanitarios y un adecuado estilo de vida no nos harán superar mucho esos 120 años, pero pueden permitirnos una mayor longevidad media. De hecho, si los genes pueden participar en un 25% de esa longevidad media, el estilo de vida podría hacerlo en un 75% (De la Fuente, 2009b).

1.3.2. Teorías sobre el envejecimiento

Para poder entender el proceso de envejecimiento hay que encontrar respuestas apropiadas a tres preguntas sobre el mismo: ¿cómo se envejece?; ¿dónde se inicia y desarrolla el proceso de envejecimiento?; ¿por qué tiene lugar este proceso?. El análisis de los mecanismos que determinan la duración de la vida de los animales, incluido el ser humano, se inicia cuando el desarrollo de las ciencias experimentales permiten abordar adecuadamente estas cuestiones, hecho que sucede principalmente en el siglo XX. Aunque hay muchas teorías del envejecimiento, Medvedev en 1990 ya recopiló cerca de 300, se pueden agrupar en los siguientes grandes apartados. En uno de ellos estarían las “Teorías **deterministas**”, todas aquellas que consideran a los genes como únicos responsables del envejecimiento. Este proceso estaría, para dichas teorías, genéticamente programado. Las teorías de este grupo, en el que se incluyen, por ejemplo, la del **límite mitótico de Hayflick** o la del **acortamiento de los telómeros** han sido desechadas para poder explicar el cómo se envejece. En otro gran grupo estarían las “Teorías **estocásticas**” o “epigenéticas”, en las que teniendo en cuenta la participación de los genes otorgan también un papel relevante a los factores ambientales. En este grupo se habla de acumulación progresiva y al azar de daños irreversibles para entender el envejecimiento. Es en este grupo en el que se incluyen las basadas en el **envejecimiento de los sistemas fisiológicos**, las **teorías metabólicas**, contexto en el que puede incluirse la teoría de la “restricción calórica”, y la “**la teoría de los radicales libres o de la oxidación**”, la que mejor indica el cómo se produce el proceso del envejecimiento, y la “**teoría mitocondrial del envejecimiento**”, que nos dice dónde empieza este proceso. Otro grupo de teorías serían las “**evolutivas**”, que nos explican el por qué del envejecimiento, siendo relevante la de Williams que sugiere que el envejecimiento sería consecuencia de los efectos secundarios del producto de genes que son beneficiosos para conseguir el máximo rendimiento funcional en la edad de la reproducción, y así perpetuar la especie, aunque esos mismos genes resulten desventajosos después, pues la selección actúa antes de la edad adulta, y son las necesidades de mantenimiento de la especie y no las del individuo las que interesan biológicamente (Miquel, 2009; De la Fuente, 2009b).

1.3.3. La edad biológica

Un hecho que es evidente en ese progresivo proceso que es el envejecimiento, es su enorme heterogeneidad. El envejecimiento se asocia con una gran variedad de alteraciones a todos los niveles de organización biológica, que van afectando de forma

diferente a los diversos órganos y sistemas de cada individuo y a los distintos individuos de una especie. Así, se hace evidente que el “tiempo biológico” que se manifiesta en los organismos no siempre coincide con el “tiempo cronológico” que miden los relojes, no tiene lugar al mismo ritmo (Soler y Miquel, 2009). Este hecho se empezó a estudiar en los años cincuenta del pasado siglo, y fue en principio introducido por las compañías de seguros de EEUU. MacFarland en 1953 estableció el término de “edad funcional”, utilizando este concepto en los pilotos de las líneas aéreas para decidir la edad de jubilación. La OMS aceptó esa idea en 1963 como criterio de jubilación, al encontrar que la edad funcional era más equitativa para ello que la edad cronológica. El concepto de “edad biológica” fue desarrollado por Confort en 1969, siendo más amplio que el de “edad funcional” al incluir no sólo parámetros funcionales, también no funcionales. A lo largo de los años setenta, una serie de estudios, algunos llevados a cabo con un gran número de individuos y de forma longitudinal durante un periodo de tiempo, van a ir acreditando el valor predictivo de la “edad biológica” como indicador de longevidad (Furukawa et al., 1975; Borkan y Norris, 1980). Este tema se sigue en los años ochenta y noventa con otra serie de investigaciones entre las que se pueden mencionar la de Hawaii dirigido por Befante y colaboradores o la llevada a cabo por Miquel y colaboradores en España. Estos últimos establecieron un útil “Biograma” o “Gerograma” para detectar esa edad biológica en nuestro país (Benfante et al., 1985; Soler et al., 1990,1992; Soler y Miquel, 2009). Ya en nuestro siglo se han seguido algunas, aunque escasas, investigaciones en este sentido (Mitnitski et al., 2002; Ueno et al., 2003; Bae et al., 2008; Bai et al., 2010; Belsky et al., 2015). Para determinar esa “edad biológica” es necesario la utilización de “biomarcadores”, los cuales son una serie de parámetros bioquímicos, fisiológicos y psicológicos que cambian con la edad y que pueden ser sometidos a análisis estadísticos para poner de manifiesto las relaciones entre edad biológica, edad cronológica, pérdida de salud y expectativas de longevidad. El encontrar y validar marcadores de edad biológica es algo que no se ha conseguido todavía con un claro consenso y que representa un importante campo de investigación en gerontología. De hecho, nuestro grupo de investigación es posiblemente el que más ha avanzado en este sentido aportando la determinación de la edad biológica mediante la valoración de una serie de parámetros inmunitarios (De la Fuente, 2012; 2014). Dado que la edad biológica nos indica la velocidad a la que cada individuo envejece y, consecuentemente, su esperanza de vida, la determinación de esta edad y el efecto que sobre la misma pueda tener los estilos de vida, se muestran fundamentales para conseguir una longevidad saludable (Soler y Miquel, 2009; De la Fuente, 2009a,b).

1.4. EL ENVEJECIMIENTO DEL SISTEMA INMUNITARIO: LA INMUNOSENESCENCIA

El deterioro que manifiesta el sistema inmunitario con la edad, suceso que se denomina inmunosenescencia, es un hecho evidente y en la actualidad científicamente demostrado. De hecho, es conocido que al envejecer tienen lugar una mayor incidencia de fenómenos autoinmunes, infecciones y cánceres, patologías que indican la presencia de un sistema inmunitario poco eficiente (Hirokawa et al., 1992). Además, el mayor porcentaje de muertes en la vejez tiene lugar por esos procesos patológicos, especialmente como consecuencia de los infecciosos (High, 2004). Tal es la importancia de una correcta inmunidad en el mantenimiento de la salud que una de las teorías sobre el por qué se produce el envejecimiento, la “teoría inmunitaria”, hace responsable de las alteraciones que tienen lugar en el organismo con el paso del tiempo a los cambios que acontecen en el sistema defensivo (Makinodan, 1977; Makinodan y Kay, 1980; Walford, 1969,1987), una idea que se sigue manteniendo (Fulop et al., 2014). De hecho, como antes se ha comentado, el estado inmunitario se considera determinante de la morbilidad y mortalidad que se da en el ser humano al avanzar la edad (Wayne et al., 1990). No obstante, puede ser entendible que, a pesar de haberse producido en los últimos años un aumento en los estudios sobre inmunosenescencia, dado lo complejo y heterogéneo que es el envejecimiento y el sistema fisiológico que nos ocupa, con sus variadas poblaciones y subpoblaciones celulares, las interacciones entre las mismas y con las de otros sistemas fisiológicos, no se sepa todavía adecuadamente ni de forma completa lo que sucede en el sistema inmunitario al envejecer.

Aunque las células inmunitarias modifican su estructura y capacidad funcional al avanzar la edad, no todas parecen manifestar un claro deterioro. Las hay que se encuentran más activadas y otras no muestran cambios sustanciales al envejecer. Por ello, se ha sugerido que lo que se produce al envejecer es una “reestructuración” del sistema inmunitario (Pawelec et al., 2002; Alonso-Fernandez y De la Fuente, 2011) que afecta a cada componente de este sistema y a las interacciones entre los mismos (Aw et al., 2007; De la Fuente, 2009a). Además, la inmunosenescencia es un proceso en continuo desarrollo con complejas reorganizaciones y mecanismos compensatorios (Globerson y Effros, 2000). De este modo, la inmunosenescencia puede ser considerada como una prueba de que los efectos beneficiosos del sistema inmunitario en su labor de neutralizar los agentes nocivos en edades tempranas de la vida puede volverse perjudicial en la vejez,

etapa de la existencia que constituye un plazo no previsto por la evolución (De Martinis et al., 2005).

El que todavía existan bastantes controversias sobre las modificaciones que experimenta la respuesta inmunitaria con el envejecimiento puede deberse a lo indicado y a otra serie de causas. Entre tales causas podrían citarse, por ejemplo, el que los leucocitos de las diversas localizaciones (los de los diferentes órganos inmunocompetentes y los de sangre periférica) no manifiestan de igual manera los efectos del envejecimiento. También, hay que considerar las diferencias que hay entre especies, así como la diversidad interindividual que se manifiesta en cada especie, de forma evidente en el ser humano, pero también en los animales de experimentación. Factores nutricionales, psicológicos o ambientales influyen decisivamente en la funcionalidad inmunitaria. Otro hecho es la dificultad de tener una estandarización en las técnicas que analizan la función leucocitaria, de modo que cualquier cambio metodológico, por insignificante que parezca, la presencia de unas u otras células en los estudios *ex vivo*, el momento del día o del año en que se llevan a cabo los experimentos, la utilización de machos o hembras, entre otros, son factores que puede dar un resultado diametralmente opuesto (De la Fuente y Medina, 2005; Alonso-Fernandez y De la Fuente, 2011; Maté et al., 2014; Manassra, 2014).

1.4.1. Cambios cuantitativos en las poblaciones leucocitarias

Uno de los aspectos mejor estudiados de los cambios que experimenta el sistema inmunitario con la edad hace referencia a las variaciones que acontecen en la composición de las poblaciones leucocitarias así como en la expresión de sus marcadores de superficie. Un hecho que tiene lugar al envejecer es que se pierde el equilibrio entre el linaje mieloide y el linfoide, mostrándose una tendencia hacia los progenitores mieloides en detrimento de los linfoides (Shaw et al., 2010). Esto podría explicar el que al avanzar la edad los componentes del linaje mieloide no experimentan, en general, disminuciones en su porcentaje y número, hecho que sí sucede en el linfoide. Así, los fagocitos de sangre periférica, neutrófilos y monocitos, parecen no alterar su número con la edad (Lord et al., 2001; Ahluwalia et al., 2001; Schröder y Rink, 2003), aunque hay aportaciones no coincidentes (Morrison et al., 1993). Lo que también se ha descrito es cambios en los fenotipos de estas células que apuntan a un estado de mayor activación en las personas mayores (Globerson y Effros, 2000). Respecto a los macrófagos, los trabajos existentes son menos numerosos que en otros fagocitos y que en linfocitos, pero se ha

comprobado que, en ratones, el número de estas células no varía cuando se comparan animales adultos y viejos (Herrero et al., 2002). No obstante, habría que tener en cuenta el tipo de tejido en el que se encuentran estas células, no teniéndose actualmente un consenso en este sentido (Brubaker et al., 2011). En los macrófagos peritoneales (CD11b+), hay trabajos de nuestro grupo de investigación que muestran una disminución con la edad, lo que se ha atribuido al aumento en la capacidad de adherencia de estas células a los tejidos peritoneales (Puerto et al., 2005a; Arranz et al., 2010b).

Las células NK también experimentan cambios con el envejecimiento. Numerosos autores han detectado un aumento de las mismas, con la edad, en sangre periférica humana (Solana et al., 1999; Solana y Mariani, 2000; Camous et al., 2012), especialmente aquellas con una expresión tenue del marcador CD56^{dim}, que son las encargadas de la función citotóxica. Sin embargo, las NK en ratones, caracterizadas por el marcador NK1.1, disminuyen en el peritoneo al envejecer (Puerto et al., 2005a).

Los linfocitos T (CD3+) se encuentran en menor número al avanzar la edad, debido al proceso de involución tímica (Boyd et al., 2013). No obstante, no todas las subpoblaciones de células T experimentan los mismos tipos de cambios al envejecer. Los linfocitos T CD4+, o bien no experimentan modificaciones o disminuyen a edades avanzadas, mientras los TCD8+, según la mayoría de los investigadores, aumentan en número (Pawelec, 2012). Por ello, la relación CD4+/CD8+ disminuye con la edad (Pawelec, 2012), aunque también se ha encontrado que no hay variación en este cociente en el bazo (Simioni et al., 2007). Además, en ambas subpoblaciones las células vírgenes (CD45RA+) son las que principalmente van disminuyendo, mientras que aumentan las memoria (CD45RO+) (Romanyukha y Yashin, 2003; Pawelec, 2012), hecho que se ha relacionado con la estimulación antigénica crónica a lo largo de toda la vida (Franceschi et al., 2000a). También en estas subpoblaciones se ha visto una pérdida de expresión del marcador CD28, esencial para la activación de las células T, siendo, además, los linfocitos CD4+CD28- y los CD8+CD28- potentes secretores de citoquinas proinflamatorias (Zanni et al., 2003), lo que contribuiría a que al aumentar la edad se tuviesen mayores niveles de compuestos de inflamación. Al envejecer aparece un desequilibrio entre las subpoblaciones Th1/Th2 dándose una mayor producción de los Th2 y, consecuentemente de las citoquinas que los mismos liberan como la IL-4, IL-5, IL-6 e IL-8 (y que están más relacionadas con la respuesta inmunitaria humoral en la que se implican los anticuerpos) y una menor de las Th1, como la IL-2, el interferon gamma (IFN γ), la IL-12 o la IL-15, relacionadas con una respuesta de tipo celular. Otro hecho

que hay que tener en cuenta son los cambios que al envejecer experimentan toda una serie de otras subpoblaciones de células T, como las Th17, o las reguladoras como las Th9, Th22 (todas ellas productoras de las interleuquinas de esa numeración: IL-17, IL-9, IL-22, respectivamente), o la Tr1 (TGFb), Tr3 (IL-10), entre otras (Aw et al., 2007; Annunziato y Romagnani, 2009; Noelle y Nowak, 2010).

Los linfocitos B y sus precursores medulares disminuyen con la edad, a pesar de que la médula ósea no involuciona al envejecer como lo hace el timo (Frasca et al., 2003, 2008). Además, las células pre-B muestran una menor capacidad para madurar hacia células B y una elevada susceptibilidad a la apoptosis (Allman y Millar, 2005). No obstante, el número de células secretoras de anticuerpos parece aumentar con la edad, especialmente las CD5+ que generan más autoanticuerpos (Weksler, 2000). De forma similar a lo que sucede con los linfocitos T, se han descrito variaciones diferentes en los linfocitos B memoria y en los “vírgenes” en sangre periférica de ancianos (Colonna-Romano et al., 2002,2006).

1.4.2. Cambios funcionales en el sistema inmunitario con la edad

La “remodelación” que experimenta el sistema inmunitario con el envejecimiento se aprecia de forma más relevante en la capacidad funcional de sus células. Así, hay parámetros que aumentan, otros disminuyen y otros no se modifican (Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2009a; Desai y Landay, 2010; Agarwal y Busse, 2010; Alonso-Fernández y De la Fuente, 2011).

En lo que respecta a las células que llevan a cabo una respuesta inmunitaria innata, a pesar de que en el pasado se consideraba que jugaban un papel poco relevante en el deterioro inmunitario de la vejez, las aportaciones de las últimas décadas desmienten esta idea, habiéndose observado que experimentan cambios con el envejecimiento (Shaw et al., 2010; Hajishengallis, 2010). En el caso de los fagocitos, hay trabajos que indican que la función de los mismos está preservada con la edad, mientras que otros muestran cambios en casi todas las funciones de estas células, disminuyendo algunas al envejecer pero estimulándose otras (Lord et al., 2001; De la Fuente et al., 2004a,b; Aw et al., 2007; De la Fuente, 2009a; Arranz et al., 2010a; Wessels et al., 2010; Alonso-Fernandez y De la Fuente, 2011). Las células fagocíticas siguen una serie de etapas en su proceso de ingestión y destrucción de los agentes patógenos. En primer lugar se adhieren a las paredes de los vasos o a los tejidos en los que se encuentran, para posteriormente moverse, lo que fundamentalmente realizan de forma dirigida por el gradiente químico

que se crea desde el foco infeccioso y que les permite acercarse al mismo, es la propiedad denominada quimiotaxis. Una vez que estas células llegan al foco infeccioso y contactan con los agentes extraños se unen a ellos y los fagocitan, incluyéndolos en vacuolas, fagosomas, iniciándose la etapa de destrucción de tales agentes. En este paso del proceso se dan una serie de mecanismos, los más relevantes conllevan el aumento del consumo de oxígeno, la activación de una enzima, la NADPH oxidasa (Nox), y la consecuente producción de radicales libres, el primero de los cuales es el anión superóxido (O_2^-), que posteriormente dará otros radicales y ROS (Figura 14). Estos radicales permitirán procesar los microorganismos fagocitados para la posterior presentación de los “determinantes antigénicos” a los linfocitos T, que de esta forma pueden reconocerlos.



Fig. 14. Etapas del proceso fagocítico en macrófagos.

Los neutrófilos de sangre periférica son células que viven pocas horas (8-12 horas en circulación), independientemente que hayan encontrado o no un microorganismo que destruir, y las primeras que llegan al sitio de agresión para eliminar directamente a los microorganismos invasores, siendo su activación y reclutamiento en los tejidos periféricos fundamental para la defensa del organismo (Shaw et al., 2010). Así, la pérdida progresiva de la funcionalidad de los neutrófilos se considera una causa primaria del aumento de morbilidad y mortalidad debidas a las infecciones que ocurre en las últimas décadas de la vida (Tortorella et al., 1999, 2001). Aunque hay resultados contradictorios, en general se acepta que los neutrófilos muestran una mayor adherencia, una menor quimiotaxis y capacidad fagocítica y alteraciones en la actividad microbicida

al avanzar la edad. En este último aspecto, se ha descrito, en sujetos viejos, una menor desgranulación de enzimas líticas en respuesta a un péptido de las membranas de las bacterias como el fMLP, pero la producción de radicales libres como el anión superóxido puede aparecer, al envejecer, sin cambios, aumentada, o en muchos casos disminuida (Simell et al 2011; Tsukamoto y Machida, 2012; Maté, 2015). Estos hechos, con las contradicciones apuntadas y especialmente según el método de estudio empleado, se encuentran en las otras células fagocíticas al envejecer (De la Fuente, 2009; Alonso-Fernández y De la Fuente, 2010; Arranz et al., 2010a; Maté, 2015). Concretamente, los macrófagos suponen una población con una gran heterogeneidad, tanto funcional como fenotípica, la cual parece deberse en gran medida a su capacidad para adaptarse a los cambios en el microambiente que les rodea. De hecho, se ha postulado la hipótesis de que las alteraciones que experimentan los macrófagos con la edad son el resultado de esas adaptaciones al ambiente tisular que les rodea (Stout y Suttles, 2005). Dentro de esta idea, se encuentra la indicación de que el envejecimiento no influye en la misma medida a macrófagos procedentes de diferentes localizaciones (Kohut et al., 2004).

Las alteraciones funcionales de las NK con la edad pueden contribuir a la mayor incidencia de enfermedades infecciosas y especialmente neoplásicas (Albright et al., 2004; Le Garff-Tavernier et al., 2010). De hecho, la actividad NK es uno de los parámetros que se relaciona con la susceptibilidad a padecer infecciones y el aumento de muerte en la vejez, tanto en los seres humanos como en los roedores (Ogata et al., 2001; Aw et al., 2007). La actividad citotóxica por célula disminuye claramente en la vejez (Arranz et al., 2008,2010a; Maté, 2015), lo cual no impide que existan trabajos en los que se indica un aumento de esta función o la ausencia de cambios en la misma. Esa disminución de la actividad NK con el envejecimiento, mayoritariamente detectada, podría explicar el aumento del número de las células NK que se observa al avanzar la edad. La expansión de células NK podría constituir un mecanismo compensatorio de la menor funcionalidad de las mismas. Sin embargo, las causas de esa menor actividad NK son aún poco conocidas, no debiéndose ni a una menor unión célula efectora-diana, ni al contenido, distribución y utilización de las perforinas. Podrían implicarse ciertos cambios en marcadores de superficie que experimentan estas células (Aw et al., 2007), pero también al hecho de que la funcionalidad de las células NK está modulada por citoquinas. Entre esas citoquinas se puede destacar la IL-2, en respuesta a la cual las células NK no sólo aumentan su actividad citotóxica, también proliferan y liberan otras citoquinas como IFN γ y quimioquinas como IL-8. Las variaciones con la edad en las citoquinas, que se

comentará más adelante, pueden condicionar muchas de las respuestas celulares indicadas.

Los linfocitos T son las células más estudiadas en el contexto de la inmunosenescencia y las que experimentan en mayor medida el deterioro funcional como consecuencia del envejecimiento (Pawelec et al., 2002, Pawelec, 2014). Actualmente se piensa que este hecho es un fenómeno multifactorial. Así, se pueden mencionar: las alteraciones en las “células madre” que van a generar estos linfocitos, las que aparecen en el microambiente tímico, los cambios en las subpoblaciones y en la expresión de moléculas de superficie antes indicados, la mayor susceptibilidad a la apoptosis y otras modificaciones que experimentan las células maduras, o las variaciones en la señalización intracelular que se generan tras la unión de los ligandos a los correspondientes receptores de las células T. En este sentido se ha comprobado que al envejecer hay una disminución en la formación de inositol trifosfato (IP3) y de diacil glicerol (DAG), diferencias en las isoformas de la fosfolipasa C (PLC) y de la proteína quinasa C (PKC) y, en general, un alterado funcionamiento de las quinasas (Pawelec et al., 2002, 2010). En lo que respecta a la atrofia tímica (Lynch et al., 2009), hecho que sucede a una edad bastante temprana, se han propuesto muchas teorías, algunas sumamente curiosas, para explicarla, pero ninguna ha sido totalmente aceptada como válida. Sin embargo, hay datos que indican que dicha atrofia no impide el total funcionamiento de este órgano, e incluso que unas adecuadas células T maduras pueden mantener su integridad en la vejez. No obstante, el conservar el timo más allá de la edad reproductora es para algunos investigadores un lujo innecesario, pues ya se han conseguido las células T memoria que se requieren para responder a los posibles antígenos con los que se enfrentará el individuo en lo que le queda de vida. Además, al envejecer hay un elevado número de células T que se diferencian extratímicamente, lo que puede ser un excelente mecanismo compensador de la atrofia tímica.

Una de las funciones más destacadas de las células T es su proliferación en respuesta a un antígeno o expansión clonal. Hay bastantes investigaciones que demuestran que la capacidad proliferativa de los linfocitos en respuesta a mitógenos (usados en el laboratorio para mimetizar la respuesta *in vivo* a los antígenos) va disminuyendo de forma significativa durante el envejecimiento, tanto en humanos como en animales de experimentación (Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2009a; Arranz et al., 2008;2010a). Este deterioro en la proliferación y también en la producción de IL-2 durante el envejecimiento, es específico de las células T vírgenes y no se ha observado en

las células T de memoria (Adolfsson et al., 2001). Es interesante indicar que esa menor proliferación y secreción de IL-2, junto con un alto porcentaje de CD8+, se han propuesto como marcadores predictivos de mortalidad (Pawelec et al., 1995; Ferguson et al., 1995). Como paso previo a la proliferación los linfocitos deben adherirse al endotelio y los tejidos y migrar al sitio de reconocimiento antigénico, dos funciones no específicas que comparten con otras células inmunitarias como los fagocitos. En esa función de adherencia participan las moléculas de adhesión, cuya expresión en las células aumenta al envejecer (De Martines et al., 2000). No obstante, la capacidad de migrar hacia el sitio de reconocimiento antigénico, propiedad que recibe el nombre también de quimiotaxis, se encuentra disminuida al envejecer (De la Fuente, 2009a; Arranz et al., 2010a; Huang et al., 2011).

Los linfocitos B han sido mucho menos estudiados que los T en cuanto a las alteraciones que experimentan con la edad, pero también manifiestan senescencia (Ademokun et al., 2010). Los cambios en las células B parecen deberse en gran parte a una deficiente colaboración por parte de las T (Malaguarnera et al., 2001). Una clara manifestación del deterioro de la respuesta inmunitaria humoral al envejecer es la deficiente generación de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación en ancianos (Song et al., 1999; Ongradi y Kövesdi, 2010). La capacidad proliferativa de los linfocitos B, al igual que pasa con los T, está disminuida en la vejez (Frasca et al., 2003), pero se ha observado o una falta de cambios o un aumento de las inmunoglobulinas circulantes, especialmente de autoanticuerpos (Weksler, 2000).

Las modificaciones con la edad en las citoquinas que producen y liberan las diferentes células inmunitarias es también un aspecto interesante que ha sido ampliamente examinado con el fin de dilucidar posibles mecanismos de inmunosenescencia. Hay que tener en cuenta que las citoquinas regulan la función inmunitaria, desempeñando un papel fundamental tanto en su iniciación como en su etapa efectora. Las alteraciones en la red de citoquinas al envejecer es más complicado que el simple cambio unidireccional hacia las Th2, antes comentado. La IL-2, y es unánimemente aceptado, disminuye al envejecer (Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2009a; Arranz et al., 2010c). También lo hace la IL-12 o el IF γ . Otras citoquinas como la IL-4, la IL-5, la IL-6 o la IL-8 aumentan con la edad, aunque como en casos anteriores hay trabajos que obtienen resultados en los que esas citoquinas o no se modifican o disminuyen. Esos datos apuntan a un cambio en el perfil Th1/Th2 al envejecer, como se ha comentado anteriormente. Aunque los resultados son muy contradictorios, pues

además dependen de en qué contexto fisiológico se valoren esas citoquinas (Maté, 2015), se puede decir que al avanzar la edad aumentan las citoquinas pro-inflamatorias (como el TNF α o la IL-6) y disminuyen las anti-inflamatorias como la IL-10 (Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2009a; Arranz et al., 2010b). Ese aumento, al envejecer, de las citoquinas más implicadas en la respuesta humoral y en la inflamación (Th2) podría explicar la mayor susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Por su parte, la menor presencia de citoquinas implicadas en la respuesta celular (Th1) estaría en la base de la pérdida de respuesta frente a las infecciones y al desarrollo tumoral que se da en el envejecimiento. Además, determinados perfiles de citoquinas como es unos bajos niveles de IL-6 y elevados de IL-10 o IL-15 se ha asociado con una mayor longevidad (Mariani et al., 2002a,b).

1.4.3. Cambios en la comunicación neuroinmunoendocrina con la edad

Al envejecer todos los sistemas reguladores se deterioran, no sólo el inmunitario, que se ha comentado anteriormente, también el sistema nervioso y el endocrino, así como lo hace la comunicación entre dichos sistemas (De la Fuente, 2009a). Precisamente este hecho tan relevante hizo que se emitiera otra de las numerosas teorías sobre el envejecimiento, la que atribuye los cambios que suceden durante el mismo a dicha alteración en la comunicación neuroinmunoendocrina, la cual sería la que subyace al aumento de morbilidad y mortalidad que tiene lugar al aumentar la edad (Fabris, 1991; De la Fuente et al., 2005; De la Fuente, 2009a).

En este contexto hay que situar la inadecuada respuesta al estrés como uno de los hechos que mejor definen el envejecimiento de los individuos. Este hecho va a repercutir en una mala salud inmunitaria y, en general, en la de los otros sistemas fisiológicos, lo que supone un peor envejecimiento (McEwen, 2002; Blalock, 2005; Bauer, 2005; Bauer et al., 2009; Cruces et al., 2014a). De hecho, el estrés se considera hoy cómo un claro factor de riesgo para acelerar el proceso normal de envejecimiento, la inmunosenescencia y la aparición de las enfermedades asociadas a la vejez, como las neurodegenerativas (Espinosa-Oliva et al., 2011; Machado et al., 2014).

Es difícil determinar si con el envejecimiento, son los cambios neurológicos los que inducen modificaciones inmunológicas o si son las alteraciones de la función inmunitaria las que provocan cambios en el sistema nervioso, o si bien ambos procesos tienen lugar simultáneamente, lo que parece ser lo más probable según algunos autores (Bellinger et al., 2001). No obstante, nuestro grupo ha comprobado que al envejecer las

células inmunitarias no responden o cambian su respuesta a los neurotransmisores y hormonas, independientemente de la cantidad en que les lleguen (De la Fuente et al., 2000, 2001a y b; De la Fuente y Medina, 2005).

1.5. OXIDANTES Y ANTIOXIDANTES EN EL SISTEMA INMUNITARIO. CAMBIOS CON LA EDAD

Como ya se ha indicado con anterioridad, el funcionamiento de nuestro organismo se basa en un perfecto equilibrio entre niveles de oxidantes (ROS) y de antioxidantes. La pérdida de este equilibrio, por un exceso de la producción de los primeros o por una menor disponibilidad de los segundos, conllevaría una situación de estrés oxidativo que subyace al envejecimiento y la enfermedad. La idea central de la hipótesis del estrés oxidativo en la senescencia reside en que la producción de ROS aumenta al envejecer, siendo el daño oxidativo que induce el principal factor causal que subyace a la pérdida de las funciones fisiológicas con el envejecimiento (Sohal y Weindruch, 1996; Kokoszka et al., 2001; Sastre et al., 2003; Vida et al., 2014). Hay que tener en cuenta que la modificación del equilibrio existente entre ROS/defensas antioxidantes se puede reflejar en alteraciones de funciones celulares como la proliferación, la apoptosis y la senescencia. Los cambios que se producen en la funcionalidad de las células inmunitarias con el envejecimiento podrían ser debidos al **estrés oxidativo crónico** que experimentan las mismas con el paso del tiempo (De la Fuente et al., 2005; Vida et al., 2014). Estudios de nuestro grupo han revelado un paralelismo del envejecimiento a lo que acontece cuando a los animales se les genera un “shock endotóxico”, un proceso en el que tiene lugar un **estrés oxidativo agudo**, el producido por una septicemia. De hecho, en animales con ese shock letal aumentan los niveles de oxidantes en los leucocitos peritoneales y disminuyen las defensas antioxidantes, existiendo un comportamiento en las funciones de las células inmunitarias en las horas de supervivencia del animal semejante al que tiene lugar con el envejecimiento (Víctor y De la Fuente, 2003a,bc; Víctor et al., 2005).

1.5.1. Producción de oxidantes en el sistema inmunitario. Cambios con la edad

Existen claras evidencias de que muchos tipos celulares, como fibroblastos, células epiteliales y endoteliales, linfocitos, células NK y especialmente fagocitos, producen ROS para llevar a cabo sus funciones biológicas. Las ROS van a tener efectos tanto

beneficiosos como perjudiciales sobre las distintas estirpes celulares, dependiendo de su concentración, localización y presencia de sistemas de control (Babior, 2000; Babior et al., 2002; Cook-Mills, 2002; Brieger et al., 2012; Paiva y Bozza, 2014). El sistema inmunitario tiene una funcionalidad particularmente ligada a la liberación de radicales del oxígeno, ejerciendo las células inmunitarias su función defensiva de eliminación de patógenos y células extrañas mediante la utilización de ROS, por lo que los leucocitos son una fuente importante de oxidantes (Vida et al., 2014).

Las células fagocíticas, como macrófagos y neutrófilos, producen ROS como respuesta a la activación que sufren al fagocitar, proceso en el que se da un aumento del consumo de oxígeno estableciéndose lo que se denomina "estallido respiratorio". En el proceso participa una de las isoformas de la familia de enzimas Nox, la Nox 2, que está en células inmunitarias (De la Fuente et al., 2011). Esta NADPH oxidasa se localiza en la cara citoplásmica de la membrana plasmática y se constituye como una cadena de electrones cuando el fagocito se ve expuesto a estímulos tales como compuestos quimioatrayentes ó partículas opsonizadas, dándose una cascada de formación de ROS la primera de las cuales es el anión superóxido (Figura 15). Este sistema enzimático de la NADPH oxidasa está constituido por cuatro componentes: la proteína heterodimérica de membrana flavocitocromo b588 (compuesta por gp91^{phox} y p22^{phox}), las GTPasas Rac1 y Rac2, y un componente adicional, p40^{phox} (Babior et al., 2002). Emplea como dador de electrones NADPH y requiere como coenzimas una flavoproteína, una ubiquinona (ubiquinona 10) y un citocromo b (denominado b-245 atendiendo al potencial redox o citocromo b₅₅₈ o b₅₅₉ atendiendo a la longitud de onda de la banda a del citocromo reducido) (Halliwell y Gutteridge, 1989; Cross et al., 1990). El anión superóxido se metaboliza hacia peróxido de hidrógeno y puede seguir dos vías, la generación del radical hidroxilo o la formación de varios productos tóxicos en presencia de haluros y de la mieloperoxidasa. El anión superóxido participa en la acción microbicida temprana de los macrófagos peritoneales, a diferencia del óxido nítrico (NO) producido por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que interviene tanto en esta fase temprana como en la tardía del proceso. El peróxido de hidrógeno a altas concentraciones es un agente germicida, y también lo es el hidroxilo, participando esas ROS en la actividad destructora de microorganismos y también en la citotóxica y tumoricida de estas células (Klebanoff, 1980; Mytar et al., 1999; Vazquez-Torres et al., 2000; Babior, 2002; Gwinn y Vallyathan, 2006; Paiva y Bozza, 2014).

En la actividad citotóxica llevada a cabo por las células NK también se liberan grandes cantidades de ROS, al igual que en los linfocitos, donde juegan un importante papel en la señalización intracelular y la proliferación. Esa producción de ROS representa, por tanto, el inicio de los mecanismos que constituyen la respuesta inmunitaria, en los que tiene un papel relevante la activación del factor de transcripción NF- κ B (Higuchi y Nagahata, 1998; Suzuki y Ono, 1999; Vázquez-Torres et al., 2000; Li y Verma, 2002; Vida et al., 2014; Paiva y Bozza, 2014).

Las células inmunitarias son, además, muy sensibles a la oxidación, debido al alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados presentes en sus membranas, el papel crítico de la señalización celular asociada a las mismas y la expresión génica que requieren en su labor defensiva (Meydani et al., 1995). Por todo ello, el sistema inmunitario es un claro ejemplo de la necesidad de mantener el equilibrio oxidantes/antioxidantes antes mencionado.

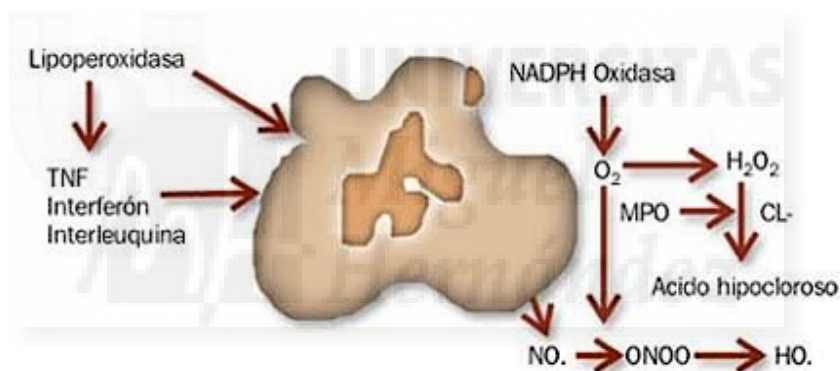


Fig. 15. Principales especies reactivas de oxígeno (ROS) implicadas en la capacidad microbicida en un leucocito típico.

La producción de ROS aumenta al envejecer en las células inmunitarias (De la Fuente, 2009a; De la Fuente et al., 2011; Vida et al., 2014) al igual que la generación de compuestos inflamatorios, siendo inflamación y oxidación dos procesos íntimamente relacionados (Vida et al., 2014). Como factores proinflamatorios que forman las células inmunitarias en su función defensiva, y que podrían aumentarse al envejecer, se pueden citar el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la prostaglandina E₂ (PGE₂) y el óxido nítrico (NO), entre otros. Centrándonos brevemente en el TNF α por ser uno de los factores estudiados en la presente tesis, se ha comprobado que a bajas concentraciones,

promueve la respuesta inmunitaria y retrasa la apoptosis de neutrófilos (Van der Berg et al., 2001), sin embargo, altas concentraciones de esta citoquina potencian el shock séptico (Pierre, 1992) y aumenta la apoptosis de neutrófilos (Van der Berg et al., 2001). Numerosos trabajos apuntan a que los niveles de esta citoquina proinflamatoria aumentan con la edad (Ginaldi et al., 1999a,b; Pedersen et al., 2000; Tang et al., 2000; Ortega et al., 2000a; Lord et al., 2001; De la Fuente et al., 2001a; De la Fuente et al., 2004) y en ratones con envejecimiento prematuro (Guayerbas et al., 2002c, 2004). La elevada liberación de esta citoquina es uno de los hechos que más claramente se relaciona con un estado de estrés oxidativo del individuo (Víctor y De la Fuente, 2002b), lo que podría manifestar la presencia de dicho estado en la vejez (Meydani et al., 1998).

1.5.2. Los antioxidantes en el sistema inmunitario. Cambios con la edad

Numerosas evidencias experimentales apoyan la asociación entre una ingesta inadecuada de energía y macronutrientes y/o una deficiencia de micronutrientes específicos en la dieta, con un empeoramiento de la función inmunitaria (Miquel, 2002; Calder y Kew, 2002; Chandra, 2002,2004; Marcos et al., 2003; Marcos, 2011). Este deterioro del sistema inmunitario incide directamente en la salud del huésped y puede disminuir su longevidad debido a una mayor incidencia de enfermedades infecciosas, aumentando así la tasa de mortalidad (Aspinall, 2000; Ginaldi et al., 2001; Chandra, 2004). Por este motivo, se ha generado un interés creciente en el conocimiento de alimentos con propiedades inmunomoduladoras que, en general, se acogen a la denominación de “alimentos funcionales”, los cuales deben servir para aumentar la salud y la calidad de vida reduciendo el riesgo de padecer enfermedades. De todos los nutrientes, los que tienen carácter antioxidante parecen ser una buena estrategia para mejorar la funcionalidad de las células del sistema inmunitario, dada la producción de ROS que realizan para llevar a cabo su función asociado al elevado consumo de sus antioxidantes intracelulares (Hernanz et al., 1990; De la Fuente et al., 2011; Vida et al., 2014). Este hecho es especialmente relevante durante el envejecimiento, dado que los individuos viejos tiene más riesgo de tener una pobre nutrición y un mayor estrés oxidativo (Chandra, 2004; Chernoff, 2005; De la Fuente et al., 2005). Así, en personas mayores se produce una clara deficiencia en la toma de estos micronutrientes, lo cual es debido en parte a los cambios fisiológicos asociados al envejecimiento, pero también a factores sociales y económicos (Chernoff, 2005). Precisamente uno de los hechos que sustenta la teoría de la oxidación en el envejecimiento es la comprobación de que tras la administración de antioxidantes a animales de experimentación como los ratones, estos

aumentan su vitalidad y esperanza de vida (Miquel y Ecónomos, 1979; Guayerbas, 2003). También, la administración de antioxidantes puede retrasar el estrés oxidativo y el deterioro fisiológico asociado al envejecimiento normal y patológico (Sastre et al., 2000; Hasnis y Reznick, 2003; Massip et al., 2010; De la Fuente et al., 2011). No obstante, hay algunos resultados que no parecen apoyar esta idea de un mayor bienestar y longevidad tras la administración de antioxidantes, siendo las dosis utilizadas uno de los factores que más inciden en los resultados tan contradictorios (Viña et al., 2007). De hecho, se ha propuesto un papel hormético para los antioxidantes de la dieta, con una dosis-respuesta en forma de U en lo que respecta a la situación redox del organismo (Calbrese et al., 2010).

A continuación se detallan los efectos que sobre el sistema inmunitario tienen los antioxidantes que han sido estudiados en la presente tesis.

1.5.2.1. El ácido ascórbico (vitamina C) y el sistema inmunitario. Cambios con la edad

Aunque ya hace casi un siglo que se sugirió el papel que la vitamina C podía tener en las infecciones respiratorias, no fue hasta 1970, con la aparición del bestseller “La vitamina C y el resfriado común”, escrito por el nobel Linus Pauling, cuando la vitamina C se asumió que era capaz de prevenir y aliviar las infecciones (Hemilä, 2003).

Los mecanismos por los cuales la vitamina C afecta al sistema inmunitario son poco conocidos, aunque ya hace unos años se apuntó el relevante papel de esta vitamina en la homeostasis de dicho sistema (Weber et al., 1996). De hecho, los leucocitos presentan altas concentraciones de ácido ascórbico, las cuales disminuyen durante los procesos infecciosos y el estrés (Wintergerst et al., 2006), ya que estas células utilizan dicho ácido cuando están llevando a cabo su función (Hernanz et al., 1990). Así, la disminución de las concentraciones de vitamina C en las células inmunitarias se asocia con una menor capacidad funcional de las mismas (Schwages et al., 1998). Por otra parte, toda una serie de trabajos demuestran la capacidad moduladora que tiene el ácido ascórbico en las funciones de los fagocitos, la proliferación de las células T, la actividad NK, la producción de citoquinas e inmunoglobulinas, la expresión génica de moléculas de adhesión, así como la de otros genes implicados en procesos inflamatorios, tanto en el hombre como en animales de experimentación (Leibovitz y Siegel, 1981; Ganguly y Waldman, 1985; Rayment et al., 2003; Hartel et al., 2004; Alvarado et al., 2005, 2006a,b;

Duarte y Lunec, 2005; Majewicz et al., 2005; Stadler et al., 2007; Shaik-Dasthagirisahab et al., 2013; Manning et al., 2013; Sorice et al., 2014; Uchio et al., 2015). El principal papel que lleva a cabo el ácido ascórbico en las células inmunitarias es contribuir al mantenimiento de la integridad redox de las mismas, protegiéndolas de las ROS que se producen en la respuesta inflamatoria, no habiendo podido ser asociado a un concreto mecanismo inmunológico. Por ello, se ha sugerido que la vitamina C no tiene efectos protectores específicos (Hemilä, 2003), siendo un modulador indirecto de las células inmunitarias (Maeng et al., 2009). No obstante, hay resultados que demuestran los efectos positivos que la vitamina C presenta, de forma concreta, en diferentes funciones relevantes de las células inmunitarias. Así, esta vitamina estimula la actividad NK frente a tumores (Vodjani et al., 2000), y la proliferación de los linfocitos, con una mayor producción de citoquinas e inmunoglobulinas (Kelley y Bendich, 1996; Jeng et al., 1996; De la Fuente y Víctor, 2001). Uno de los mecanismos que se han propuesto para explicar este efecto, es la inhibición de las rutas de señalización de la apoptosis de las células linfoides por parte de la vitamina C (Campbell et al., 1999; Perez-Cruz et al., 2003). En lo referente al papel de este antioxidante en la producción de citoquinas, Härtel et al. (2004) indicaron que la vitamina C es capaz de influir de forma selectiva en las mismas, tanto en monocitos como en linfocitos, dependiendo el efecto del tipo de estímulo y de célula estudiada. Por ejemplo, la vitamina C inhibe la producción de IL-6 y TNF α pero no de IL-1 e IL-8 en monocitos, e inhibe la producción de IL-2 pero no de TNF α e IFN γ en linfocitos. No obstante, este antioxidante, al igual que hacen otros, parece mantener una adecuada respuesta inmunitaria mediante la producción necesaria de citoquinas Th1 proinflamatorias (Wintergerst et al., 2006). No obstante, la vitamina C es capaz de inhibir la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en monocitos, así como de su receptor, en individuos con niveles plasmáticos de ascorbato bajos (Rayment et al., 2003), lo que indica un papel modulador del estado inflamatorio.

La vitamina C suele ser deficiente en individuos viejos (Chandra, 2004; Chernoff, 2005). De hecho al envejecer, la concentración de ascorbato en plasma y en los linfocitos disminuye entorno a un 20% (Lenton et al., 2000), habiéndose observado que es el único antioxidante cuyas concentraciones bajas en los mayores puede predecir la mortalidad (Fletcher et al., 2003). Sin embargo, los efectos de esta vitamina en las funciones inmunitarias de individuos viejos apenas han sido investigadas.

1.5.2.2. El alfa-tocoferol (vitamina E) y el sistema inmunitario. Cambios con la edad.

La vitamina E tiene un papel crucial en las células del sistema inmunitario, ya que éstas poseen un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en sus membranas, lo cual hace que sean más susceptibles al daño oxidativo, y por este motivo se encuentran especialmente enriquecidas en vitamina E (Hatman y Kayden, 1979; Coquette et al., 1986). En este sentido, unos niveles insuficientes de vitamina E hacen que las membranas celulares se vuelvan inestables y se potencie la producción de inmunosupresores como ciertas prostaglandinas (PGs) (Meydani et al., 1995). La deficiencia de vitamina E en personas mayores de los países occidentales es escasa (Polito et al., 2005), por lo que no hay muchos estudios sobre el efecto que dicha deficiencia tiene en la inmunidad. No obstante, en los que se han llevado a cabo se comprueba que, tanto en el hombre como en animales de experimentación, tal deficiencia supone un empeoramiento de las funciones inmunitarias (Kowdley et al., 1992; Traber, 1999; Pekmezci, 2011). Aunque se ha documentado en una serie de investigaciones el efecto estimulador de la vitamina E sobre la función inmunitaria en animales jóvenes (Han y Meydani, 1999; Wakikawa et al., 1999; Alvarado et al., 2005b; Hernandez et al., 2009), parece que el efecto de esta vitamina en animales viejos e individuos de edad avanzada es mucho más relevante (Wu et al., 1998; Han y Meydani, 1999; Meydani, 1999; Beharka et al., 2000,2002; Han et al., 2000; Adolfsson et al., 2001; Ahmed et al., 2004; Mcdonald et al., 2005; Meydani et al., 2005; Wu y Meydani, 2014; Bou Ghanem et al., 2015). Así, La vitamina E muestra un importante efecto sobre genes asociados con la regulación del ciclo celular y balance Th1/Th2 en células T de ratones viejos, contribuyendo a la mayor capacidad proliferativa observada en los animales (Han et al., 2006) y en las personas suplementadas (De la Fuente y Victor, 2000). De hecho, la suplementación con vitamina E, *in vitro* e *in vivo*, aumenta la capacidad de los linfocitos T CD4⁺ de ratones viejos de formar sinapsis funcionales, hecho que se encuentra disminuido en la vejez, y de la expresión de genes que permiten un mejor funcionamiento de dichas células inmunitarias, muy deterioradas al envejecer (Ahmed et al. 2004; Marko et al., 2007; Pae y Meydani, 2012; Molano y Meydani, 2012). Así, la vitamina E aumenta tanto la capacidad de división de las células T, especialmente las T vírgenes que son las que más se deterioran con el envejecimiento (Meydani et al., 2005), como la producción total de IL-2. En este sentido, la vitamina E afecta tanto al número de células que son capaces de producir la citoquina como a la cantidad de la misma producida por las células

vírgenes (Adolfsson et al., 2001). El efecto diferencial ó selectivo de la vitamina E sobre las células T vírgenes y memoria podría ser debido a la diferente susceptibilidad de éstas células frente al daño inducido por un estrés oxidativo, al cual presentan una mayor resistencia los linfocitos memoria (Lohmiller et al., 1996).

Se han sugerido diversos mecanismos para explicar el efecto inmunoestimulador de la vitamina E durante el envejecimiento. Por un lado, puede ser una acción de forma directa, a través del mantenimiento de la integridad de la membrana y modulando la transducción de señales intracelulares, y por otro lado de forma indirecta mediante la disminución de la producción de factores supresores tales como la PGE₂, producida especialmente por los macrófagos (Beharka et al., 1997; Adolfsson et al., 2001; Meydani et al., 2005) y en mayor medida en el envejecimiento, debido a la mayor actividad de la COX-2 al envejecer (Hayek et al., 1997). Beharka et al. (2002) comprobaron que la vitamina E es capaz de disminuir la actividad COX en macrófagos procedentes de ratones viejos, principalmente a través de una menor formación de peroxinitritos, formados con la interacción de el NO[•] y el O₂^{-•}, los cuales son responsables de la activación de la COX en células inflamatorias (Landino et al., 1996). De este modo, teniendo en cuenta que la PGE₂ inhibe la producción de las citoquinas Th1, como lo es la IL-2, así como la expresión de su receptor (Betz y Fox, 1991; Anastassiou et al., 1992), y aumenta ó no tiene efecto sobre la producción de citoquinas Th2 como son la IL-4, IL-5 e IL-10 (Hilken et al., 1996), esto es, promueve un cambio en el patrón de producción de citoquinas desde Th1 a Th2, la vitamina E tendría el efecto contrario al inhibir al inhibidor. Además, se ha comprobado que esta vitamina disminuye la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en procesos de inflamación aguda (Azzi, 2004; Azzi et al., 2004), pudiendo actuar como anti-inflamatorio (Singh et al., 2005; Jiang, 2014).

1.5.2.3. Los polifenoles y el sistema inmunitario. Cambios con la edad

Los polifenoles, que son los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta, han empezado a estudiarse más recientemente que otros antioxidantes en lo que respecta a los efectos que alimentos ricos en los mismos tienen sobre las funciones del sistema inmunitario. Así, actúan en la diferenciación y activación de los leucocitos, habiéndose propuesto que lo hacen a través de mecanismos epigenéticos (Cuevas et al., 2013) y modulando las Treg (Kim y Lee, 2013). En estudios previos llevado a cabo por nuestro grupo de investigación se comprobó que la ingestión durante un periodo de 5 semanas con cereales ricos en polifenoles mejoró la función y el estado redox de células

inmunitarias peritoneales de ratones adultos (Álvarez et al., 2006a, 2008) y adultos con envejecimiento prematuro (Álvarez et al., 2006b). Si bien existen algunos trabajos que empleando agentes polifenólicos de la dieta comprueban el efecto positivo sobre algunas funciones inmunitarias (Bub et al., 2003) o en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento (Christen, 2000; Defeudis y Drieu, 2000; Youdim y Joseph, 2001), existen pocos estudios que utilicen tales compuestos para prevenir los cambios que se producen en el envejecimiento normal o fisiológico, especialmente a nivel inmunológico. De los numerosos compuestos polifenólicos existentes, se van a comentar a continuación únicamente los que se encuentran en los cereales estudiados en la presente tesis, y se mencionarán sus efectos sobre el sistema inmunitario y en el envejecimiento.

La **catequina** es capaz de inhibir la producción de $TNF\alpha$ en la línea de macrófagos RAW 264.7 activados con LPS/ $IFN\gamma$ (Wang y Mazza, 2002) y en la línea J774.1, así como en los macrófagos peritoneales (Ichikawa et al., 2004). Este antioxidante inhibe la expresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales, disminuyendo la adherencia de los leucocitos circulantes a las paredes de los vasos (Hofbauer et al., 1999; Koga y Meidany, 2001; Melgarejo et al., 2009). También se ha comprobado que un derivado de la catequina (la epigallocatequina-3-galato) puede inhibir la proliferación de linfocitos T de bazo y disminuir la expresión de receptores de IL-2 (Wu et al., 2009), siendo relevante este efecto en los pacientes con cáncer (Saleh et al., 2014). La catequina aumenta *in vitro* la actividad NK (Exon et al., 1998) y su administración *in vivo* (125-500 mg/kg) también lo hace (Exon et al., 1998), dándose este efecto en mejores condiciones en ratones con senescencia acelerada, lo que hace disminuir las metástasis de sus tumores (Shimizu et al., 2010).

La **rutina** disminuye la quimiotaxis e inhibe el estallido respiratorio de neutrófilos estimulados con fMet-Leu-Phe, tanto *in vitro* como *in vivo* (Selloum et al., 2003). Neutraliza de forma eficaz la producción de radicales libres en macrófagos peritoneales de rata y disminuye la formación de TBARS (Afanas'eva et al., 2001). La rutina y sus metabolitos, *in vitro*, tienen un efecto anti-inflamatorio, siendo inhibidores de la producción de NO y de citoquinas proinflamatorias en macrófagos activados con LPS, disminuyendo la activación vía NF- κ B (Shen et al., 2002; Su et al., 2014). Por otra parte, la suplementación de la dieta con una mezcla de rutina y vitaminas C, E, β -caroteno, selenio y zinc reduce la frecuencia de mutaciones en esplenocitos de ratones C57BL/6 (Gaziev et al., 1995,1997). Estos autores observaron, además, que el efecto era mayor en

los ratones viejos que en los jóvenes. Otros investigadores apuntan a un aumento de la supervivencia de ratones C57BL/6 suplementados a los 2 y 9 meses de edad con una mezcla de rutina, vitaminas C, E, β -caroteno, selenio y zinc, con respecto a los controles (Bezlepkin et al., 1996). En ratones viejos, la ingestión de rutina durante 10 días, inhibió la dominancia Th2 de la vejez (Morimoto et al., 2011).

El **ácido ferúlico** es capaz de disminuir la producción de NO por macrófagos de la línea RAW 264.7 activados con LPS (Ogiwara et al., 2002, 2003) e inhibe de forma eficaz la formación de anión superóxido en macrófagos peritoneales de ratón (Kaul y Khanduja, 1999), siendo capaz de proteger a los linfocitos del estrés oxidativo de la radiación (Ma et al., 2011). Este antioxidante disminuye la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, lo que permite una menor adherencia de los leucocitos circulantes (Ma et al., 2010), y estimula la linfoproliferación y la secreción de IFN γ por células mononucleares de sangre periférica (Chiang et al., 2003).

El ácido **p-cumárico** es capaz de estimular la proliferación y la secreción de IFN γ por linfocitos de sangre periférica (Chiang et al., 2003). En el estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación sobre el efecto en diversas funciones inmunitarias de cereales ricos en polifenoles, el ácido cumárico se planteó como un importante candidato en el efecto estimulador de la proliferación de células T y en la producción de IL-2 en leucocitos peritoneales de ratones adultos y con envejecimiento prematuro (Alvarez et al., 2006a,b). Este ácido ha sido propuesto como importante inmunomodulador y anti-inflamatorio en animales con procesos inflamatorios (Pragasam et al., 2013).

Los otros polifenoles han sido menos o nada estudiados en el aspecto que se está considerando. El **ácido vanílico** presenta una actividad inmunomoduladora al estimular la linfoproliferación y la secreción de IFN γ por células mononucleares de sangre periférica (Chiang et al., 2003), y previniendo el daño oxidativo en los linfocitos (Erdem et al., 2012). Su papel anti-inflamatorio parece ejercerlo suprimiendo la activación del NF-kB, lo que se ha comprobado hace en los macrófagos (Kim et al., 2011). El **orizanol** es capaz de estimular la proliferación de linfocitos B y la liberación de citoquinas Th1, como la IL-2, en células de bazo de ratón (Sierra et al., 2005), presentando un importante papel inmunomodulador (Ghatak y Panchal, 2012). El **ácido sinápico**, en forma de derivados ha sido propuesto como importante controlador de la inflamación generada por citoquinas pro-inflamatorias como el TNF α (Zeng et al., 2013).

1.5.2.4. Los antioxidantes sulfurados y el sistema inmunitario. Cambios con la edad

Ya se ha comentado que el glutatión (GSH) es un antioxidante intracelular de vital importancia para la funcionalidad de los leucocitos, y de forma especial para los linfocitos (Dröge et al., 1994; Dröge y Breitkreutz, 2000). La presencia *in vitro* de glutatión estimula una serie de funciones de las células inmunitarias peritoneales de ratones, así como la actividad de sus enzimas antioxidantes, como la catalasa, la glutatión peroxidasa y la reductasa (Pomaki et al., 2005). El papel del glutatión en la apoptosis de los leucocitos ha sido ampliamente estudiado. Así, en monocitos humanos sometidos a apoptosis se disminuyen los niveles de este antioxidante (Ghibelli et al., 1995) y resultados similares se han obtenido en células linfoides (Franco et al., 2007, 2008). Además, los linfocitos T se protegen frente a la apoptosis cuando aumentan sus niveles de glutatión (Hammond et al., 2004; Ballatori et al., 2009), y la presencia *in vitro* de este antioxidante disminuye la incidencia de muerte programada en leucocitos peritoneales de ratón (Pomaki et al., 2005). De hecho, la depleción del GSH supone importantes alteraciones de la homeostasis del sistema inmunitario y del nervioso, teniendo consecuencias en los trastornos neuroinmunitarios (Morris et al., 2014). Al envejecer se pierden niveles de GSH, lo que ha sido observado en numerosas células y tejidos, incluyendo algunos componentes del sistema inmunológico (Arnalich et al., 2001). También, con la edad disminuyen las concentraciones plasmáticas de cisteína. Estos cambios parecen jugar un papel clave en los procesos y enfermedades que limitan la esperanza de vida humana, lo que ha llevado a algunos autores a denominar el envejecimiento como un síndrome de deficiencia en cisteína (Dröge, 2002a,b, 2005; Dröge y Breitkreutz, 2000). Tales cambios en el estado redox se encuentran mediados, al menos en parte, por una baja capacidad para eliminar la cisteína del ambiente oxidativo de la sangre (Dröge, 2002a). En este contexto, la administración exógena de compuestos tiólicos, o que contengan azufre, y que puedan aumentar los niveles de GSH podría tener efectos beneficiosos en la función inmunitaria, especialmente en el envejecimiento. Dado que el glutatión puede tener alguna dificultad para llegar a determinados órganos como el hígado, su administración directa se ha propuesto poco eficaz para aumentar los niveles de tioles intracelulares (Puri y Meister, 1983). Por ello, la ingestión de precursores del glutatión como la N-acetilcisteína (NAC) o la tioprolina (TP) resultan más efectivas para recuperar las reservas de glutatión, hecho que se ha demostrado claramente en el caso de la NAC (De Flora et al., 1991). De hecho, el tratamiento con compuestos tiólicos como los mencionados parecen aumentar la esperanza de vida y retrasar determinados procesos

asociados al envejecimiento en diferentes animales de experimentación (Miquel y Economos, 1979; Martínez Banaclocha et al., 1997; Martínez et al., 1999,2000; Martínez y Martínez, 1999; Martínez, 2000; Navarro et al., 2007).

Como antioxidantes que aumentan los niveles de GSH y que se han estudiado en la presente tesis tenemos: la N-acetil cisteína, la tioprolina y la taurina.

La N-acetilcisteína (NAC)

En cuanto a las acciones a nivel del sistema inmunitario, la NAC modula el funcionamiento del mismo (Marthandan et al., 2013). Este antioxidante incide en la adherencia de las células inmunitarias, habiéndose observado que estimula la de las células NK, con un efecto específico a nivel del citoesqueleto (Ribavene et al., 1995). Así mismo, suprime la expresión constitutiva de CD11a/LFA-1, una integrina implicada en la adhesión leucocitaria, en una línea mieloide (Hashizume et al., 2002). La NAC es considerada un anti-inflamatorio, que inhibe los marcadores inflamatorios circulantes (Purwanto y Prasetyo, 2012) y la producción de citoquinas inflamatorias por células inmunitarias (Steinhauser et al., 1998; Gosset et al., 1999; Palacio et al., 2011). También, disminuye la apoptosis de timocitos inducida por el exceso de ROS (McLaughlin et al., 1996), y la mediada por TNF α en células mononucleares infectadas por VIH, inhibiendo la replicación viral. Este efecto lo lleva a cabo disminuyendo la activación del NF- κ B y la peroxidación lipídica, lo que sugiere el uso de NAC para mejorar la calidad de vida de estos enfermos (Malorni et al., 1993; 1998). La NAC estimula la función de las células T (Eylar et al., 1993), aumenta la proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos, activa la capacidad citotóxica de los leucocitos y la producción de citoquinas de células mononucleares (Roberts et al., 1995; Omara et al., 1997; Viora et al., 2001). En neutrófilos, la NAC disminuye la producción del radical superóxido y favorece la capacidad fagocítica de estas células mejorando su quimiotaxis (Urban et al., 1997). En situaciones de fuerte estrés oxidativo e inflamación como en el shock endotóxico letal, se ha observado que la NAC tiene efecto inmunomodulador asemejando las funciones de los leucocitos peritoneales de ratones con shock a las de animales controles, efecto que se aprecia tanto *in vivo* como *in vitro* y que es mediado controlando la excesiva activación del NF κ B (Víctor y De la Fuente, 2002a; Víctor et al., 2005). Nuestro grupo también ha comprobado que la ingestión de NAC durante un mes mejora el proceso fagocítico de los macrófagos peritoneales murinos procedentes de animales adultos prematuramente envejecidos (Puerto et al., 2002), así como la funcionalidad de otros leucocitos (Puerto et

al., 2002; Guayerbas et al., 2005a). Así mismo, la NAC *in vitro* estimula la movilidad espontánea, la quimiotaxis y la respuesta proliferativa a concanavalina A de los linfocitos de ratones BALB/c, las funciones del proceso fagocítico de macrófagos peritoneales y de linfocitos de ratones adultos (Pomaki et al., 2005) y prematuramente envejecidos (Puerto et al., 2002). En mujeres postmenopáusicas, la ingestión de NAC mejoró toda una serie de funciones y el estado redox de los linfocitos y neutrófilos de sangre periférica (Arranz et al., 2008).

Es evidente que la dosis y el tiempo de ingestión de NAC van a determinar sus efectos en la función inmunitaria. Así, si dosis elevadas de NAC inhiben la expresión de citoquinas proinflamatorias en macrófagos activados, cantidades bajas administradas durante un largo tiempo, aumentan la expresión de estas citoquinas (Ohnishi et al., 2014).

La tioprolina (TP)

La TP, como ya se ha comentado, puede ser una fuente de L-cisteína en la célula (Wlodek et al., 1993) lo que, dado el papel modulador de este aminoácido y de su capacidad de generar glutatión, puede explicar los efectos inmunitarios de la TP (Wlodek et al., 1995). No obstante, los efectos de TP en las células inmunitarias han sido escasamente estudiados. Se sabe que otro derivado tiazolidínico, el ácido 2-metil-tiazolidín-2,4,-dicarboxílico, aumenta la proliferación de una línea celular de linfocitos T dependiente de IL-2 (Wlodek et al., 1995). En estudios previos de nuestro grupo de investigación se ha comprobado que la suplementación de la dieta con TP mejora las funciones del proceso fagocítico de macrófagos peritoneales murinos procedentes de ratones con envejecimiento prematuro (Correa et al., 1999a), así como las de leucocitos de ratones viejos (De la Fuente et al., 1993). La TP *in vitro* estimula varias funciones de macrófagos y linfocitos de ratón (Correa et al., 1999b), así como la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión reductasa y la peroxidasa, además de disminuir la muerte programada de leucocitos peritoneales de ratón (Pomaki et al., 2005).

La taurina (TAU)

La TAU puede aparecer en altas concentraciones en las células del sistema inmunitario sometidas a un elevado estrés oxidativo (Balkan et al., 2001; Dawson et al., 2002). Así, es abundante en células fagocíticas como neutrófilos a los cuales protege frente a la citotoxicidad causada por la elevada producción de ROS (Kim y Cha, 2009).

Por ello, este antioxidante es muy importante en los polimorfonucleares durante el proceso séptico (Ekremoglu et al., 2007), siendo relevante en la magnitud y calidad de la respuesta inmunitaria que lleven a cabo estas células (Mühling et al., 2008). De hecho, la TAU mejora *in vitro* la capacidad fagocítica de neutrófilos (Farriol et al., 2002). Además, su papel anti-inflamatorio se manifiesta al promocionar el fenotipo de macrófagos M2 en el tejido adiposo (Lin et al., 2013), y el derivado de TAU, la cloramina (TAUCI), producido por el sistema mieloperoxidasa en neutrófilos activados, es un excelente citoprotector frente al daño inflamatorio tisular, activando la expresión de enzimas antioxidantes (Kang y Kim, 2013). Los efectos de TAU en linfocitos han sido escasamente estudiados, aunque se ha propuesto este antioxidante como un claro regulador de la respuesta de células T (Bachmann, 2012). Se ha comprobado que protege a estas células frente al daño al ADN (Ergun et al., 2006) y puede atenuar la apoptosis de los linfocitos T inducida vía CD3/IL-2 (Maher et al., 2005), así como estimular la proliferación y la secreción de citoquinas (Fazzino et al., 2010). Se ha comprobado, tanto en roedores como en humanos, el papel modulador que ejerce en los leucocitos, mostrando una regulación a la baja en la producción de mediadores pro-inflamatorios al inhibir la activación del NFκB (Schuller-Levis y Park, 2004). Aunque con la edad se va perdiendo la capacidad de sintetizar este aminoácido (Huxtable, 1992), apenas se tienen datos sobre su papel en las células inmunitarias al envejecer.

1.5.2.4. La combinación de antioxidantes y el sistema inmunitario. Cambios con la edad

Se había indicado que la ingestión regular de mezcla de antioxidantes permitía una disminución del estrés oxidativo en personas sanas (Actis-Goretta et al., 2004), y varios estudios han demostrado también la importancia que tiene, para mejorar la función inmunitaria, la ingestión de dietas o suplementos con más de un antioxidante (Chandra, 2004; Alvarado et al., 2005a,b; 2006a,b). Así, la combinación de vitamina C y E ha resultado ser eficaz para disminuir la prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer, lo que no se consiguió cuando ambas vitaminas se tomaban de forma aislada (Zandi et al., 2004). De hecho, la combinación de antioxidantes en pequeñas cantidades, como las que se encuentran en los alimentos naturales, han mostrado mayores beneficios para la salud que la suplementación con grandes cantidades de un solo antioxidante (McDonald et al., 2005; Menon et al., 2010), y esto ha sido también comprobado en el sistema inmunitario (Alvarado, 2006; Alvarado et al., 2006a,b; Alvarez et al., 2006a,b), especialmente en condiciones de inmunosupresión (Vetvicka y Vetvickova, 2012).

B. PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS REALIZADOS Y JUSTIFICACIÓN DE SU UNIDAD TEMÁTICA

El efecto de los antioxidantes en la funcionalidad de los diferentes tipos de células inmunitarias es un tema que no ha sido totalmente resuelto todavía y que puede generar importantes controversias. Aunque se han llevado a cabo muchos estudios en este contexto, como los recogidos en el apartado anterior de esta “Introducción General”, existen aún muchas cuestiones no claramente contestadas. Para dar respuesta a algunas de estas preguntas, se estructuraron los trabajos que constituyen la presente tesis doctoral.

Parece relevante conocer los efectos que de forma directa tengan una serie de antioxidantes, en un rango de concentraciones, en la funcionalidad de macrófagos, linfocitos y células NK. Para ello, se diseñaron una serie de trabajos en los que se analizaron tales efectos, *in vitro*, en esas células inmunitarias obtenidas de animales de experimentación (ratones). Además, se quiso comprobar si tales efectos eran diferentes dependiendo la edad del animal del que se obtenían dichas células. Los estudios se han centrado en los efectos del ácido ascórbico, la vitamina E, el glutatión y otros antioxidantes sulfurados como la taurina, la tioprolina y la N-acetilcisteína, haciendo mayor hincapié en estos últimos que eran los menos conocidos en este contexto. De este modo se llevaron a cabo los experimentos que constituyen los artículos 1, 2, 3, 4 y 5 de la presente tesis y que se recogen en el anexo.

Si conocer la acción directa de un compuesto antioxidante en la capacidad funcional de las células inmunitarias es importante, también lo es el comprobar el efecto que la ingestión de ese antioxidante pueda llegar a tener en dicha funcionalidad. Para ello, se llevaron a cabo una serie de trabajos en los que una serie de dietas, a las que se incorporaron diferentes antioxidantes, fueron suministradas a animales de experimentación y, en el caso del ser humano, los antioxidantes se administraron como suplementos. Estos trabajos han sido recogidos en los artículos del 6 al 15 de la presente tesis, los cuales se encuentran en el anexo. En primer lugar se quiso conocer, en animales adultos (cobayas), si la funcionalidad de las células inmunitarias variaba dependiendo de la cantidad administrada en la dieta, durante 5 semanas, de un antioxidante, como la vitamina E (artículo 6). También, en base a resultados previos en los que la ingestión de tioprolina por ratones mejoraba la funcionalidad de linfocitos de ratones (De la Fuente et al., 1993), se quiso comprobar si en animales adultos las funciones más representativas de las células fagocíticas (los macrófagos peritoneales) podrían mejorarse tras la

administración conjunta en la dieta de dos antioxidantes sulfurados como la N-acetilcisteína y la tioprolina, a una concentración de 0,1 %p/p, durante 5 semanas, y si había variaciones en la respuesta dependiendo de la cepa de ratones utilizada (Swiss y BALB/c) (artículo 7). Como al envejecer tiene lugar un estrés oxidativo, y el mismo es decisivo en la funcionalidad de las células inmunitarias, se planteó un experimento para conocer si la administración, durante 4 semanas, de dietas suplementadas con N-acetilcisteína y tioprolina en la proporción previamente analizada (0,1% p/p) y en otra más elevada (0,3% p/p), podría tener efectos diferentes en la funcionalidad de las células inmunitarias (macrófagos y linfocitos) según fueran procedentes de ratones Swiss adultos o viejos (artículo 8). Dado que en un estudio previo se había comprobado que en ratones Swiss viejos, la administración sólo de tioprolina (0,07% p/p) durante 36 semanas había mejorado la capacidad de movilidad y proliferación de los linfocitos (De la Fuente et al., 1993), pero no se conocía si podría hacerlo, en esas funciones y en otras relevantes de las células inmunitarias, cuando fuese administrada en un periodo más corto, de 5 semanas, se procedió a llevar a cabo la experimentación correspondiente en ratones Swiss (artículo 9).

En el contexto de la comunicación neuroinmunitaria se quiso comprobar si habría una relación entre la capacidad exploratoria (prueba conductual reflejo del funcionamiento del sistema nervioso) y la función inmunitaria, en ratones. En un estudio previo (De Juan, 1994) se había comprobado que los ratones de la cepa Swiss que realizaban la exploración de un laberinto en forma de T de manera lenta, tenían una longevidad menor que los de su misma edad que lo hacían más rápido. Se diseñó un experimento para poder detectar si ratones Swiss viejos que llevaban a cabo de forma “lenta” la exploración del laberinto en T tenían una funcionalidad de sus macrófagos (peritoneales) y de sus linfocitos (de ganglios axilares, bazo y timo) más deteriorada que la de aquellos, de la misma edad cronológica, que llevaban a cabo la exploración de forma “rápida” (artículo 10). Dado que trabajos posteriores confirmaron que los ratones “lentos” en la exploración del laberinto en T, a cualquier edad cronológica, mostraban una inmunosenescencia prematura, así como un sistema nervioso y un sistema endocrino más envejecido, y siempre tenían menor esperanza de vida que sus compañeros de igual edad y sexo que realizaban de forma “rápida” la exploración, se denominó a tales animales “lentos” como PAM (*prematurely aging mice*, ratones prematuramente envejecidos) y a los otros como NPAM (*nonprematurely aging mice*, ratones no prematuramente envejecidos) (Viveros et al., 2001; Guayerbas et al., 2002a,c; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Guayerbas, 2003; De la Fuente et al., 2003; Vida y De la Fuente, 2013). En este

modelo de PAM se comprobó el efecto beneficioso de la ingestión, durante 5 semanas, de una dieta suplementada con 0,1% p/p de los antioxidantes N-acetilcisteína y tioprolina, en la capacidad funcional de linfocitos de ratones Swiss y BALB/c, cronológicamente adultos (Guayerbas et al., 2002b). Puesto que no se sabía si se podría obtener también un efecto beneficioso en la funcionalidad de los linfocitos, con esa misma dieta (con las mismas cantidades de dichos antioxidantes y el mismo tiempo de ingestión) en esas dos cepas de ratones, pero siendo los animales cronológicamente viejos, se diseñó un experimento en este sentido. Además, se incorporó un grupo de ratones adultos de ambas cepas para poder comprobar si la mejoría en la funcionalidad linfoide conseguía igualar o acercar los valores de los animales viejos a los de los adultos (artículo 11).

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta y de forma más reciente que en el caso de otros antioxidantes se empezaron a estudiar en relación a sus efectos sobre las funciones del sistema inmunitario, comprobándose que los mismos son, en general, muy beneficiosos (Bub et al., 2003). En estudios previos llevado a cabo por nuestro grupo de investigación se había demostrado que la ingestión durante un periodo de 5 semanas con cereales ricos en polifenoles mejoraba la función y el estado redox de leucocitos peritoneales de ratones adultos (Álvarez et al., 2006a, 2008) y adultos con envejecimiento prematuro (Álvarez et al., 2006b), pero se desconocía si tal mejoría podría hacerse en animales maduros y viejos. Se diseñó un experimento para comprobar si la ingestión de una serie de galletas conteniendo diferentes fracciones de cereales ricos en diversos polifenoles (catequina, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido sinápico, ácido ferúlico, rutina y orizanol), durante 15 y 30 semanas por ratones ICR-CD1 (los anteriormente denominados Swiss) maduros y viejos, respectivamente, podría tener un efecto positivo en toda una serie de funciones, que se deterioran al envejecer, de macrofagos y linfocitos (artículo 12).

Sabiendo que la ingestión de dietas suplementadas con antioxidantes mejoran la función de las células inmunitarias en animales de experimentación, especialmente en la vejez, se hacía evidente el analizar si tal efecto podría tener lugar en el ser humano. Conocidos los efectos beneficiosos de antioxidantes como la vitamina C (Jariwalla y Harakeh, 1996) y la vitamina E (Beharka et al., 1997) en la funcionalidad de las células inmunitarias, se diseñó un trabajo para analizar si en mujeres mayores (72 ± 6 años de edad), tanto sanas como con dos enfermedades frecuentemente asociadas a la edad, como son la depresión y la enfermedad coronaria, la ingestión durante 16 semanas de 1000mg de vitamina C y 200 mg de vitamina E diarios, podría mejorar la función de sus células

inmunitarias, obtenidas de sangre periférica. También, se quiso comprobar el efecto de esta suplementación en los niveles de séricos de malondialdehído (como marcador de peroxidación lipídica) y de cortisol (marcador de estrés emocional). El estudio se recoge en el artículo 13. Ante los resultados obtenidos en este estudio, se diseñó otro en el que se quiso comprobar si la ingestión de un suplemento de 200 mg/día de solo vitamina E durante 3 meses podría mejorar la funcionalidad de las células inmunitarias no solo de mujeres, también de hombres mayores ($70,4 \pm 5,1$ años de edad). Además, para comprobar hasta qué nivel los efectos de tal suplementación podrían ser beneficiosos, se incorporó un grupo de hombres y mujeres adultos ($29,7 \pm 4,9$ años de edad) con los que comparar los valores obtenidos, tras la suplementación, en cada una de las funciones analizadas de fagocitos (neutrófilos) y linfocitos. Se quiso conocer también si tras 6 meses sin suplementación los efectos de la misma se mantenían o ya habían desaparecido. Este estudio se recoge en el artículo 14. Por último, se planteó la comprobación del efecto de una suplementación sólo con vitamina C (500 mg/día) durante 3 meses en hombres y mujeres de 74 ± 4 años de edad, así como la conjunta de vitamina C (500 mg) y vitamina E (200 mg) durante el mismo periodo. El grupo de adultos (35 ± 5 años) que se incorporó, permitía comprobar hasta qué grado las suplementaciones “rejuvenecían” los parámetros inmunitarios analizados. También se incluyeron las valoraciones tras 6 meses sin suplementación para detectar si los efectos se mantenían o no, transcurrido ese tiempo. Este trabajo constituye el artículo 15 de la presente tesis.

En el anexo se han incluido una serie de artículos de revisión, algunos de ellos, al contener datos experimentales han sido considerados también en la relación ya comentada, es el caso del artículo 4 y del artículo 11. En estas revisiones se recogen ideas generales que sobre el tema de la presente tesis se han ido obteniendo de los experimentos antes indicados y de otros que han formado parte de diversas tesis del grupo de investigación de “Envejecimiento, Neuroinmunología y Nutrición” de la Universidad Complutense de Madrid.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas”.

Albert Einstein (1879-1955). Físico de origen alemán.

“Daría todo lo que sé por la mitad de lo que ignoro”.

René Descartes (1596-1650). Filósofo y matemático francés.

2. 1. HIPÓTESIS

Dada la producción de ROS que generan las células inmunitarias en su habitual funcionamiento de defensa frente a infecciones y cánceres, lo que representa un consumo de los antioxidantes endógenos de que disponen, la administración de antioxidantes exógenos, en cantidades apropiadas, debe mejorar la función de las células inmunitarias en cualquier edad, pero especialmente en individuos viejos, en los cuales tiene lugar una inmunosenescencia y un estrés oxidativo.

2.2. OBJETIVOS

Para demostrar la hipótesis indicada se han establecido una serie de objetivos. Los objetivos generales planteados en la presente tesis han sido:

1º Objetivo: Estudiar el efecto *in vitro* de varios antioxidantes en la modulación de la función de las células inmunitarias. Cambios con la edad.

Este objetivo se ha desarrollado en los siguientes sub-objetivos que se enuncian como preguntas:

- 1.1. ¿La capacidad funcional de los fagocitos (macrófagos) de animales adultos, puede modificarse por la presencia *in vitro* de varios antioxidantes?
- 1.2. ¿La capacidad funcional de las células linfoides de animales adultos puede ser modificada por la presencia *in vitro* de varios antioxidantes sulfurados?
- 1.3. ¿Puede haber cambios en las funciones de macrófagos y linfocitos de animales viejos por la presencia *in vitro* de antioxidantes tiólicos?
- 1.4. ¿La actividad citotóxica antitumoral “*natural killer*” (NK) de los leucocitos puede ser modificada por la presencia *in vitro* de varios antioxidantes?, ¿puede haber diferencias por la edad de los animales de los que se obtienen las células?

2º Objetivo: Estudiar el efecto de antioxidantes, administrados en la dieta o como suplementos, en la modulación de la función inmunitaria en la edad adulta y en la vejez de animales de experimentación y en el ser humano.

Este objetivo se ha desarrollado en los siguientes sub-objetivos:

2.1. ¿La ingestión de antioxidantes en la dieta puede modificar la funcionalidad de las células inmunitarias en la edad adulta?

Este sub-objetivo se ha dividido en otros dos más concretos.

2.1.1. ¿Es relevante la cantidad, baja o alta, de un antioxidante, como la vitamina E, que se administra en la dieta, sobre la funcionalidad de células inmunitarias de animales adultos?

2.1.2. ¿La administración en la dieta de dos antioxidantes sulfurados que aportan glutatión como la N-acetilcisteína (NAC) y la tioprolina (TP), puede estimular la funcionalidad de los macrófagos peritoneales de ratones adultos?. ¿Puede haber diferencias por la cepa de ratones utilizada?

2.2. ¿La ingestión de antioxidantes en la dieta, o como suplementos, puede modificar la funcionalidad de las células inmunitarias en la vejez?

Este objetivo se ha dividido en otros más concretos que se indican seguidamente:

A. Estudios en animales de experimentación

2.2.1. ¿La cantidad de antioxidante que hay que incorporar a la dieta para restaurar la función inmunitaria en la vejez de los animales de experimentación es similar a la requerida para mejorarla en la edad adulta o sería necesario una cantidad mayor dado el deterioro funcional que se experimenta al envejecer?

2.2.2. ¿Suplementar la dieta con un antioxidante como la tioprolina puede en animales cronológicamente viejos evitar el deterioro funcional de las células inmunitarias?

2.2.3. ¿Podría darse una relación entre actividad exploratoria y función inmunitaria en ratones viejos que permitiera el establecimiento de un modelo de inmunosenescencia prematura y consecuentemente de mayor senescencia, que posibilite el estudio del efecto de dietas suplementadas con antioxidantes en la función inmunitaria y en la longevidad?

2.2.4. ¿La ingestión de una dieta suplementada con NAC +TP podría ser efectiva en ratones viejos con envejecimiento prematuro?

2.2.5. ¿La ingestión, durante largos periodos, de 15 y 30 semanas, de dietas enriquecidas con antioxidantes nutricionales de tipo polifenólico podría mejorar la función inmunitaria en ratones maduros y viejos?.

B. Estudios en el ser humano

2.2.6. ¿La función inmunitaria podría mejorarse en mujeres septuagenarias tras tomar durante 4 meses un suplemento de vitamina C (1000 mg/día) y vitamina E (200 mg/día)?, ¿haría más efecto si las mujeres presentaran alguna patología?.

2.2.7. ¿La ingestión durante 3 meses de un suplemento de vitamina E (200 mg/día), de vitamina C (500 mg/día) o de vitamina C (500 mg/día) conjuntamente con vitamina E (200 mg/día) podría mejorar la función inmunitaria en hombres y en mujeres septuagenarios?, ¿se asemejarán los valores de tales funciones tras la suplementación a los de personas cronológicamente adultas?.





3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“La ciencia es respecto del alma lo que es la luz respecto a los ojos, y si las raíces son amargas, los frutos son muy dulces”.

“Lo que se debe aprender a hacer, se aprende haciéndolo”.

Aristóteles (384-322 a C). Filósofo y científico griego.

“La teoría es algo bueno, pero un buen experimento queda para siempre”.

Piotr Leonidovich Kapitsa (1894-1984). Físico soviético. Premio Nobel en 1978.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRESPONDIENTES A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS Y RECOGIDOS EN LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS

3.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRESPONDIENTES AL PRIMERO GRAN OBJETIVO: Estudiar el efecto *in vitro* de varios antioxidantes en la modulación de la función de las células inmunitarias. Cambios con la edad

Este objetivo se ha desarrollado en los siguientes objetivos concretos:

3.1.1. ¿La capacidad funcional de los fagocitos (macrófagos) de animales adultos, puede modificarse por la presencia *in vitro* de varios antioxidantes?

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 1.

3.1.2. ¿La capacidad funcional de las células linfoides de animales adultos puede ser modificada por la presencia *in vitro* de varios antioxidantes sulfurados?.

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 2

3.1.3. ¿Puede haber cambios en las funciones de macrófagos y linfocitos de animales viejos por la presencia *in vitro* de antioxidante tiólicos?

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 3 y en el ARTÍCULO 4 (REVISIÓN 5).

3.1.4. ¿La actividad citotóxica antitumoral “*natural killer*” (NK) de los leucocitos puede ser modificada por la presencia *in vitro* de varios antioxidantes?, ¿puede haber diferencias por la edad de los animales de los que se obtienen las células?

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 5.

Los antioxidantes que se han estudiado *in vitro* en la presente tesis han sido fundamentalmente aquellos que tienen la molécula de azufre, tanto tiólicos como el glutatión (GSH) y la n-acetilcisteína (NAC), como los capaces de aportar el grupo tiol como la tioprolina (TP) y la taurina (TAU). De ellos, los más estudiados han sido los tres primeros. También se han analizado los efectos que producen otros antioxidantes como el ácido ascórbico (AA) y la vitamina E (VE). Las células se han obtenido de ratones, fundamentalmente de la cepa BALB/c, pero también se han utilizado los Swiss. Las concentraciones de los distintos antioxidantes han variado dependiendo el experimento, pero se han encontrado en los siguientes rangos: de 0,005 mM a 0,01 mM para VE y a 1

mM para AA. De 0,5 a 5 mM para GSH, de 0,001 a 2,5 mM para NAC y de 0,1 a 1 mM para TP. En el caso de TAU de 4 a 40 mM.

3.1.1. Efecto de los antioxidantes en la funcionalidad de macrófagos de ratones adultos

En macrófagos obtenidos de ratones adultos (17 ± 3 semanas de edad) de la cepa BALB/c se ha podido comprobar como, en general, los antioxidantes (AA, VE, GSH, NAC y TP) estimulan las funciones más características de tales células. Los macrófagos estudiados son procedentes del peritoneo, una localización en la que nuestro grupo de investigación tiene una dilatada experiencia y en la que se llevó a cabo el primer estudio en España sobre los cambios de estas células con el envejecimiento (De la Fuente, 1985). En esta localización se estandarizaron toda una serie de técnicas que permitían estudiar cada una de las etapas del proceso fagocítico que realizan estas células inmunitarias (De la Fuente, 1985; 1989). Los macrófagos en primer lugar se adhieren a los tejidos en los que se encuentran, para posteriormente moverse, lo que realizan tanto de forma espontánea como, fundamentalmente, de forma dirigida por el gradiente químico que se crea desde el foco infeccioso y que les permite acercarse al mismo, es la propiedad denominada quimiotaxis. Una vez que estas células llegan al foco infeccioso y contactan con los agentes extraños se unen a ellos y los fagocitan, incluyéndolos en vacuolas, fagosomas, iniciándose la etapa de destrucción de tales agentes. En este paso del proceso se dan una serie de mecanismos, los más relevantes conllevan el aumento del consumo de oxígeno, la activación de una enzima, la NADPH oxidasa, y la consecuente producción de radicales libres, el primero de los cuales es el anión superóxido (O_2^-), que posteriormente dará otros radicales y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 14). Estos radicales permitirán destruir los microorganismos fagocitados, para la posterior presentación de los “determinantes antigénicos” a los linfocitos T, que de esta forma pueden reconocerlos.

El efecto de los antioxidantes *in vitro* en estas funciones de macrófagos (**Artículo 1**) sugiere que las estimulaciones que se habían descrito en algunas de estas funciones tras la ingestión de dietas suplementadas con antioxidantes como vitamina E (Moriguchi et al, 1990), y que posteriormente se han ratificado en otros trabajos con vitamina E, ácido ascórbico y antioxidantes aportadores de glutatión (Puerto et al., 2002; Guayerbas et al., 2002b, 2005a,b; Alvarado et al., 2006a,b; Arranz et al., 2008; De la Fuente et al., 2011) y en los llevados a cabo en la presente tesis, se deben a un efecto directo de los mismos.

Durante el proceso fagocítico, como se ha mencionado, tiene lugar una activación del metabolismo oxidativo y una producción de radicales libres de oxígeno (Laurent et al., 1991), lo que supone un consumo de las defensas endógenas de antioxidantes, lo que se ha demostrado sucede con el ácido ascórbico (AA) (Hernanz et al., 1990). De hecho, los macrófagos peritoneales captan el ácido ascórbico a concentraciones milimolares para favorecer su capacidad funcional (May et al., 2005). Este antioxidante, capaz de retenerse en los leucocitos mononucleares en esas elevadas concentraciones de rango milimolar (Bergsten et al., 1990), es consumido rápidamente cuando los fagocitos son activados y necesitan protegerse de los radicales libres que producen (Frei, 1991). Esto explica que la concentración mayor que se ha estudiado de AA en el presente trabajo, la de 1 mM sea la más efectiva. En otros estudios también se han encontrado efectos similares *in vitro* con concentraciones milimolares (Dallegrì et al., 1980; Victor et al., 2000; May et al., 2005). En el caso de la vitamina E (VE), dado su carácter liposoluble, la concentración mayor que se pudo disolver adecuadamente, para llevar a cabo el estudio en condiciones correctas, fue la de 0,01 mM, por ello se analizó esta concentración y otra que suponía la mitad de la misma (0,005 mM). Los efectos son igualmente significativos con las dos concentraciones estudiadas, sin diferencias entre ellas. En los antioxidantes tiólicos como la N-acetilcisteína (NAC) y la tioprolina (TP), la concentración máxima utilizada, la de 1 mM, fue la más efectiva, al menos para la quimiotaxis y fagocitosis. En el caso del glutatión (GSH) se requirieron concentraciones mayores (2,5 y 5mM) para obtener un efecto máximo en la quimiotaxis, pero es la de 2,5 mM la de mejor efecto en la fagocitosis y en los niveles de anión superóxido estimulado. De hecho, el GSH, un antioxidante que se requiere en cantidades adecuadas para una respuesta inmunitaria óptima (Dröge y Breikreuz, 2000), se ha comprobado que, cuando es administrado tanto *in vivo* como *in vitro*, mejora la capacidad fagocítica de macrófagos en condiciones de estrés oxidativo a través de la modulación de las NADPH oxidasas (Nox) (Yeligar et al., 2014).

La primera etapa en el proceso fagocítico, como ya se ha mencionado, es la **adherencia** de las células a los tejidos. De los antioxidantes estudiados en este experimento, el AA y la VE estimulan la capacidad de adherencia a sustrato inerte, al menos en tiempos cortos de incubación de 10 y 20 minutos. Hay otros trabajos que coinciden en observar un aumento de esta función en fagocitos por presencia del AA (Thorner et al., 1983; Victor et al., 2000), pero también los hay que observan una disminución (Jonas et al., 1993). Una estimulación de la adherencia hay que verla con precaución, pues no necesariamente tiene que significar un efecto favorable, a no ser que

también se estimulen las siguientes etapas del proceso fagocítico. Un aumento de la adherencia a los tejidos si va seguido de una menor movilidad supone una peor eficacia de las células para realizar su función, pues no llegarían eficazmente al foco infeccioso. Así, hemos comprobado que determinados compuestos que han resultado ser inhibidores de la funcionalidad de los fagocitos, estimulan la adherencia de los mismos (De la Fuente et al., 1995). Los resultados que hemos obtenido demuestran que el AA y la VE aumentan la adherencia, pero también las otras funciones estudiadas del proceso fagocítico. En el caso de los antioxidantes tiólicos analizados en el presente trabajo no mostraron ningún efecto en la capacidad de adherencia.

La **movilidad**, tanto la que realizan de forma espontánea como la dirigida (quimiotaxis), que tienen los macrófagos peritoneales aparece estimulada por la presencia de todos los antioxidantes estudiados. Estos resultados coinciden con la idea de que una suplementación o pérdida de antioxidantes están relacionadas con una estimulación o disminución de la capacidad de quimiotaxis, respectivamente (Bendich, 1989, Johnston et al., 1992; Ball et al., 1996). Una adecuada capacidad de movilidad permite a los fagocitos alcanzar el foco infeccioso en el que llevar a cabo la ingestión del material extraño, y de hecho, los antioxidantes estudiados también aumentan la capacidad de **fagocitosis** de partículas inertes de los macrófagos peritoneales. Dado que se ha comprobado que los macrófagos peritoneales consumen sus antioxidantes endógenos al fagocitar (Hernanz et al., 1990), esto podría explicar el hecho de que la incorporación de antioxidantes *in vitro* estimule esta función en células de animales adultos, como se ha comprobado en la presente tesis y en otros estudios (Pomaki et al., 2005; Victor et al., 2000; Victor y De la Fuente, 2002). De forma similar, ese hecho explicaría los efectos estimuladores encontrados en las funciones de los leucocitos de animales adultos por la presencia de los antioxidantes, dado que en las células de adultos, en principio, se debe dar un adecuado balance redox. Este apropiado balance parece conseguirse con concentraciones adecuadas de los antioxidantes, pues muy bajas o muy elevadas no parecen mostrar un efecto tan positivo. Así, 1 mM de NAC y TP, y 2,5 mM de GSH, resultaron las concentraciones más efectivas en la fagocitosis, lo que coincide con los resultados obtenidos en otros trabajos en los que 5 mM de esos antioxidantes no tuvieron efecto en la fagocitosis de macrófagos (Pomaki et al., 2005). Por otra parte hay que tener en cuenta que la presencia de un tipo de antioxidante puede favorecer los niveles de otro. Así, se ha comprobado que el AA es capaz de potenciar la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales aumentando sus niveles de GSH (Agarwal et al., 2003). Esto podría explicar el hecho de que en

macrófagos peritoneales una concentración de 1 mM de AA sea mas efectiva que una superior de 2,5 mM (Victor et al., 2000).

El siguiente paso en el proceso fagocítico es la activación de la maquinaria que permite la **digestión** o destrucción del material ingerido, para ello uno de los mecanismos más efectivos es la producción de radicales libres y ROS. El primer radical formado, el anión superóxido, puede medirse mediante la capacidad de reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT), en base a la reacción equimolecular que sucede entre el anión superóxido y el NBT (Bagasra et al., 1988). Los antioxidantes estudiados aumentan los niveles de anión superóxido, lo que demuestra que su capacidad de neutralización de los oxidantes no interfiere con una mayor estimulación de la maquinaria de generación de este radical libre. En el caso de los niveles de anión superóxido en presencia de partículas de latex, todos los antioxidantes los aumentan, lo que supone una mejor capacidad digestiva de los macrófagos en presencia de las concentraciones utilizadas de los antioxidantes estudiados. De hecho se ha comprobado que el GSH es un antioxidante que estimula el estallido respiratorio de los neutrófilos (Atalay et al., 1996), y que el AA puede neutralizar eficientemente oxidantes extracelulares derivados de células fagocíticas y no afectar a los oxidantes intracelulares que se generan en el fagosoma (Anderson, y Luckey, 1987; Jariwalla y Harakeh, 1996). El aumento que los antioxidantes estudiados producen en los niveles de anión superóxido en condiciones basales, sin estímulo fagocítico, podría indicar una activación de la reacción implicada en la generación de este radical libre. Así, tanto una mayor actividad de la NADPH oxidasa como una mayor cantidad de los substratos de la reacción, como es el caso del NADPH, podría explicar la presencia de una mayor cantidad del producto de dicha reacción, el anión superóxido. De hecho se ha comprobado que el AA estimula la vía de las hexosas fosfatos en los neutrófilos, lo que conduce a una mayor síntesis de NADPH y un aumento de la reducción del NBT (Anderson, 1979). Este hecho explicaría los elevados niveles de anión superóxido detectados en situación basal en presencia de la concentración más elevada de AA utilizada (1mM). Resultados similares se han encontrado en otros trabajos en los que la mayor estimulación en los niveles de anión superóxido se consiguieron con la concentración de 2,5 mM de AA (Victor et al., 2000). En esta vía no parece actuar la VE, dado que los macrófagos no manifiestan ningún cambio en el anión superóxido en condiciones de no estimulación por presencia de este antioxidante. También hay que tener en cuenta que, en condiciones apropiadas, el anión superóxido puede ser generado de la eliminación de radicales por antioxidantes tiólicos como el GSH. Esto tiene lugar en concentraciones y características de pH y PO₂ que son normalmente encontradas

intracelularmente. Así, el anión superóxido podría actuar como un radical “sumidero”, siendo eliminado posteriormente por la SOD (Winterbourn, 1993) y la CAT. De hecho, la CAT estimula su actividad en los macrófagos peritoneales tras ser incubados con 0,5 y 1 mM de GSH, NAC y TP (Pomaki et al., 2005). No obstante, es posible que otros mecanismos también se encuentren implicados en estos efectos de los antioxidantes, como su capacidad de incidir en vías de señalización intracelular (Meydani et al., 1995).

3.1.2. Efecto de los antioxidantes en la funcionalidad de linfocitos de ratones adultos

Los linfocitos median toda una serie de funciones, pero estas células principales de la respuesta inmunitaria también se adhieren a los tejidos para posteriormente migrar al sitio de reconocimiento antigénico. Estas dos funciones son compartidas por fagocitos y linfocitos. Una de las funciones más destacadas de los linfocitos es su proliferación o expansión clonal en respuesta a un antígeno (De la Fuente, 2009b). En la presente tesis se ha estudiado el efecto *in vitro*, sobre esas funciones de linfocitos, de unos antioxidantes que contienen azufre, tanto los de tipo tiólico como aquellos que pueden aportar estos grupos químicos (**Artículo 2**). Así, se analizó el efecto de 0,5, 2,5 y 5 mM de glutatión (GSH), 0,1, 0,5 y 1 mM de tioprolina (TP) y N-acetilcisteína (NAC) y 4, 20 y 40 mM de taurina (TAU) en la **capacidad proliferativa** espontánea y en respuesta al mitógeno ConA de linfocitos de ganglios axilares, bazo y timo de ratones BALB/c adultos (17±3 semanas de edad). En general, los antioxidantes estudiados estimulan la proliferación espontánea, con menor efecto en timo, y también la llevada a cabo en respuesta a ConA, siendo las concentraciones más elevadas de los distintos antioxidantes las que tienen más efecto, y las células del bazo en donde las diferencias son más altamente significativas. Varios compuestos antioxidantes han demostrado tener capacidad de aumentar la proliferación de diversos tipos de células. El aumento o no de la capacidad proliferativa depende de la cantidad de oxidantes que tenga la célula, los cuales son necesarios para esta función (Oberley et al., 1981; Davies, 1999). Así, bajos niveles de ROS inducen respuesta mitogénica y estimulación del crecimiento celular, mientras que un aumento en las concentraciones de oxidantes causa una detención de dicha proliferación (Davies, 1999). De hecho, aunque la proliferación de los linfocitos necesita ciertos niveles de ROS, y también son necesarios, en bajas cantidades, en el ambiente de las células que proliferan para una correcta señal mitogénica que estimule la proliferación (Pani et al., 2000a,b), cuando las concentraciones de ROS son altas se produce apoptosis (Davies, 1999; Hildeman, 2004). Todos estos resultados desarrollaron la idea de la existencia de

un ciclo redox en la proliferación celular, en el que los cambios en ROS podrían determinar la progresión o parada de la proliferación (Menon y Goswami, 2007). Así, mientras la célula va pasando del estado proliferativo al diferenciado y la apoptosis, se va dando una progresión en el estado redox del ambiente celular de más reducido a más oxidado (Shafer y Buettner, 2001). Los antioxidantes estudiados estarían promoviendo un estado más reducido que favorecería la proliferación. De todos los antioxidantes estudiados en la presente tesis, el GSH es el que más se ha relacionado con la síntesis de ADN, especialmente en las células T (Suthanthiran et al., 1990), y de hecho, es el antioxidante más conocido en lo que respecta a su papel en la proliferación de los linfocitos (Smyth, 1991; Pieri et al., 1992). Esto podría explicar el mayor efecto encontrado con el GSH en la proliferación linfoide en el presente trabajo. El siguiente antioxidante en mostrar un mayor efecto en la proliferación es la NAC, la cual no es sólo un precursor de GSH, también es capaz de reemplazar sus niveles (De Flora, 1991). Así, se ha comprobado que la suplementación con NAC aumenta los niveles intracelulares de GSH y la proliferación de linfocitos de sangre periférica de mujeres postmenopáusicas (Arranz et al., 2008). También se ha comprobado que la NAC induce *in vitro* una regulación a la alta de la respuesta proliferativa a mitógenos de linfocitos humanos (Viora et al., 2001). En otros estudios previos se observó que la TP *in vitro* aumentaba la proliferación de linfocitos de ratón (Correa et al., 1999a). Además, una dieta suplementada con NAC y TP estimula la proliferación de linfocitos murinos (Guayerbas et al., 2002b). Puesto que en la presente tesis se ha comprobado como estos antioxidantes aumentan la supervivencia de los linfocitos en cultivo, este hecho también podría explicar el aumento de la respuesta linfoproliferativa encontrada. El aumento de la supervivencia, en células de los tres órganos inmunitarios estudiados, resultó significativo ya desde las 4 horas de incubación en bazo y timo. En un trabajo previo ya se había comprobado que GSH, TP y NAC, en un rango de concentraciones de 0,5 a 5 mM, disminuyen la muerte celular programada, tanto la basal como la inducida, en leucocitos peritoneales (Pomaki et al., 2005). Es un hecho conocido que el GSH disminuye la apoptosis (Hammond et al., 2004) y en el presente estudio se ha observado un aumento de los niveles de GSH intracelulares tras 3 horas de incubación con 5 mM de este antioxidante, lo que podría explicar la mayor viabilidad de las células en cultivo en presencia de los antioxidantes, tanto del propio GSH como de los otros que son aportadores del mismo. También la inhibición de la apoptosis ha sido descrita para la TAU en una línea de macrófagos, lo que parece ser debido a su papel protector frente a la citotoxicidad de las ROS en las

células fagocíticas (Kim y Cha, 2009). La TAU también atenúa la apoptosis en células T (Maher et al., 2005).

Respecto a la **movilidad**, tanto espontánea como dirigida (quimiotaxis), al igual que se ha comentado sucede con los macrófagos, los antioxidantes, a las concentraciones mayores utilizadas en este trabajo y que resultaron ser las más efectivas en el estudio de la proliferación (5 mM de GSH, 1 mM de TP y de NAC y 40 mM de TAU), estimularon esta función en linfocitos de órganos inmunocompetentes y del peritoneo. Son los linfocitos del timo y del peritoneo, seguidos de los del bazo, los que mostraron un mayor efecto por acción de los antioxidantes, y es el GSH el que produjo mayor estimulación de la quimiotaxis. En los linfocitos del peritoneo se probó también el efecto que tenían en la quimiotaxis las concentraciones menores y mayores de TP y NAC utilizadas en el presente estudio, 0,1 y 1 mM, por separado y conjuntamente. La concentración de 0,1 mM no mostró efecto con ninguno de esos antioxidantes por separado, pero sí estimuló la quimiotaxis cuando se utilizaron conjuntamente. La concentración de 1 mM de nuevo demostró estimular esta función de los linfocitos peritoneales, pero en mayor medida cuando se utilizaron los dos antioxidantes conjuntamente. En otros experimentos se había comprobado que antioxidantes como la TP (Correa et al., 1999b) y la NAC (De la Fuente y Victor, 2001; Puerto et al., 2002), aumentaban la movilidad de linfocitos peritoneales de ratones cronológicamente adultos. Resulta curioso que en esos estudios que se han mencionado, las concentraciones de 0,1 mM de TP y NAC aumentarían la quimiotaxis, mientras que en el de la presente tesis sólo cuando ambos antioxidantes están conjuntamente a esas concentraciones lo consiguieran. Una posible explicación es la diferencia de cepa utilizada, ratones Swiss en el caso de uno de los estudios con NAC (Puerto et al., 2002). No obstante, también puede influir la diferencia de edad de los ratones, 22 y 24 semanas en los estudios con NAC de Puerto et al. (2002) y De la Fuente y Victor (2001), respectivamente, y 27 semanas en el caso del de la TP (Correa et al., 1999b), mientras que en el trabajo de la presente tesis los animales tenían una media de edad de 17 semanas. Una diferencia de unas semanas de edad puede suponer un estado fisiológico diferente en los linfocitos, y podría explicar una distinta respuesta a la misma cantidad de antioxidante. De hecho, se ha comprobado que una concentración pequeña de NAC *in vitro* estimula más la quimiotaxis de los linfocitos peritoneales de ratones biológicamente más viejos que la de los más jóvenes (Puerto et al., 2002).

Respecto al efecto de los antioxidantes en la **adherencia** de los linfocitos peritoneales, una función previa a la de la movilidad, al igual que sucedió en los

macrófagos, se comprobó que GSH, TP y NAC estimulaban esta función, a los 10 minutos de incubación, con las concentraciones de 5mM del GSH y 1 mM de TP y NAC. Resultados similares han sido obtenidos con 0,1 mM de NAC en linfocitos del peritoneo, pero también en los de ganglios axilares, bazo y timo (De la Fuente y Victor, 2001). Como ya se ha comentado, el aumento de adherencia, que puede indicar una mayor expresión de moléculas de adhesión, lo que ocurre en situaciones de estrés oxidativo (Victor et al., 1998; Victor, 2001), puede ser positivo si también se encuentran estimuladas otras funciones como la quimiotaxis, hecho que se cumple con estos antioxidantes en los linfocitos peritoneales. Resulta curioso que una capacidad que los antioxidantes sulfurados como el GSH, NAC y TP, no aumentaban en los macrófagos sí lo hagan en los linfocitos. Evidentemente, como se comprobó en este trabajo, la mayoría de los linfocitos del peritoneo presentaban el marcador CD19 (un 69±9 %), esto es, eran linfocitos B, que a diferencia de los T, muestran una clara capacidad de adherencia a las superficies inertes, como la utilizada en la valoración de la adherencia en el presente trabajo. Los antioxidantes al aumentarla parecen mostrar la activación que ejercen sobre estos linfocitos.

Como se mencionó en el apartado anterior, los resultados del presente trabajo apuntan a que los efectos positivos encontrados, tras ingerir dietas suplementadas con antioxidantes como la TP y la NAC, en los linfocitos de ratones adultos (Correa et al., 1999a; Puerto et al., 2002), pueden ser debidos a una acción directa de esos antioxidantes en estas células inmunitarias.

3.1.3. Efecto de los antioxidantes en la funcionalidad de macrófagos y linfocitos de ratones viejo

Una vez comprobado el efecto *in vitro* de una serie de antioxidantes en macrófagos y linfocitos de ratones adultos, se quiso comprobar si esos efectos podrían observarse en células de animales viejos (**Artículo 3 y Artículo 4**). Al envejecer se producen cambios en las funciones de los macrófagos así como en las de los linfocitos, constituyendo estos cambios lo que se ha denominado inmunosenescencia. En general, al avanzar la edad tiene lugar un aumento de la adherencia de ambos tipos de células inmunitarias y una disminución de la quimiotaxis, tanto en macrófagos como en linfocitos, así como una menor capacidad fagocítica de los macrófagos y de la proliferación de los linfocitos a mitógenos (De la Fuente et al., 2004a,b; De la Fuente, 2009a; Agarwal y Busse, 2010; Shaw et al., 2010; Arranz et al., 2010a).

Para llevar a cabo el estudio en macrófagos y linfocitos peritoneales de ratones viejos (**Artículo 3**), se eligió como antioxidante la NAC, la cual fue utilizada en un amplio rango de concentraciones: 0,001, 0,01, 0,1, 1 y 2,5 mM. En estas concentraciones se encuentran incluidas las ya analizadas *in vitro* en macrófagos y linfocitos de ratones adultos (0,1, 0,5 y 1 mM), pero se introducen algunas más bajas (0,01 y 0,001 mM) y la más alta de 2,5 mM, que no habían sido estudiadas. La de 2,5 mM había resultado ser, en el caso del GSH, muy efectiva en las funciones del proceso fagocítico de macrófagos (Artículo 1) y también en la proliferación de linfocitos (Artículo 2) de animales adultos. Se utilizaron ratones BALB/c viejos (78±2 semanas) para la obtención de las células peritoneales en las que estudiar los efectos de las concentraciones indicadas de NAC en las diferentes funciones del proceso fagocítico (ya comentadas en el artículo 1) y en la adherencia y quimiotaxis de linfocitos. Para poder comprobar si las concentraciones de NAC conseguían llevar los valores de las funciones estudiadas a los de las células de ratones adultos, se incorporó un grupo de ratones de 18±2 semanas de edad, en los que se analizaron las funciones mencionadas, en macrófagos y linfocitos peritoneales, para disponer en el mismo experimento de un control de edad.

En relación a las funciones del proceso fagocítico que llevan a cabo los **macrófagos** peritoneales se comprobó que la capacidad de **adherencia** estaba aumentada respecto a la que presentaban las células de adultos, mientras que la capacidad de quimiotaxis y de fagocitosis se encontraba disminuida. Estas variaciones con la edad han sido ya observadas en otros estudios (De la Fuente et al., 2004b; De la Fuente, 2009a; Arranz et al., 2010a). El aumento de la adherencia de los macrófagos al envejecer manifiesta el estrés oxidativo que tienen los animales viejos, hecho que se relaciona con una mayor expresión de moléculas de adhesión que supone la activación del factor de transcripción NFκB (Victor et al., 2005; Lavie, 2005). Efectivamente, se ha comprobado que al envejecer hay un aumento en la activación del NFκB en los leucocitos peritoneales de ratones y como la activación de este factor en dichas células se relaciona con la capacidad funcional de las mismas y con la longevidad de los animales (Arranz et al., 2010a). También, un aumento del estrés oxidativo se relaciona con mayores niveles del factor inhibidor de la migración (MIF) (Hirokawa et al., 1998; Victor et al., 2005), lo que podría explicar la menor quimiotaxis al envejecer. La presencia de NAC *in vitro*, en el amplio rango de concentraciones utilizada en el presente estudio, hizo disminuir la adherencia, lo que se manifestó de forma estadísticamente significativa con las concentraciones mayores (0,1, 1 y 2,5 mM) y a tiempos cortos, 10 y 20 minutos, de incubación. Así, los valores de adherencia en presencia de esas concentraciones se

asemejaron más a los que muestran las células de animales adultos. Curiosamente, estas concentraciones de NAC no modificaron la adherencia de macrófagos de ratones BALB/c adultos, como se ha visto en los resultados del Artículo 1 de la presente tesis y en otros trabajos utilizando células de ratones Swiss jóvenes y estudiando una adherencia a fibronectina y colágeno (Pomaki et al., 2005), así como en macrófagos de ratones cronológicamente adultos, pero con envejecimiento prematuro (Puerto et al., 2002). En otros estudios NAC, a las concentraciones de 1 y 2,5 mM, estimuló la adherencia de macrófagos procedentes de ratones BALB/c adultos, pero en los que se había llevado a cabo una manipulación de administración de PBS (Victor y De la Fuente, 2002) y también de Swiss adultos (Puerto et al., 2002). De este modo se demuestra la capacidad moduladora de un antioxidante como la NAC, no modificando o activando la adherencia en macrófagos de animales adultos e inhibiéndola en las células de los de viejos, en los que hay un claro aumento de esta función por la situación de estrés oxidativo (De la Fuente, 2009a). También, en macrófagos peritoneales de ratones con un estrés oxidativo agudo, como lo es un shock endotóxico letal, en los que se da un aumento de la capacidad de adherencia en estas células, esas concentraciones de NAC *in vitro* disminuyeron esta capacidad (Victor y De la Fuente, 2002). Por su parte, la **quimiotaxis** de macrófagos fue estimulada por NAC con todas las concentraciones, a excepción de la menor estudiada. Resultados similares han sido obtenidos en células de ratones adultos (Artículo 1 de la presente tesis; Puerto et al., 2002; Victor y De la Fuente, 2002). En ratones con envejecimiento prematuro (PAM), los cuales presentan una menor quimiotaxis que sus compañeros de la misma edad (adultos) no prematuramente envejecidos (NPAM), la NAC *in vitro* estimuló esta función en macrófagos peritoneales (Puerto et al., 2002). En estas células de ratones adultos pero con estrés oxidativo agudo por un shock endotóxico letal, con una menor quimiotaxis, la NAC *in vitro* aumentó esta función (Victor y De la Fuente, 2002), hecho que parece haber llevado a cabo al modular la expresión del NFκB (Victor et al., 2003,2005). Todos estos resultados *in vitro*, podrían apoyar la idea de que la NAC manifestó una acción directa en las células inmunitarias, concretamente al estimular la quimiotaxis, en aquellos estudios en los que este antioxidante se administró en la dieta a ratones con envejecimiento prematuro (Puerto et al., 2002; Guayerbas et al., 2005a) o como suplemento a mujeres post-menopáusicas (Arranz et al., 2008).

La capacidad de **fagocitosis** de partículas inertes (tanto el índice de fagocitosis como la eficacia fagocítica), una función que disminuye con la edad (De la Fuente et al., 2004b; De la Fuente, 2009a; Arranz et al., 2010a), se estimula con NAC (a concentraciones de 0,01, 0,1 y especialmente de 1 mM). Este mismo efecto estimulador,

que también se produce en células de animales adultos (Artículo 1), se ha encontrado en macrófagos de ratones que aunque adultos tienen un mayor estado de estrés oxidativo, como sucede en los ratones prematuramente envejecidos (PAM) (Puerto et al., 2002). En estos una concentración *in vitro* de 0,001 mM de NAC ya aumentaba la fagocitosis, mientras que en las células de NPAM había que tener 0,1 mM de NAC para observar dicho aumento. En el modelo de estrés oxidativo agudo por shock endotóxico que hemos estudiado en nuestro laboratorio, la fagocitosis de macrófagos peritoneales aumentaba tras la administración de la endotoxina (LPS bacteriano) (Victor et al., 1998). Es evidente que la diferente respuesta en esta función a un estrés oxidativo crónico, como es el envejecimiento, en el que la fagocitosis de los macrófagos peritoneales de ratones disminuye (De la Fuente, 2009a; Arranz et al., 2010a) y a un estrés oxidativo agudo, como es la endotoxemia, en el que aumenta (Victor et al., 1998) está demostrando un diferente mecanismo intracelular de los mediadores de ambas situaciones de estrés oxidativo. El papel modulador de los antioxidantes como la NAC queda de manifiesto al comprobarse que a las mismas concentraciones a las que aumenta *in vitro* la fagocitosis de los macrófagos peritoneales de animales viejos o adultos (Puerto et al., 2002; Victor y De la Fuente, 2002; Pomaki et al., 2005), la disminuye en células de animales con shock endotóxico letal (Victor y De la Fuente, 2002). Un hecho curioso es la falta de efecto observada en el presente trabajo (Artículo 3) con la concentración mayor de NAC que se utilizó, la de 2,5 mM, la cual sí fue efectiva en células de ratones adultos (Puerto et al., 2002; Victor y De la Fuente, 2002). En el Artículo 1 de la presente tesis se ha observado que una concentración más alta de un antioxidante como el GSH produce menos efecto en la fagocitosis que otra más baja. También, en otro estudio se ha comprobado que 5 mM de NAC no tiene efecto en la fagocitosis de los macrófagos de ratones adultos, mientras que concentraciones más bajas sí eran efectivas (Pomaki et al., 2005). Esto podría significar que *in vitro* una concentración elevada de NAC neutraliza demasiado los niveles de ROS que produce la célula, y ésta no puede llevar a cabo su función, para la que necesita unas cantidades determinadas de oxidantes. Se estaría generando otro desbalance ROS/antioxidantes, con menores niveles de ROS que los necesitados por la célula para esa función (Knight, 2000).

Los niveles de **anión superóxido** en los leucocitos peritoneales de ratones BALB/c viejos que hemos medido en el presente trabajo son mayores que los de los animales adultos. Resultados similares han sido obtenidos en otros estudios, utilizando una técnica similar de medida, en células peritoneales de ratones (Guayerbas et al., 2002a,b,c) y en neutrófilos de sangre periférica humana (Arranz et al., 2008). No obstante, también se

han encontrado resultados opuestos, esto es, una disminución en los niveles de anión superóxido intracelulares en células peritoneales al avanzar la edad (De la Fuente et al., 2004b; Alvarado, 2006). Realmente, esta función del proceso fagocítico es la que más diversidad de resultados ha demostrado en lo que respecta a sus cambios con el envejecimiento (Alvarez et al., 1995, 2001). En presencia de 0,1 y 1 mM de NAC los niveles de anión superóxido aumentaron, tanto los no estimulados como los estimulados por la presencia de bolas de latex. También en leucocitos peritoneales de ratones adultos la NAC, a esas concentraciones, aumentó tales niveles (Artículo 1). Resultados similares fueron obtenidos con este antioxidante en otros trabajos (Victor et al., 1999; Victor y De la Fuente, 2002). Estos datos vuelven a demostrar que la capacidad antioxidante de NAC no interfiere con la generación de anión superóxido y, en este aspecto, se podrían hacer los mismos comentarios que se han hecho en la discusión del Artículo 1.

Si consideramos las funciones de **adherencia** y **quimiotaxis** de los **linfocitos** al envejecer, dos capacidades que comparten con los fagocitos, las mismas aumentan y disminuyen, respectivamente, cuanto mayor es la edad cronológica y biológica del individuo (Guayerbas et al., 2002b,c; De la Fuente, 2009a). También estas funciones se modifican, en ese mismo sentido, en linfocitos peritoneales de ratones con un estrés oxidativo agudo por shock endotóxico letal (De la Fuente y Victor, 2000). En el presente trabajo estas funciones, en células del peritoneo de ratones BALB/c viejos aparecen, de acuerdo con lo indicado, aumentada la adherencia y disminuida la quimiotaxis, en comparación con como se encuentran en los ratones adultos. La presencia de NAC *in vitro* disminuyó la adherencia, al menos con concentraciones de 0,1 a 2,5 mM y a los 10 minutos de incubación, pero no modificó la quimiotaxis. En células de ratones adultos con shock endotóxico letal, la administración de NAC i.p. disminuye la adherencia aumentada y aumenta la quimiotaxis disminuida por la endotoxemia, sin embargo, este antioxidante aumenta ambas funciones en las células de los animales controles (De la Fuente y Victor, 2000). En linfocitos de ratones adultos con envejecimiento prematuro (PAM), los cuales muestran una mayor adherencia y menor quimiotaxis que sus compañeros de la misma edad cronológica pero no prematuramente envejecidos (NPAM), la NAC *in vitro* disminuyó la adherencia en las células de PAM pero la aumentó en las de NPAM, mientras que la quimiotaxis resultó aumentada en las células de ambos (Puerto et al., 2002). La falta de respuesta en la quimiotaxis de los linfocitos de ratones viejos a las concentraciones de NAC utilizadas en el presente trabajo, aunque se observó una ligera tendencia a aumentar esta función con la concentración mayor, parece apuntar a que en esta función concreta serían necesarias mayores cantidades de este

antioxidante, cuando estamos con células de animales cronológicamente viejos, para obtener estimulaciones estadísticamente significativas.

En el **Artículo 4** se analizó el efecto *in vitro* de antioxidantes como el GSH (5mM) y la TP (1mM) en una serie de funciones de linfocitos como la movilidad, tanto espontánea como dirigida, y la proliferación en respuesta al mitógeno ConA, utilizando leucocitos de ganglios axilares, bazo y timo de ratones viejos. En este estudio los animales fueron de la cepa Swiss, diferente a la usada en los anteriores trabajos de la presente tesis.

Respecto a la **movilidad**, tanto la espontánea como la quimiotaxis, funciones que disminuyen al envejecer en los linfocitos peritoneales de ratones y en los de sangre periférica de humanos (Arranz et al., 2008; 2010a), resultó significativamente disminuida en linfocitos de ganglios axilares, bazo y timo de ratones viejos en comparación con la de los adultos. La presencia de GSH y TP estimula significativamente estas funciones en todos los casos con excepción de la quimiotaxis de bazo con el GSH. De este modo, la presencia de los antioxidantes *in vitro* acerca los valores de la movilidad de las células de ratones viejos a la de las células de los adultos, llegando a igualarse en el caso de la movilidad espontánea de bazo y timo.

La capacidad de **proliferación** de los linfocitos en respuesta a mitógenos (usados en el laboratorio para mimetizar la respuesta *in vivo* a los antígenos) disminuye de forma significativa con el envejecimiento. Este hecho ha sido ampliamente comprobado, tanto en humanos como en animales de experimentación (Pawelec et al., 2002; Aw et al., 2007; Alonso-Fernández et al., 2008; De la Fuente, 2009a; Arranz et al., 2010a). Los resultados obtenidos en el presente estudio son coincidentes con los de la bibliografía. Cuando se incubaron los leucocitos de ratones viejos con GSH y con TP, los niveles de proliferación de los linfocitos T en respuesta a la Con A aumentaron significativamente, asemejándose a los de las células adultas, llegando a igualarse con los dos antioxidantes en el caso del timo y con GSH en el bazo. La TP en linfocitos de bazo consiguió superar los niveles de proliferación de las células adultas. Ya se ha comentado anteriormente el papel del estado redox en la proliferación de los linfocitos y el de antioxidantes como el GSH en esta función. Parece evidente pensar que si GSH y TP demostraron tener un claro papel estimulador de la proliferación de los linfocitos de ratones adultos (Artículo 2 de la presente tesis), lo tengan también en las células de animales viejos. Aunque no es posible hacer una comparación directa de los datos, pues en el caso de las células de adultos los

resultados se expresaron como porcentaje de estimulación proliferativa y en el caso de las de viejos en la absorbancia que daba el cultivo, sí se puede observar un efecto más significativo, en general, de los antioxidantes en las células de ratones viejos. Hay que tener en cuenta que tanto el GSH como la TP aumentaron la viabilidad de las células en cultivo, especialmente en incubaciones de 48 y 72 horas, tiempo coincidente con el utilizado para medir la proliferación de los linfocitos. Además, es el GSH el que muestra mayor efecto. Ya se comentó como estas concentraciones de GSH y TP aumentaban la viabilidad de linfocitos de las mismas localizaciones de ratones adultos y como era el GSH a 5mM el que más efecto tenía en la proliferación de los linfocitos (Artículo 2). Se podría pensar en el papel de estos antioxidantes disminuyendo la apoptosis de estas células inmunitarias (Hammond et al., 2004; Pomaki et al., 2005), siendo la muerte programada, un proceso que aumenta con el envejecimiento y que se encuentra implicado en el deterioro inmunitario (Tower, 2015), uno de los posibles mecanismos que expliquen los resultados encontrados.

3.1.4. Efecto de los antioxidantes en la actividad NK de ratones jóvenes, adultos, maduros y viejos

Los resultados correspondientes a este apartado se recogen en el **Artículo 5**. Al observar cómo se modificó la **actividad NK** al avanzar la edad, en leucocitos de diferentes localizaciones, en ratones BALB/c, se aprecia la disminución que, al envejecer, tiene, en general, esta actividad citotóxica frente a células tumorales. Aunque hay resultados contradictorios, con trabajos que demuestran desde ausencia de cambios a un aumento de esta actividad al avanzar la edad (Krishnaraj, 1992,1997; Krause et al., 1999; Solana et al., 1999, 2012), la mayoría de los trabajos publicados al respecto indican una clara disminución de la actividad NK en el envejecimiento (Albright y Albright, 1998; Pawelec et al., 2002; Albright et al., 2004; Puerto et al., 2005; Alvarado, 2006; De la Rosa et al., 2006; Arranz et al., 2010a). Este hecho es uno de los que parecen explicar, al menos en parte, el aumento en la incidencia de cánceres que tiene lugar al envejecer. En el estudio que se ha llevado a cabo en la presente tesis se muestra que tal disminución de la actividad NK se manifiesta si tomamos como referencia la edad adulta (24 ± 2 semanas). De hecho, los jóvenes (8 ± 2 semanas) presentaron también una menor actividad NK que los adultos. Esta es una de las razones que pueden explicar los resultados tan contradictorios que se tienen publicados sobre los cambios de ésta función inmunitaria, y de otras, al avanzar la edad. Es evidente que si el investigador considera a ratones de 8 semanas como adultos (algo muy habitual en los estudios inmunitarios en los que se

suelen utilizar animales de esta edad), el resultado que obtiene al comparar con los maduros (48 ± 2 semanas), edad que puede ser considerada por algunos investigadores como viejos, es que la actividad NK aumenta al avanzar la edad. Si la comparación se hace con ratones viejos de 72 ± 2 semanas, la conclusión es que no hay cambios en esta función inmunitaria al envejecer. Esto es algo que puede suceder con otras funciones que tienen una cinética de evolución similar, como es el caso de la respuesta linfoproliferativa, la secreción de IL-2 o la fagocitosis (Guayerbas et al., 2002; De la Fuente et al., 2004a,b; Alvarado, 2006; De la Fuente, 2009a; Alonso-Fernandez y De la Fuente, 2011). En el presente trabajo, el timo no manifiesta cambios en la actividad NK de sus células al envejecer, debido posiblemente a las subpoblaciones que tiene y su clara involución con la edad (Pawelec et al., 2002).

Respecto al efecto *in vitro* de varios antioxidantes como TP y NAC (1 mM) y AA y VE (0,005 mM) sobre la actividad NK en leucocitos de ganglios axilares, bazo, timo y peritoneo de animales jóvenes, adultos, maduros y viejos (**Artículo 5**), los resultados muestran, en general, un efecto estimulador. Aunque se utilizaron las concentraciones que en estudios previos demostraron efectos activadores de funciones inmunitarias (Artículo 1), hay que tener en cuenta que los antioxidantes aportadores de GSH como la TP y la NAC se han utilizado en cantidades mucho mayores que las empleadas de AA y VE. Cuando se analizan los resultados en células de jóvenes y adultos, se observa que tuvo lugar una clara estimulación de la NK con todos los antioxidantes, siendo más relevante en células de timo y con menores efectos en las de peritoneo. Esas diferencias pueden atribuirse a las distintas subpoblaciones leucocitarias que hay en esas localizaciones (Guayerbas, 2003). Únicamente no se alcanzan diferencias con los controles, que sean estadísticamente significativas, en las células de bazo y peritoneo de adultos con el AA y en las del peritoneo de jóvenes con TP, NAC y VE. La estimulación de la actividad NK en los leucocitos por la presencia de los antioxidantes puede ser debida a diversos mecanismos. Es posible que se mejore la disposición del citoesqueleto celular, permitiendo un mejor contacto entre los leucocitos y las células tumorales, lo que posibilita un mejor programa de apoptosis de estas células tumorales. Este hecho ha sido comprobado en células de sangre periférica humana en presencia de NAC (Rivabene et al., 1995). También el aumento en la liberación de citoquinas que producen los antioxidantes, como la IL-2 (Meydani et al., 1991), y que estimulan la actividad NK (Sayers et al., 1990), podría ser otro de los mecanismos utilizados. De hecho, se ha comprobado la estimulación en la liberación de IL-2 y en la actividad NK tras la administración de antioxidantes como la NAC, lo cual parece ser consecuencia del

aumento en los niveles de GSH que tiene lugar en las células inmunitarias (Arranz et al., 2008). También se ha comprobado en otros estudios que la VE y el AA tienen un papel relevante en la activación de la funcionalidad de las NK (Ashfaq et al., 2000; Kim et al., 2012; Huijskens et al., 2015).

Es evidente que conseguir los niveles de antioxidantes que permitan una mejor actividad NK es más difícil en células de animales viejos, las cuales tienen un alterado estado redox. De hecho, los resultados obtenidos en los leucocitos de animales maduros y viejos, parecen mostrar que aunque la presencia de los antioxidantes estudiados estimule la actividad NK, estos efectos son algo menores que en las edades más jóvenes. De nuevo son las células del timo las que muestra mayor respuesta a los antioxidantes, siendo menores la que tienen las de otras localizaciones. En ganglios axilares y bazo, las células de maduros se encontraron menos estimuladas que las de los viejos, no apareciendo diferencias significativas, estadísticamente, con NAC, AA y VE.

3.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL SEGUNDO GRAN OBJETIVO: Estudiar el efecto de antioxidantes, administrados en la dieta o cómo suplementos, en la modulación de la función inmunitaria en la edad adulta y en la vejez de animales de experimentación y en el ser humano

Este segundo objetivo general se ha desarrollado en 2 grandes sub-objetivos, cada uno de los cuales se ha subdividido a su vez en varios objetivos concretos, a los que se ha ido dando respuesta con los experimentos publicados en los artículos correspondientes.

3.2.1. ¿La ingestión de antioxidantes en la dieta puede modificar la funcionalidad de las células inmunitarias en la edad adulta?

Este objetivo se ha dividido en otros dos más concretos.

3.2.1.1. ¿Es relevante la cantidad, baja o alta, de un antioxidante, como la vitamina E, que se administra en la dieta, sobre la funcionalidad de células inmunitarias de animales adultos?.

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 6.

3.2.1.2. ¿La administración en la dieta de dos antioxidantes sulfurados que aportan glutatión como la N-acetilcisteína (NAC) y la tioprolina (TP), puede estimular la funcionalidad de los macrófagos peritoneales de ratones adultos?. ¿Puede haber diferencias por la cepa de ratones utilizada?.

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 7.

En los experimentos correspondientes a estos artículos se han utilizado como animales de experimentación cobayas y ratones (de las cepas BALB/c y Swiss), y como antioxidantes suministrados en la dieta: vitamina E así como NAC y TP, respectivamente.

3.2.1.1. Efecto de la ingestión de dietas con baja y alta cantidad de vitamina E sobre la funcionalidad de las células inmunitarias de cobayas jóvenes

Para comprobar si había diferencias en los efectos que dietas con cantidades bajas y altas de un antioxidante, como la vitamina E, pueden tener en las funciones de macrófagos y linfocitos, se llevó a cabo un estudio en cobayas (**Artículo 6**). Aunque hay numerosas aportaciones sobre los problemas para la salud que puede tener la deficiencia en vitamina E, y los beneficios de la ingestión de cantidades de esta vitamina superiores a las recomendadas, especialmente para el sistema inmunitario, (Meydani et al., 1997; Peng et al., 1998; Hernandez et al., 2009; Pekmezci, 2011; Curtis et al., 2014; Rizvi et al., 2014; Traber, 2014; Ulatowski y Manor, 2015), también hay estudios que han mostrado posibles efectos desfavorables de la ingestión de altas y continuas cantidades de este antioxidante (Viña et al., 2007; Marosz y Chlubek, 2014; Vrolijk et al., 2015). De hecho, se ha propuesto que no es necesaria la suplementación con antioxidantes si se tiene una dieta adecuada (Ginter et al., 2014). Ya se ha comentado el relevante papel de la vitamina E frente al daño oxidativo, especialmente en los leucocitos (Meydani et al., 1990, 1994, 1997, 2005) y de forma importante en los macrófagos (Coquette et al., 1986). Así, toda una serie de estudios demuestran el efecto positivo que tiene la ingestión de vitamina E para la función inmunitaria, incluso en cantidades relativamente elevadas (Wu y Meydani, 2014). En el estudio llevado a cabo en la presente tesis, el grupo de cobayas que ingirieron una dieta con bajas cantidades de vitamina E (15 mg/kg/dieta), tomaron de 0,6 a 0,75 mg/día, lo que supone una dieta cercana, aunque menor, al mínimo de requerimiento diario para mantenimiento en las cobayas (1 mg/día) según el “*National*

Research Council' (1978). Los animales que tomaron la dieta intermedia ingirieron 6 veces el requerimiento mínimo diario, estando en el rango de cantidad en dieta de mantenimiento. La dieta con alta cantidad contenía 65 veces el mínimo requerido.

Tomada la de cantidad media de vitamina E como dieta control de referencia, los resultados han demostrado que la quimiotaxis de los macrófagos de cobayas estaba significativamente disminuida en los animales que tomaron la dieta “baja” y estimulada en los de la “alta”. El efecto estimulador de la dieta “alta” de vitamina E podría ser debido a que este antioxidante disminuye el factor inhibidor de la migración (MIF) que producen los macrófagos (Sakamoto et al., 1998). En el estudio *in vitro* del Artículo 1, los resultados también indicaron que la vitamina E activa la quimiotaxis de macrófagos peritoneales de ratones adultos. La falta de efecto de la dieta con baja cantidad de vitamina E podría estar manifestando que las células inmunitarias de esos animales tienen un estado de estrés oxidativo. De hecho, en situaciones de oxidación, tanto crónica (el caso del envejecimiento) como aguda (el del shock endotóxico) la quimiotaxis de los macrófagos peritoneales se encuentra disminuida (Victor et al., 1998; Arranz et al., 2010a). La fagocitosis de estas células aparece con mayores valores en los animales que toman la dieta “baja” en vitamina E. Aunque este resultado es opuesto al obtenido con vitamina E *in vitro*, en macrófagos peritoneales de ratón, hay situaciones de elevado estrés oxidativo, como el que tiene lugar en el shock endotóxico letal, en el que la fagocitosis de los macrófagos peritoneales aumenta (Victor et al., 1998). No se puede descartar, por tanto, una situación similar en los macrófagos de cobayas que ingieren una dieta con baja cantidad de vitamina E. Además, hay que tener en cuenta que los animales utilizados tenían 8 semanas de edad, es decir eran jóvenes, y hay estudios que demuestran una situación de estrés oxidativo en las células inmunitarias de ratones jóvenes (Alvarado, 2006; Alvarado et al., 2006a). La capacidad de fagocitosis fue similar en las células de los animales con dosis media y alta, lo que concuerda con lo obtenido por otros autores (Hogan et al., 1992). En lo que respecta a los niveles de anión superóxido, los resultados mostraron también niveles semejantes en células de animales que ingirieron una dieta “media” y “alta” de vitamina E, pero mayores que los de los leucocitos peritoneales de cobayas con dieta “baja”. Este dato vuelve a apoyar la idea de una menor capacidad funcional, en este caso de la actividad digestiva de los macrófagos, en las células inmunitarias de los animales que ingieren baja cantidad de un antioxidante como la vitamina E.

En las funciones de los linfocitos peritoneales, si bien en la quimiotaxis no hay diferencias estadísticamente significativas, aunque si hay un aumento en las células de los animales con dieta “alta” en comparación con dieta “baja”, en la proliferación la dieta con cantidades altas de la vitamina E produce un aumento de esta actividad, tanto a nivel espontáneo como en respuesta al mitógeno PHA. La mayoría de los trabajos en los que se estudia el efecto de este antioxidante en la proliferación de linfocitos, el aspecto más analizado en cuanto a los efectos de esta vitamina en la respuesta inmunitaria, observan una estimulación de la misma (Meydani et al., 1990, 1994, 1997, 2005; Sakai y Moriguchi, 1997; Hernandez et al., 2009). Este efecto se ha explicado por el papel inhibitor de la vitamina E sobre la producción de prostaglandina E2 por parte de los macrófagos, lo que se correlaciona con un aumento de la secreción de IL-2 por los linfocitos T vírgenes (Beharka et al., 1997; Adolfsson et al., 2001; Meydani et al., 2005), y con las variaciones en otras citoquinas (Hernández et al., 2009). También el papel regulador de este antioxidante en el ciclo celular podría explicar su efecto en la proliferación de linfocitos (Han et al., 2004). En resultados de humanos se ha comprobado el papel inmunomodulador de la vitamina E en la proliferación de linfocitos, aumentandola o disminuyéndola dependiendo de los niveles iniciales de la misma (De la Fuente y Victor, 2000).

Es evidente que cantidades mayores que las recomendadas para vitamina E parecen tener un importante capacidad para potenciar la función de macrófagos y linfocitos. No obstante, debería evitarse tanto un déficit en la ingestión de este antioxidante como un exceso (con cantidades superiores a las utilizadas en el estudio de la presente tesis (Artículo 6), para evitar los posibles efectos no deseados que han sido indicados en varias publicaciones (Calder y Kew, 2002; Viña et al., 2007; Marosz y Chlubek, 2014; Vrolijk et al., 2015).

3.2.1.2. Efecto de la ingestión de una dieta suplementada con NAC y TP sobre la funcionalidad de las células inmunitarias de ratones adultos. Comparación entre dos cepas

En animales adultos se quiso también comprobar el efecto de la administración conjunta en la dieta, durante 5 semanas, de dos antioxidantes como la N-acetilcisteína (NAC) y la tioprolina (TP), a una concentración de 0,1% p/p de ambos antioxidantes, sobre la funcionalidad de macrófagos y linfocitos. Además, como en los estudios *in vitro* con células de animales adultos se habían utilizado únicamente ratones de la cepa

BALB/c, parecía interesante saber si había diferencias por la cepa de ratón utilizada. Por ello se hizo en paralelo el estudio con ratones BALB/c, que son singénicos, y con Swiss, que no lo son. Los resultados obtenidos se recogen en el **Artículo 7**.

El efecto de la ingestión de la dieta indicada en la adherencia, quimiotaxis y fagocitosis de macrófagos peritoneales de ratones BALB/c, reproduce los resultados obtenidos *in vitro* para cada uno de esos antioxidantes por separado (Artículo 1). Así, no se modificó la capacidad de adherencia y se estimuló la de quimiotaxis y la de fagocitosis. Esto parece apuntar a que los efectos encontrados tras la ingestión de la dieta se deben a la acción directa de los antioxidantes en los macrófagos. Curiosamente, esa dieta sí aumentó la adherencia en las células de ratones Swiss. Es posible que al presentar los macrófagos de ratones BALB/c unos valores de adherencia en los controles significativamente más elevados que los de los Swiss de su misma edad, los antioxidantes ya no requieran aumentar una función tan estimulada. El efecto positivo de la ingestión de estos antioxidantes queda de manifiesto con el aumento, en las dos cepas, de la quimiotaxis y la fagocitosis de macrófagos. En la fagocitosis, analizada por el índice fagocítico (número de partículas que ingieren cien macrófagos) aparecen, de nuevo, diferencias entre las dos cepas. En este caso se partió de valores controles muy parecidos, pero la ingestión de los antioxidantes produjo una mayor estimulación de esta función en las células de la cepa Swiss que en las de la BALB/c. No se encontró ninguna diferencia al analizar la eficacia fagocítica (el porcentaje de macrófagos que ingieren al menos una partícula). Al no haberse estudiado este aspecto fagocítico en el trabajo *in vitro* no se puede saber si en este caso se reproducirían o no los efectos. Otra función que se estimuló con la ingestión de los antioxidantes fue la secreción de IL-1 β . También en este caso, al ser los valores controles más elevados en la cepa BALB/c, el aumento que produce la dieta es menor en las células de esta cepa que en las de la Swiss. Hay que tener presente que aunque la IL-1 β es una citoquina pro-inflamataroria, su secreción por macrófagos, tras ser estimulados con un reto antigénico o mitogénico, es necesaria para la adecuada presentación antigénica, proliferación de los linfocitos y regulación de su función (Oppenheim y Gery, 1982; Netea et al., 2014). De hecho, la liberación de IL-1 β por neutrófilos es mayor en células de centenarios sanos que en las de personas de menor edad (Miyaji et al., 2000).

Los niveles de anión superóxido en células de ratones BALB/c no se modificaron tras la ingestión de la dieta, mientras que estos antioxidantes *in vitro* producían en los leucocitos peritoneales un aumento de tales niveles (Artículo 1). Es posible que la

activación que se observó *in vitro* haya quedado compensada, en el caso del presente estudio *ex vivo*, por el papel neutralizador de las ROS que ejercen los antioxidantes de la dieta o sus productos en el organismo. Los niveles de anión superóxido en los leucocitos de los ratones Swiss controles son mucho más elevados que en los BALB/c, y curiosamente en la cepa Swiss la ingestión de antioxidantes disminuye tales niveles. Se aprecia de nuevo una capacidad inmunomoduladora de los antioxidantes que se ingieren en la dieta y que ha sido ya observada en otros trabajos (De la Fuente y Victor, 2000).

3.2.2.¿La ingestión de antioxidantes en la dieta, o como suplementos, puede modificar la funcionalidad de las células inmunitarias en la vejez?

Este sub-objetivo se ha dividido en otros más concretos que se indican seguidamente:

A) Estudios en animales de experimentación:

3.2.2.1. ¿La cantidad de antioxidante que hay que incorporar a la dieta para restaurar la función inmunitaria en la vejez de los animales de experimentación es similar a la requerida para mejorarla en la edad adulta o sería necesario una cantidad mayor dado el deterioro funcional que se experimenta al envejecer?.

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 8.

3.2.2.2. ¿Suplementar la dieta con un antioxidante como la tioprolina puede en animales cronológicamente viejos evitar el deterioro funcional de las células inmunitarias?.

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 9.

3.2.2.3. ¿Podría darse una relación entre actividad exploratoria y función inmunitaria en ratones viejos que permitiera el establecimiento de un modelo de inmunosenescencia prematura y consecuentemente de mayor senescencia, que posibilite el estudio del efecto de dietas suplementadas con antioxidantes en la función inmunitaria y en la longevidad?.

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 10.

3.2.2.4. ¿La ingestión de una dieta suplementada con NAC +TP podría ser efectiva en ratones viejos con envejecimiento prematuro?.

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 11 (REVISIÓN 7).

3.2.2.5. ¿La ingestión durante largos periodos, de 15 y 30 semanas, de dietas enriquecidas con antioxidantes nutricionales de tipo polifenólico podría mejorar la función inmunitaria en ratones maduros y viejos?.

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 12.

En estos trabajos se han utilizado ratones de la cepa Swiss y los antioxidantes incorporados a las dietas han sido la N-acetilcisteína (NAC) y la tioprolina (TP), así como cereales conteniendo diversos polifenoles.

B) En el ser humano

3.2.2.6. ¿La función inmunitaria podría mejorarse en mujeres septuagenarias tras tomar durante 4 meses un suplemento de vitamina C (1000 mg/día) y vitamina E (200 mg/día)?, ¿haría más efecto si las mujeres presentaran alguna patología?.

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 13.

3.2.2.7. ¿La ingestión durante 3 meses de un suplemento de vitamina E (200 mg/día), de vitamina C (500 mg/día) o de vitamina C (500 mg/día) conjuntamente con vitamina E (200 mg/día) podría mejorar la función inmunitaria en hombres y en mujeres septuagenarios?, ¿se asemejarán los valores funcionales a los de personas cronológicamente adultas?.

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 14 y en el ARTÍCULO 15.

Estos tres últimos trabajos se han realizado con personas septuagenarias (hombres y mujeres), a los que se les suministró suplementos de vitamina E y vitamina C.

Como ya se ha comentado, al envejecer se produce una inmunosenescencia que tiene como base un estrés oxidativo crónico. Por ello, el papel beneficioso de la ingestión de dietas suplementadas con antioxidantes para neutralizar la oxidación de las células inmunitarias parece más evidente en la vejez. De hecho, hay toda una serie de trabajos que han comprobado este positivo efecto. Dado que varios antioxidantes, como los que aportan glutatión (NAC y TP), tienen *in vitro* un efecto modulador de las funciones de macrófagos y linfocitos de ratones viejos, acercando los valores de las mismas a los que muestran las células de adultos (Artículos 3, 4 y 5), y dado el efecto positivo encontrado

en animales suplementados con ambos antioxidantes NAC+TP para la función inmunitaria en ratones adultos de dos cepas (Artículo 7), se llevaron a cabo una serie de estudios para comprobar el posible efecto beneficioso de la ingestión de dietas suplementadas con esos antioxidantes en animales viejos.

3.2.2.1. Efecto de la ingestión de dietas suplementada con 0,1% o 3% de NAC y TP sobre la funcionalidad de las células inmunitarias de ratones adultos y viejos

Para responder a la pregunta planteada de si la cantidad de antioxidante que hay que incorporar a la dieta para poder restaurar la función inmunitaria, en los animales de experimentación viejos, es similar a la requerida para mejorarla en la edad adulta o sería necesario una cantidad mayor, se diseñó el experimento que se recoge en el **Artículo 8**. Como las células inmunitarias necesitan unos niveles óptimos de antioxidantes para mantener adecuadamente su función y dado que con el envejecimiento se produce un mayor estrés oxidativo y las células inmunitarias son muy sensibles al balance oxidantes/antioxidantes en lo que respecta a su funcionalidad (McArthur,1998; Knight, 2000; Vida et al., 2014), se quiso comprobar si la cantidad de antioxidante que hay que incorporar a la dieta para restaurar la función inmunitaria en la vejez de los animales de experimentación sería mayor a la necesaria en los adultos, dado el deterioro funcional que se experimenta al envejecer. De hecho, ya se había apuntado que los requerimientos de antioxidantes en la vejez son mayores que en la edad adulta (Chandra, 1997). Puesto que se había comprobado que, en los adultos, la ingestión de una dieta durante 5 semanas con 0,1 % p/p de TP +NAC tenía efectos beneficiosos en diversas funciones de macrófagos, especialmente en ratones de la cepa Swiss (Artículo 7), se eligió esta cepa, esos antioxidantes y esa duración del tratamiento, así como ese porcentaje para la dieta con menor cantidad de suplementación. Además, se ampliaron las funciones estudiadas y se incorporó al estudio tanto animales viejos como el uso de una dieta con mayores cantidades de tales antioxidantes (0,3% p/p).

Si comparamos los resultados encontrados en el presente experimento con los del Artículo 7, en las funciones de macrófagos, se observan similitudes, con la salvedad de unos valores de adherencia mayores y de anión superóxido intracelular menores en los del presente trabajo, lo que refleja la diferencia de edad de los ratones adultos, 28 semanas en el experimento anterior (Artículo 7) y 33 semanas en éste que se está comentando. Esto explicaría el hecho de que en estas funciones no se obtuviese, tras la

ingestión de la dieta con 0,1% de los antioxidantes, una modificación en la adherencia, en lugar del aumento observado en el trabajo anterior (Artículo 7) y un aumento del anión superóxido estimulado, en lugar de la disminución previamente observada (Artículo 7). Aunque los valores obtenidos en el anión superóxido no estimulado son bajos en los controles del presente trabajo, el tratamiento los disminuyó, lo que parece indicar que los antioxidantes deben llegar a las células inmunitarias a una concentración baja, menor que la de 0,1 mM que, como se observó en el Artículo 1, no tenía efecto en este parámetro. Evidentemente, una disminución de anión superóxido intracelular en condiciones de no estimulación y de aumento en presencia de agentes a fagocitar (situación de estimulación) es lo que resulta fisiológicamente más beneficioso, y es lo que sucede en las células peritoneales de los ratones adultos con la dieta de 0,1%. En lo que respecta a las cantidades de anión superóxido extracelular, tanto en condiciones de estimulación como de no estimulación, se aprecia claramente que son menores que las encontradas a nivel intracelular, lo cual ha sido confirmado en otros estudios (De la Fuente et al., 2004b). En el presente trabajo, la dieta de antioxidantes del 0,1% los disminuyó, lo que representa un efecto beneficioso, dado que el superóxido extracelular es el que se relaciona directamente con el daño oxidativo que pueden generar las células inmunitarias. De hecho, estos niveles extracelulares aumentan al envejecer, a diferencia de los intracelulares que disminuyen (De la Fuente et al., 2004b). Tanto la quimiotaxis como la fagocitosis de los macrófagos, presentaron valores en controles algo menores que los observados en el Artículo 7, lo que vuelve a dejar patente cómo disminuyen estas funciones al ir avanzando la edad (ya se ha comentado que en este trabajo los ratones Swiss son unas semanas mayores que los estudiados en el Artículo 7) (De la Fuente et al., 2004b). Estas funciones manifestaron, al igual que fue previamente observado, una significativa estimulación por la ingestión de esta dieta con 0,1% de antioxidantes. En los linfocitos, esta suplementación del 0,1% estimula la quimiotaxis, tanto en las células peritoneales como en las procedentes de ganglios, bazo y timo, así como la respuesta proliferativa y la actividad NK en los leucocitos de estos órganos.

Los animales viejos (75 ± 1 semanas de edad) presentaban un claro deterioro de las funciones estudiadas en relación a los adultos, con mayores valores de los índices de adherencia, tanto en macrófagos como en linfocitos, y de los niveles de anión superóxido extracelular, así como menores valores de quimiotaxis (en ambos tipos de células), de proliferación de linfocitos y de actividad NK. La ingestión de la dieta con 0,1% de los antioxidantes sólo consiguió estimular la quimiotaxis y actividad NK en células de ganglios axilares y la NK en las del timo. En todos esos casos se alcanzaron valores

semejantes a los de los adultos controles. Ya se ha comentado que las funciones inmunitarias como la quimiotaxis, la proliferación y la actividad NK necesitan un determinado balance oxidante/antioxidantes para llevarse a cabo adecuadamente, y que situaciones con exceso de oxidantes o defecto de antioxidantes, esto es, con estrés oxidativo las disminuyen (Victor et al., 1998; De la Fuente et al., 2004b; Vida et al., 2014). Parece evidente que el estrés oxidativo presente en los individuos viejos no se compensa totalmente con una ingestión de 0,1 % de los antioxidantes, reflejándose sólo en algunas funciones el efecto beneficioso de la misma.

Con la ingestión de la dieta que tenía 0,3% de TP+NAC, los resultados demostraron que en los ratones adultos se aumentó la adherencia de macrófagos y linfocitos, así como el anión superóxido intracelular no estimulado y el extracelular tanto estimulado como no estimulado. Todas esas funciones suponen un posible aumento de la situación de estrés oxidativo en los leucocitos. Curiosamente se aumentó la NK de bazo, lo cual puede también estar indicando un cierto desbalance redox (Soriani et al., 2014), ya que se ha comprobado que esta actividad puede estimularse significativamente en ratones con una situación de elevado estrés oxidativo como sucede en una endotoxemia letal (Victor y De la Fuente, 2003). Además, la quimiotaxis y la proliferación de los linfocitos de ganglios, bazo y timo disminuyó significativamente. Esto apunta a que la cantidad de antioxidantes ingeridos podría tener un cierto papel pro-oxidante, el cual ha sido comprobado para algunos compuestos antioxidantes ingerido en altas cantidades y en determinadas condiciones (Otero et al., 1997; Bowen y Omaye, 1998; Oldham y Bowen, 1998; Viña et al., 2007).

Cuando la dieta con 0,3% de los antioxidantes fue ingerida por ratones viejos, el efecto fue más positivo pues aumentó la fagocitosis de los macrófagos, la quimiotaxis de los linfocitos de ganglios y de forma muy clara la proliferación y la actividad NK. Ya se ha mencionado el papel relevante del GSH en la funcionalidad de los linfocitos, especialmente en su capacidad de proliferación, y como la disminución del mismo en las células de individuos viejos podría explicar el deterioro de las mismas (Stohs et al., 1984; Franklin et al., 1990). Parece ser que la ingestión de 0,3% de dos antioxidantes que aumentan los niveles de GSH en el organismo, y que también lo hacen en las células inmunitarias (Arranz et al., 2008), son útiles para restaurar los necesarios para llevar a cabo adecuadamente las funciones de los linfocitos de ratones viejos. Esto sin descartar el efecto directo de tales antioxidantes en los leucocitos, como ya se ha visto en los estudios *in vitro* de la presente tesis (Artículos 1-5).

Por tanto, los resultados, en conjunto, parecen sugerir que suplementar la dieta con 0,1% de TP+NAC podría ser adecuado para mejorar las funciones inmunitarias en ratones adultos, pero puede ser insuficiente en los viejos. Por su parte, la dieta con el 0,3% resulta elevada para los adultos y más conveniente, en el contexto inmunológico, para los animales viejos.

3.2.2.2. Efecto de una dieta suplementada con el antioxidante tioprolina (TP) sobre la funcionalidad de las células inmunitarias en ratones viejos

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación se había comprobado que la ingestión de una dieta suplementada con TP (0,07% p/p), durante 37 semanas por ratones Swiss viejos, estimulaba una serie de funciones de los linfocitos, como la quimiotaxis y la proliferación, las cuales se encontraban disminuidas respecto a las mostradas por los animales más jóvenes. Esa ingestión asemejó los valores de dichas capacidades funcionales a los que mostraban los animales de menor edad (De la Fuente et al., 1993). En la presente tesis se quiso comprobar si esa suplementación de TP podría ser efectiva si la ingestión de la dieta se llevaba a cabo durante sólo 5 semanas por los animales viejos y, además, si el efecto tenía lugar tanto en las funciones previamente estudiadas como en la actividad NK y en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Así mismo, se quiso estudiar el efecto de esa dieta en los niveles de corticosterona. Este experimento se recoge en el **Artículo 9**. Los resultados mostraron, en primer lugar, que los valores de los parámetros de función inmunitaria analizados en bazo y timo de los controles viejos (81 ± 2 semanas de edad), se encontraban disminuidos en comparación con los de animales más jóvenes, adultos-maduros (52±1 semana de edad). De este modo, la movilidad espontánea, la quimiotaxis, la respuesta proliferativa a la ConA, la actividad NK y la ADCC, fueron significativamente menores en células de ratones viejos que en las de los adultos. Por su parte, los niveles de corticosterona sérica estaban aumentados. Esa menor capacidad en las funciones de linfocitos de los ratones viejos, en relación a las de los adultos, ha sido también observadas en toda una serie de trabajos, llevados a cabo tanto en humanos como en animales de experimentación (Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2009a; Arranz et al., 2010a). En este sentido, con excepción de la ADCC, que es el primer y único trabajo en el que se valora, todos los demás resultados son coincidentes con los ya comentados en otros Artículos de la presente tesis, especialmente en el Artículo 8.

Los ingestión durante 5 semanas de una dieta suplementada con 0,07% p/p de TP mejoró significativamente todas las funciones estudiadas, asemejando sus valores a los de los ratones adultos, llegando en algunos casos a ser iguales a los de esa edad, como en la movilidad espontánea en timo y la ADCC en bazo. Se hace evidente que no es necesario un prolongado periodo de ingestión de la dieta suplementada, y que con 5 semanas se obtienen resultados similares a los obtenidos con 37 semanas, si se comparan las funciones coincidentes en los dos experimentos (De la Fuente et al., 1993). Lo que resulta curioso es que la ingestión de una dieta suplementada sólo con TP tenga un efecto más positivo, en funciones de linfocitos de bazo y timo de ratones viejos, que la dieta que contiene NAC y TP en cantidad algo mayor (Artículo 8). Lo que sí es posible resaltar es que la ingestión de una dieta suplementada con una cantidad semejante de TP (0,1% p/p) mejoró significativamente las funciones del proceso fagocítico de macrófagos peritoneales de ratones adultos y en mayor medida de aquellos que presentaban un envejecimiento prematuro (Correa et al., 1999a). El mecanismo por el que la TP mejora la función inmunitaria puede ser por su propiedad antioxidante, pero también mediante otras vías. Al igual que la NAC, la TP aumenta los niveles de GSH (Porta et al., 1991), y los tioles actúan modificando el estado redox celular, lo que permite una mejor señalización (Suthanthiran et al., 1990). Aunque la acción beneficiosa sobre la funcionalidad de las células inmunitarias que tiene la TP ya ha sido comprobada *in vitro*, tanto con leucocitos de adultos (Artículo 1 y 2) (Correa et al., 1999b), como de viejos (Artículo 4), y este antioxidante mejora el estado mitocondrial de los linfocitos en cultivo (recogido en la revisión: De la Fuente, 2008), la TP también puede actuar a un nivel general del organismo. Además, resulta curioso que si bien en animales de la misma edad (de 14 a 20 semanas) los efectos de 1 mM de TP y de NAC son semejantes mejorando las funciones de macrófagos (Artículo 1), cuando los animales son unos meses más mayores el efecto de la TP es mucho más significativo a esa concentración (Correa et al., 1999a). Todo ello, apunta a que la TP puede ser un antioxidante idóneo para mejorar la función inmunitaria y, consecuentemente, la salud en el envejecimiento, permitiendo una mejor longevidad. De hecho, la TP se ha comprobado aumenta la esperanza de vida de animales de experimentación (Oeriu y Vochitu, 1965; Miquel y Ecnómos, 1979; Navarro et al., 2007), hecho no consignado para la NAC.

Respecto a los niveles de corticosterona, el principal glucocorticoide en roedores, hay autores que mantienen que los niveles basales de esta hormona no cambian con la edad (Sonntag et al., 1987) y otros indican un aumento de la hormona (Sapolsky, 1992). En el contexto de la relación entre el sistema neuroendocrino y el inmunitario, de forma

clásica se relacionó el aumento de los glucocorticoides con una inmunosupresión (Madden y Felten, 1995; Ader et al., 2001). En trabajos previos de nuestro grupo se comprobó también un aumento del cortisol plasmática con la edad en seres humanos, y su relación con la disminución de las funciones inmunitarias, concretamente con las de los linfocitos (Vallejo et al., 2006). En el presente trabajo (Artículo 9), los ratones viejos tienen niveles mayores de corticosterona sérica que los adultos, lo que coincidiría con la idea antes comentada de un mayor estado de estrés emocional y un desajuste del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal al avanzar la edad, hecho que ha sido ampliamente demostrado tanto al considerar la edad cronológica como biológica (Vida et al., 2014; Cruces et al., 2014). Tras la ingestión de la dieta con TP los niveles de corticosterona bajaron significativamente, incluso llegando a valores menores que los de adultos. Se hace evidente que las estrategias que mejoran el sistema inmunitario en la vejez, como la ingestión de dietas con cantidades apropiadas de antioxidantes, y en el caso que nos ocupa de TP, también lo hacen del sistema neuroendocrino, esto es de los tres sistemas homeostáticos y su comunicación. De hecho, nuestro grupo de investigación ya comprobó que estas estrategias, además de proporcionar una mejor inmunidad, también mejoraban el sistema nervioso, teniendo lugar una más adecuada respuesta conductual de los animales (Guayervas et al., 2005; De la Fuente et al., 2011).

3.2.2.3. Establecimiento, en base a la relación entre la actividad exploratoria en un laberinto en T y la función inmunitaria, de un modelo de envejecimiento prematuro en ratones, en el que animales de la misma edad cronológica que realizan peor la prueba conductual presentan una mayor inmunosenescencia

Teniendo como base estudios previos en los que se comprobó que los ratones Swiss que exploraban de forma más “rápida” un laberinto en T presentaban, en relación a los de su misma edad que lo hacían de forma más “lenta”, una mejor longevidad (De Juan, 1994), y teniendo en cuenta la comunicación entre el sistema nervioso y el inmunitario y su deterioro al envejecer, se diseñó un experimento para estudiar, en un grupo de ratones Swiss viejos, las posibles diferencias en las capacidades funcionales de las células inmunitarias entre los animales que llevan a cabo la exploración del laberinto en T de forma más “rápida” y más “lenta” (**Artículo 10**).

Un grupo de ratones de 76 ± 1 semanas de edad se separó en dos grupos, los que recorrían el brazo largo del laberinto en T en más de 20 segundos las cuatro veces en las

que se les sometía a la prueba exploratoria (una vez a la semana cada dos semanas), a los que se les denominó “lentos”, y los que lo hacían en 20 o menos segundos, a los que se llamó “rápidos”. En macrófagos y linfocitos peritoneales se estudió la capacidad de adherencia, la movilidad espontánea y la dirigida (quimiotaxis), la fagocitosis de partículas inertes de los macrófagos y los niveles de anión superóxido, tanto en leucocitos no estimulados como estimulados con bolas de latex, y se analizaron los niveles intracelulares y extracelulares de este anión. En leucocitos de ganglios axilares, de bazo y de timo, se estudió la capacidad de movilidad espontánea y la quimiotaxis, así como la respuesta linfoproliferativa al mitógeno ConA y la actividad NK. Los resultados mostraron, curiosamente, diferencias entre ambos grupos, las cuales fueron estadísticamente significativas en prácticamente todas las funciones estudiadas, dándose una menor capacidad funcional, en general, en las células de los ratones “lentos”. Así, únicamente no se detectaron esas diferencias en la fagocitosis de macrófagos, en la quimiotaxis del timo y en la actividad NK de ganglios axilares y bazo. Las células inmunitarias de los “lentos” tenían menor movilidad espontánea y, especialmente, dirigida al foco infeccioso, menor proliferación en respuesta a mitógenos y menor actividad NK. En lo que respecta a los niveles de anión superóxido, los que son intracelulares en células estimuladas (necesarios para la digestión del material ingerido), se encuentran significativamente disminuidos en los “lentos” en comparación con los presentes en los “rápidos”. Sin embargo, los niveles extracelulares de anión superóxido, que son los implicados en el estado de estrés oxidativo y daño a moléculas, tanto de muestras estimuladas como no estimuladas, aparecieron con valores mayores en los “lentos”.

Dado que el envejecimiento va acompañado de una menor conducta exploratoria (Ordy et al., 1964), se podría decir que de partida los “lentos” son biológicamente más viejos y que los “rápidos” son biológicamente más jóvenes. La conducta de “freezing” que manifiestan los ratones “lentos” se ha asociado a una hiper-reactividad a situaciones novedosas y de estrés (Gilad y Gilad, 1995), como lo es el enfrentamiento al laberinto en T. Así, se planteó que estos animales “lentos” tenían una peor respuesta al estrés, un hecho típicamente relacionado con el envejecimiento (Stein-Behrens y Sapolsky, 1992; Bauer, 2005; Bauer et al., 2009). Estudios posteriores han caracterizado a estos animales “lentos”, tanto a nivel conductual, como de neuroquímica cerebral y de situación endocrina, comprobándose que presentan una hiper-emocionalidad y estado de ansiedad, y que sus monoaminas cerebrales y su corticosterona sérica, tienen valores típicos de ratones más viejos cronológicamente (Viveros et al., 2001; De la Fuente et al., 2003:

Pérez-Álvarez et al., 2005). Se ha hecho evidente que los “lentos” son, a nivel nervioso y endocrino, biológicamente más viejos que los “rápidos” (De la Fuente y Vida, 2013; Vida et al., 2014).

A nivel inmunológico, los resultados de la presente tesis demuestran que los “lentos” tienen una función inmunitaria más deteriorada que los “rápidos”, con cambios típicos que sugieren un estado de mayor inmunosenescencia en los “lentos”. La relación entre una temprana inmunosenescencia y una menor esperanza de vida ha sido reiteradamente mostrada en diversos estudios (Wayne et al., 1990; Pawelec et al., 1995). Se ha indicado que, para darse tal relación, la inmunosenescencia no debe aparecer en un único parámetro, sino con un conjunto de los mismos (Lehtonen et al., 1990). De hecho, hay toda una serie de estudios demostrando que los individuos que alcanzan una elevada longevidad, como los centenarios humanos y los ratones longevos, son los que mantienen unos parámetros inmunitarios propios de la edad adulta (Franceschi et al., 1995, 1996; Franceschi y Bonafe, 2003; Mocchegiani et al., 2003; Puerto et al., 2005; Alonso-Fernández et al., 2008; Arranz et al., 2010a,b,c; Alonso y De la Fuente, 2011). Estudios posteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han comprobado que los ratones “lentos”, que pueden ser detectados en cualquier grupo de animales, incluso cuando son cronológicamente jóvenes (Alvarado et al., 2005b, 2006a; Pérez-Álvarez et al., 2005) y adultos (Correa et al., 1999a; Viveros et al., 2001; Puerto et al., 2002; Guayerbas et al., 2002a,b,c, 2004, 2005a,b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Alvarado et al., 2006b; Álvarez et al., 2006a), y no sólo en la vejez, edad a la que se llevó a cabo este primer estudio de la presente tesis, muestran, en todos los casos, una prematura inmunosenescencia. Además, se ha comprobado que los “lentos” tienen una menor esperanzas de vida que los “rápidos” de su mismo grupo y edad cronológica (Guayerbas et al., 2002a,c; Guayerbas, 2004). Todo ello, nos ha permitido denominar a los “lentos” como “*prematurely ageing mice*” (PAM), mientras los “rápidos” serían “*non prematurely ageing mice*” (NPAM). De este modo hemos establecido un modelo de envejecimiento prematuro que nos ha permitido, y sigue permitiendo, hacer estudios sobre el efecto de estrategias, fundamentalmente nutricionales, para hacer más lento el proceso de envejecimiento y aumentar la longevidad (Vida y De la Fuente, 2013; Vida et al., 2014).

3.2.2.4. Efecto de una dieta suplementada con NAC y TP en las funciones de linfocitos de ratones viejos con envejecimiento prematuro. Comparación entre dos cepas de ratones

En el **Artículo 11** se han recogido los resultados de un estudio en el que, aprovechando el modelo de PAM y NPAM antes comentado, y utilizando ratones de una edad cronológica semejante a la del Artículo 10 (76 ± 2 semanas de edad), esto es, viejos, se quiso comprobar, en dos cepas de ratones (Swiss y BALB/c) el efecto de la ingestión, durante 5 semanas, de una dieta suplementada con 0,1% p/p de TP y NAC, en una serie de funciones inmunitarias de leucocitos de ganglios axilares, bazo y timo. El presente estudio se basó en uno previo en el que se había observado que ratones adultos, pero prematuramente envejecidos (PAM), en los que se demostraba una inmunosenescencia en una serie de funciones de linfocitos peritoneales, ganglios axilares, bazo y timo, la cual tenía lugar tanto en células de ratones BALB/c como de Swiss, la ingestión durante 5 semanas de una dieta enriquecida en NAC y TP al 0,1% p/p, mejoraba significativamente las funciones inmunitarias analizadas en ambas cepas de ratones, especialmente en los Swiss (Guayerbas et al., 2002b). En el trabajo de la presente tesis (**Artículo 11**), además de querer comprobar si esa misma dieta suplementada con NAC+TP podría mejorar la funcionalidad de linfocitos en PAM de ambas cepas, pero siendo cronológicamente viejos, se quiso determinar si tanto PAM como NPAM podrían recuperar los valores funcionales propios de la edad adulta tras la ingestión. Para ello, además de los grupos PAM y NPAM de Swiss y BALB/c, tanto controles (PAMC y NPAMC por estar siempre alimentados con dieta estándar) como los que ingirieron la dieta con antioxidantes (PAMA y NPAMA), se incluyó en el estudio un grupo de ratones, de ambas cepas, adultos (24 ± 2 semanas) como controles de edad. Se estudiaron en linfocitos de ganglios axilares, bazo y timo, la capacidad de quimiotaxis, la respuesta linfoproliferativa, tanto espontánea como frente al mitógeno ConA, la actividad *natural killer* (NK) y la liberación de la interleuquina-2 (IL-2) en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos de ganglios en presencia de ConA. Todas las funciones que se analizaron son las que claramente disminuyen con el envejecimiento (De la Fuente, 2009a; Alonso-Fernández y De la Fuente, 2011).

Los valores de las funciones estudiadas en los controles cronológicamente viejos fueron menores en PAMC que en NPAMC en las células de los tres órganos y cepas analizadas. Además, en todos los casos esos valores de PAMC, pero también de NPAMC fueron significativamente menores que los detectados en los adultos. Esto demostraba la

inmunosenescencia por la mayor edad cronológica de los PAMC y NPAMC, y por el envejecimiento prematuro de los PAMC, en las dos cepas de ratones. Tras la ingestión durante 5 semanas de la dieta suplementada con NAC y TP los valores de las funciones estudiadas aumentan, en prácticamente todos los casos (sólo no resultó estadísticamente significativa la diferencia en la proliferación basal, en la de respuesta al mitógeno en bazo de Swiss NPAM y en la quimiotaxis de timo de BALB/c NPAM), y se aproximan a los valores que las mismas muestran en los ratones adultos. Así, se alcanzaron los niveles funcionales de los adultos en casi todos los casos, como en la quimiotaxis de las células de los tres órganos, en la respuesta proliferativa al mitógeno (con la excepción de los BALB/c PAM en timo) y en la actividad NK (con excepción de células de bazo en Swiss NPAM y en las células de timo de todos los grupos). En la IL-2 de ganglios incluso se superan los valores adultos en los BALB/c. Comparando las dos cepas, los adultos BALB/c tienen valores mayores en funciones como la NK y los niveles de IL-2 que los Swiss, aunque menores de proliferación. De forma similar en los ratones cronológicamente viejos, los BALB/c tienen valores mayores de NK (pero sólo en timo) y de IL-2, y menores de proliferación en bazo y timo. En el estudio previo ya mencionado (Guayerbas et al., 2002b), con animales PAM y NPAM adultos, los resultados fueron semejantes en el sentido de tener un efecto positivo de esa misma dieta en PAM y en NPAM, aunque en el caso de los adultos los PAM mostraron más efecto que los NPAM, y en Swiss más que en BALB/c. Si se comparan los resultados obtenidos en el presente estudio, en el que una dieta con 0,1% de TP+NAC produce un efecto muy positivo en prácticamente todas las funciones de linfocitos analizadas, con los comentados en el Artículo 8, en el que se observaba que en ratones cronológicamente viejos esa cantidad de antioxidantes podría ser insuficiente y era más recomendable la de 0,3%, parecería que hay una cierta contradicción. No obstante, hay que tener en cuenta que en el experimento del Artículo 8, los ratones Swiss eran cronológicamente viejos, pero no estaban clasificados en PAM y NPAM. Recordemos que los NPAM son biológicamente más jóvenes que los PAM de su misma edad cronológica, y a aquellos una cantidad menor de antioxidantes ya les puede resultar positiva. De este modo se sugiere estudiar el efecto de esa dieta con 0,3% de los antioxidantes en ratones viejos clasificados en PAM y NPAM antes de poder afirmar la idea de tener que aumentar la cantidad de antioxidantes con que suplementar a los individuos cronológicamente viejos.

3.2.2.5. Efecto de la ingestión durante 15 y 30 semanas de dietas con antioxidantes nutricionales de tipo polifenólico en la función inmunitaria de ratones viejos

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta. No obstante, los estudios sobre el efecto de estos compuestos fenólicos, presentes en alimentos de consumo habitual como los cereales, sobre la función inmunitaria son muy escasos y en el envejecimiento son prácticamente inexistentes. En un trabajo previo, nuestro grupo de investigación comprobó que ratones adultos que ingerían una dieta suplementada con cereales ricos en polifenoles durante 5 semanas mejoraban la función y el estado redox de sus leucocitos (Álvarez et al., 2006a). Esta dieta suplementada con cereales también mejoró la función inmunitaria en ratones adultos pero prematuramente envejecidos (PAM) (Álvarez et al., 2006b). Como este tipo de dietas se pueden ingerir de forma prolongada y no se conocía su efecto en individuos cronológicamente viejos, se llevó a cabo el estudio del efecto de un suplemento del 20% en la dieta con cuatro diferentes galletas fabricadas con cereales ricos en polifenoles por DANONE Vitapole (Francia). La dieta se suministró durante periodos largos de 15 y 30 semanas, y se analizó su efecto en varias funciones de las células inmunitarias peritoneales de ratones ICR (CD1) (los antiguamente denominados Swiss), en la edad madura (49 ± 2 semanas de edad) y en la vejez (64 ± 2 semanas), respectivamente (**Artículo 12**). Las funciones estudiadas en los leucocitos peritoneales, muestran, en general, los cambios típicos del avance de la edad al compararse sus valores en los ratones cuando son maduros y cuando son viejos. Así, al envejecer, se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el aumento de la adherencia de macrófagos y en la disminución de la fagocitosis de estas células, en los niveles de anión superóxido intracelular, en la quimiotaxis de linfocitos, en la respuesta proliferativa a ConA y LPS, y en la secreción de IL-2 en cultivos de los leucocitos estimulados con estos mitógenos. La secreción de la citoquina pro-inflamatoria TNF α , aumentó al avanzar la edad. Todos esos cambios han sido observados en estudios previos en los que se comparaban esas funciones inmunitarias en animales adultos y viejos (De la Fuente et al., 2004b; De la Fuente, 2009a; Alonso-Fernández y De la Fuente, 2011). En el presente trabajo son los mismos animales los que manifiestan esos cambios al ser analizados cuando son maduros y cuando son viejos.

Tras la ingestión de la dieta suplementada con las fracciones de cereales ricas en polifenoles (CO49, CO50, CO52 y CO53, con la composición que se indica en la tabla 1 del Artículo 12), entre los que se encuentran principalmente del grupo de los ácidos

fenólicos (hidroxibenzoico, vanílico, cumárico, sinápico, ferúlico y orizanol) y en menor cantidad flavonoides (catequinas y rutina), se observó una mejoría en las funciones estudiadas. Esto supone una disminución de las funciones que aumentan con la edad, como la adherencia de macrófagos y linfocitos, y la secreción de $TNF\alpha$, así como una estimulación de las que disminuyen con el envejecimiento, como la quimiotaxis, la fagocitosis, la capacidad digestiva (valorada por los niveles de anión superóxido intracelular), la respuesta proliferativa de los linfocitos a ConA y a LPS, la secreción de IL-2 y la actividad antitumoral NK. Lógicamente, dependiendo del tipo de galletas se encontraron más efectos en unas funciones que en otras, y según la función considerada resultó más efectiva la ingestión durante 15 ó 30 semanas.

La disminución que detectó en la capacidad de adherencia de macrófagos y linfocitos, puede ser entendida en base a la capacidad antioxidante de los polifenoles. Como ya se ha comentado una situación de estrés oxidativo, como la que tiene lugar al envejecer, aumenta la expresión de moléculas de adhesión en los leucocitos (De la Fuente et al., 2004b,2005). Algunos polifenoles son capaces de disminuir la expresión de tales moléculas en células endoteliales, como se ha comprobado para el ácido ferúlico (Ma et al., 2010). Otros polifenoles, como es el caso de las catequinas, también disminuyen la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y la capacidad de adherencia de los leucocitos (Hofbauer et al., 1999; Koga y Meydani, 2001; Melgarejo et al., 2009). Estos dos tipos de polifenoles se encuentran en las galletas estudiadas, especialmente el ácido ferúlico que está en relativamente alta cantidad en todas ellas. De hecho, se sabe que este ácido ferúlico es el más abundante en los granos de los cereales (García-Conesa et al., 1997). Así, este antioxidante podría ser el responsable de la disminuida adherencia encontrada en los leucocitos peritoneales de los ratones. Esta disminución resultó más significativa en los animales viejos, tras 30 semanas de ingestión de la dieta.

La quimiotaxis, que disminuye al envejecer, aumenta tras la ingestión de las dietas con polifenoles, especialmente en los linfocitos cuya quimiotaxis se estimula en todos los casos, alcanzando diferencias estadísticamente significativas con excepción de lo que sucede con CO52 tras 15 semanas. De nuevo, 30 semanas resultó un periodo más efectivo que 15 para estimular esta función. Así, en macrófagos sólo aparecen estimulaciones estadísticamente significativas con CO50 y CO53 tras las 30 semanas de ingestión de la dieta. Hay pocos estudios sobre el efecto de los polifenoles en esta función. Se ha comprobado que en neutrófilos *in vitro*, varios polifenoles aumentan la migración (Kenny

et al., 1990). Nuestro grupo de investigación observó un aumento de la quimiotaxis en macrófagos peritoneales de ratones prematuramente envejecidos tras ingerir 5 semanas un cereal rico en rutina (Álvarez et al., 2006b), polifenol presente en CO50 y CO53, así como en macrófagos y linfocitos de ratones adultos que ingirieron durante ese tiempo unas dietas ricas en polifenoles (Álvarez et al., 2006a).

La fagocitosis de partículas por parte de los macrófagos, función que disminuye al envejecer, aumentó, en general, tras 15 semanas de ingestión de las dietas (con excepción de la que tenía CO50). No obstante, tras 30 semanas no se obtuvieron efectos, e incluso se observó una disminución de la fagocitosis con la dieta de CO50. Es posible que la diferente composición en cantidad y presencia de polifenoles de las galletas explique este hecho. Así, puesto que se ha comprobado que un derivado de catequina estimula la fagocitosis de células de kupffer de cobayas (Piazza et al., 1985), en CO49 y CO52, la presencia de catequinas podría explicar sus efectos más estimuladores de la fagocitosis de macrófagos en comparación con los que producen las otras galletas, especialmente tras 15 semanas de ingestión. Algunos polifenoles como el resveratrol y la quercetina se ha comprobado que aumentan *in vitro* la fagocitosis de levaduras en líneas celulares humanas de promonocitos (Bertelli et al., 1999). En un estudio previo de nuestro grupo, se comprobó que la ingestión de una dieta suplementada con cereales ricos en polifenoles aumentaba la capacidad de fagocitosis de los macrófagos peritoneales de ratones prematuramente envejecidos (Álvarez et al., 2006b).

Con respecto a los niveles de anión superóxido intracelular, los cuales disminuyen en los leucocitos de animales viejos en comparación con los maduros, lo que coincide con resultados previos (De la Fuente et al., 2004b), la ingestión de las dietas con polifenoles aumentó tales niveles únicamente en el caso de CO52, tras 30 semanas de ingestión y en las muestras estimuladas. Ya se ha mencionado en otros artículos de la presente tesis que la presencia *in vitro* de varios antioxidantes como el ácido ascórbico, la vitamina E, el glutatión, la tioprolina y la N-acetilcisteína pueden aumentar estos niveles intracelulares de anión superóxido (Artículo 1 y 3), lo que también se ha visto tras la ingestión de dietas con suplementos de vitamina E (Artículo 6), y NAC+TP (Artículo 8), aunque no se ha encontrado ese efecto en otros casos (Artículo 7). Los polifenoles han demostrado su carácter antioxidante disminuyendo las ROS extracelulares (Martinez y Moreno, 2000; O'Dowd et al., 2004). En el presente trabajo se consideró el anión superóxido intracelular y los niveles del mismo, más relacionado con la capacidad digestiva de las células, resultaron aumentados tras la ingestión durante 5 semanas de dietas suplementadas con

cereales ricos en polifenoles en ratones cronológicamente adultos (Álvarez et al., 2006a) y en adultos con envejecimiento prematuro (Álvarez et al., 2006b). Si bien se ha publicado que el ácido ferúlico inhibe la formación de anión superóxido en macrófagos peritoneales de ratón (Kaul y Khanduja, 1999), este es considerado en general (intracelular y extracelular), pues de hecho, la ingestión de las galletas CO52, que son las que mayores cantidades de ácido ferúlico tienen, son las únicas que estimulan significativamente los niveles de anión superóxido tras 30 semanas de ingestión.

La función proliferativa de los linfocitos en respuesta a los mitógenos disminuyó al envejecer, lo que es coincidente con lo existente en la bibliografía y con los resultados previos de la presente tesis ya comentados (Artículo 4, 8 y 11). La ingestión de las galletas con polifenoles aumentó, en general, esta función, llegándose a mayores diferencias estadísticamente significativas en el caso del mitógeno ConA a las 15 semanas de ingestión, mientras que con el LPS se consiguió mayor efecto a las 30 semanas. Con CO52 se obtuvo estimulación en todos los casos. Un estudio *in vitro* en humanos ha comprobado que polifenoles como el ácido ferúlico, el vanílico y el cumárico aumentan la proliferación de linfocitos (Chiang et al., 2003). También en los estudios de nuestro grupo, con cereales ricos en polifenoles, se observó una estimulación de la proliferación de linfocitos, siendo el cumárico el candidato a mediar este efecto (Alvarez et al., 2006a,b). Curiosamente la CO52 tiene vanílico y es la que más cumárico y ferúlico contiene. Respecto a la secreción de IL-2, que disminuye al avanzar la edad siguiendo lo habitualmente mencionado en la bibliografía y observado en resultados previamente comentados de la presente tesis (Artículo 11), sus niveles aumentan tras 15 semanas de ingestión de la dieta con polifenoles, siendo la diferencia con los controles significativa en todos los casos a excepción de cuando se ingirió la CO52. Es difícil de sugerir a qué polifenol se debe ese efecto pues si bien en un estudio utilizando catequinas se observó una disminución de la proliferación de linfocitos T y una menor expresión de receptores de IL-2 y de su señalización en estas células (Wu et al., 2009), la presencia de catequinas se da en igual cantidad en la dieta con CO49 y con CO52, y la primera estimula y la segunda no, la secreción de IL-2 tras 15 días de ingestión. A los 30 días ninguna de las dietas tiene efecto sobre este parámetro, lo que es coincidente con estudios en los que no se encontraron efectos de los polifenoles en la secreción de IL-2 (Miles et al., 2005).

La actividad NK fue estimulada por la ingestión de las dietas con polifenoles en todos los casos, con la excepción del grupo que ingirió CO49 durante 15 semanas. Precisamente es la dieta con CO49 la que menos cantidad de ácido ferúlico y sinápico

tiene, y estos, a través de sus efectos en citoquinas como el IFN γ y el TNF α (Chiang et al., 2003; Zeng et al., 2013), podrían incidir en la función NK. Coincidiendo con los resultados del presente estudio sobre el efecto en la actividad NK de las dietas enriquecidas en estos antioxidantes, en un trabajo con zumos de frutas ricos en polifenoles ingeridos durante 10 semanas, en humanos, se obtuvo también una estimulación de esta actividad NK (Bub et al., 2003). Se ha comprobado que la actividad NK puede ser estimulada por catequinas *in vitro* (Exon et al., 1998), y también por las ingeridas en ratones con senescencia acelerada (Shimizu et al., 2010). Nuestro grupo de investigación comprobó que, en ratones con envejecimiento prematuro, la ingestión de cereales ricos en polifenoles aumentó la actividad NK de los leucocitos peritoneales (Álvarez et al., 2006b). No obstante, hay estudios, como el llevado a cabo en humanos con polifenoles del vino tinto, en los que no se observa ningún efecto de los mismos sobre la actividad NK (Watzl et al., 2004).

El aumento en la secreción de una citoquina pro-inflamatoria como el TNF α al avanzar la edad (De la Fuente et al., 2004b), se apreció en el presente trabajo. La ingestión de las galletas produjo una disminución en esta citoquina sólo a las 30 semanas y con CO52. Hay algunos estudios sobre el papel de los polifenoles en el TNF α , pero son contradictorios. Con catequinas, los polifenoles más estudiados en este sentido, se ha observado una inhibición en macrófagos de ratón, pero no se han encontrado efectos en la línea de monocitos/macrófagos RAW 264.7 (Wang y Mazza, 2002) o en cultivos de sangre humana (Crouvezier et al., 2001). Con una dieta suplementada con cereales ricos en polifenoles los leucocitos peritoneales de ratones adultos disminuyeron su secreción de TNF α , con excepción de un tipo de cereal que carecía de ácido cumárico (Álvarez et al., 2006a). En el presente trabajo la galleta que más efecto hizo fue precisamente la que contenía mayor cantidad de este polifenol, la CO52. No obstante, otros investigadores no han encontrado ningún efecto en la producción de esta citoquina en sangre total en presencia de ácido cumárico (Miles et al., 2005).

Los estudios sobre los efectos beneficiosos de dietas ricas en polifenoles sobre la función inmunitaria en individuos biológicamente o cronológicamente viejos son muy escasos. Si bien se ha comprobado que las catequinas del té verde en ratones con senescencia acelerada (Shimizu et al., 2010), la soja y el té verde en ratones viejos y muy viejos (Baeza et al., 2007, 2008, 2010) y los cereales ricos en polifenoles en ratones maduros y en los prematuramente envejecidos (Álvarez et al., 2006b, 2008), mejoran diversas funciones inmunitarias, el presente trabajo es el primero que demuestra el efecto

positivo de ingerir en la dieta de forma habitual cereales ricos en polifenoles para conseguir mantener una mejor función inmunitaria en el proceso de envejecimiento.

Efectos en la función inmunitaria de septuagenarios de la ingestión de suplementos de vitamina C y vitamina E

Una vez comprobado como el hecho de suplementar la dieta con cantidades apropiadas de diversos antioxidantes mejoraba la función inmunitaria en animales de experimentación, tanto adultos como, especialmente, en viejos, se pasó a comprobar si tales efectos se podrían reproducir también en los seres humanos. Los Artículos 13,14 y 15 de la presente tesis recogen los resultados de los efectos de la ingestión de suplementos de antioxidantes como la vitamina C y la E, en la funcionalidad de las células inmunitarias de personas con una edad media de 70 años.

Si en la vejez tiene lugar el hecho biológico de un mayor estado de oxidación y el deterioro fisiológico que lo acompaña, en el caso del ser humano aparecen, además de las modificaciones biológicas y psicológicas, toda una serie de cambios sociales e incluso económicos que pueden incidir en el estado nutricional de las personas. De hecho, se ha indicado que hay un estado de malnutrición en la vejez (Volkert, 2013; Porter Starr et al., 2015).

3.2.2.6. Efecto de la ingestión durante 4 meses de un suplemento de vitamina C (1g/día) y vitamina E (200 mg/día) en la función inmunitaria, los niveles de peróxidos de lípidos y de cortisol de mujeres septuagenarias, sanas y con dos patologías

La primera aproximación de la presente tesis para comprobar el efecto positivo de un suplemento con los mencionados antioxidantes en humanos se lleva a cabo en el estudio que se recoge en el **Artículo 13**. Se analizó en mujeres de 72 ± 6 años de edad, y tanto sanas como con dos patologías bastante frecuentes al envejecer, como son la depresión y las cardiopatías coronarias, el efecto de ingerir un suplemento de vitamina C (1 g/día) y E (200 mg/día) durante 16 semanas, esto es, 4 meses. Las mujeres del grupo de depresión fueron diagnosticadas mediante la entrevista SCID-UP (Spitzer y Williams, 1983) y siguiendo el criterio diagnóstico DSM-III-R aplicado por el Dr. Alvaro Prieto. La enfermedad coronaria fue establecida mediante angiografía en la que se estableció arterias coronarias ateroscleróticas con estrechamiento de la mayor parte de estos vasos,

así como por el padecimiento de infartos de miocardio, confirmados por electrocardiogramas convencionales. El seguimiento de estas pacientes fue también llevado a cabo por el Dr. Alvaro Prieto, y ninguna de las participantes en el estudio fue ingresada durante el tiempo en el que se desarrolló el mismo. Aunque las pacientes tomaban medicamentos, como diuréticos e inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, en el caso de las que tenían patología coronaria, y antidepresivos, en el de las que mostraban depresión, no se encontró, en el momento en el que se llevaba a cabo el estudio, ningún dato que indicase una interferencia entre tales fármacos y las vitaminas del suplemento. En los tres grupos de mujeres se analizó, en los neutrófilos, la capacidad de adherencia, de quimiotaxis, de fagocitosis y los niveles de anión superóxido. En los mononucleares (fundamentalmente linfocitos), la proliferación basal y la estimulada por presencia del mitógeno fitohemaglutinina (PHA). También se analizaron, en el suero, los niveles de malondialdehído (MDA), como indicador de la peroxidación lipídica, y los de cortisol, hormona indicativa de situación de estrés emocional y estrechamente relacionada con el estado inmunitario. Antes de la ingestión del suplemento vitamínico se observaron unos niveles de MDA significativamente muy elevados en los dos grupos de pacientes en comparación con las sanas de la misma edad. Niveles parecidos de MDA se han obtenido por Meydani et al. (1991b), utilizando un método similar de medida. Este hecho nos está indicando el mayor estado de oxidación de las mujeres con depresión y cardiopatía coronaria en comparación con las sanas de la misma edad cronológica. De hecho, toda una serie de trabajos han demostrado la estrecha relación entre una situación de estrés oxidativo y esas patologías. Así, la aparición de las cardiopatías isquémicas se asocia a la presencia de una situación de estrés oxidativo (Siddiqui et al., 2014; Gruzdeva et al., 2014; Uppal et al., 2014) y a una disminución de las defensas antioxidantes (Buko et al., 2014; Siddiqui et al., 2014; Abe et al., 2014). Por otra parte, la depresión, como otros desórdenes psiquiátricos, se encuentra claramente relacionada con una situación de estrés oxidativo (Milaneschi et al., 2013; Pandya et al., 2013), habiéndose detectado también en personas deprimidas niveles disminuidos de antioxidantes y aumentados de marcadores oxidantes (Cumurcu et al., 2009; Maes et al., 2011; Prohan et al., 2014). Dado que se ha comprobado que una situación de estrés oxidativo se relaciona con una peor función inmunitaria (Vida et al., 2014), no resulta extraño que las mujeres con los dos tipos de patologías manifiesten peores capacidades en sus células inmunitarias que las del grupo de controles sanas de la misma edad. Así, las mujeres con depresión y enfermedad coronaria presentan una significativamente menor fagocitosis de los neutrófilos y de la respuesta proliferativa de los linfocitos a la PHA. Toda una serie de trabajos han

demostrado que individuos con depresión y cardiopatías isquémicas tienen una peor inmunidad (Stein et al., 1991; Hernanz et al., 2008; Arranz et al., 2009; Zunszain et al., 2013; Epelman et al., 2015). La adherencia de neutrófilos al endotelio es menor en las mujeres que tienen enfermedad coronaria, y lo mismo sucede con la fagocitosis de estos neutrófilos. Es curioso que dos actividades que están aumentadas en las células fagocíticas que participan en la formación de las placas de ateroma, las cuales están presentes en las coronarias de estas pacientes, se encuentren disminuidas en los neutrófilos de sangre circulante. Por su parte, los niveles de anión superóxido de los neutrófilos están significativamente aumentados en los dos grupos de pacientes. Si bien en los leucocitos peritoneales de ratones y de cobayas, los mayores niveles de anión superóxido intracelulares se relacionan con una mejor respuesta funcional (Artículos 1, 3, 6, 8, y 12), mientras que el aumento en los niveles extracelulares lo hacen con una situación de estrés oxidativo (Artículo 8), en los niveles de este anión en neutrófilos humanos hay mucha controversia. No obstante, utilizando la misma metodología que en la presente tesis, la mayoría de los trabajos encuentran niveles de anión superóxido superiores en los neutrófilos de los hombres y mujeres que tienen peor situación inmunitaria (Arranz et al., 2008; Alonso-Fernández et al., 2008; Maté, 2015). Una posible explicación podría ser que en animales de experimentación los niveles de anión superóxido se miden en población de leucocitos, siendo los macrófagos los que prioritariamente lo producen, y estos fagocitos son células de larga vida, a diferencia de los neutrófilos (en donde se mide el anión superóxido en humanos) que mueren pronto tras llevar a cabo la fagocitosis y liberación de los compuestos oxidantes (Bainton, 1980).

Tras la ingestión durante 16 semanas de 1 g/día de vitamina C y 200 mg/día de vitamina E, todos los parámetros analizados mejoran y, en general, lo hacen significativamente en los tres grupos de personas. Ya se ha comentado que al envejecer hay mayores niveles de oxidación, la cual afecta a todas las células del organismo y de forma más evidente a las de los sistemas reguladores como el nervioso, el endocrino y el inmunitario (Vida et al., 2014), estando esta oxidación en la base de muchas patologías, entre las cuales se encuentran claramente las neurológicas y las cardíacas (Milaneschi et al., 2013; Pandya et al., 2013; Siddiqui et al., 2014; Gruzdeva et al., 2014; Uppal et al., 2014). Por ello, la ingestión de antioxidantes, como los utilizados en el presente trabajo, disminuye el riesgo de patologías cardiovasculares y coronarias (Jialal et al., 1990; Meydani et al., 1995). Dado que la oxidación puede afectar de forma clara a los leucocitos, células que circulan por los vasos, y que son especialmente sensibles al estado oxidativo del individuo (Lustyik et al., 1990; Meydani et al., 1995), parece evidente que

al disminuir tal oxidación por la ingestión de los suplementos de antioxidantes, se mejoren todas las funciones inmunitarias. La efectividad de la suplementación utilizada queda patente en la disminución significativa de los niveles de MDA séricos. Si como indicó Meydani (1991b) estos niveles de MDA tienen una capacidad supresora de la función inmunitaria, al disminuirse por la ingestión de los antioxidantes, se mejora la respuesta inmunológica. Comparando los resultados del presente trabajo con los publicados por Meydani et al. (1991b), las diferencias que esos investigadores encontraban en los niveles de MDA entre los individuos mayores y jóvenes eran similares a los aquí observados entre antes y después de tomar las vitaminas, lo que apunta a un rejuvenecimiento en el estado de oxidación tras la ingestión de las mismas en las mujeres del presente estudio. Resultados similares se han obtenido tras la ingestión de NAC por mujeres postmenopáusicas, las cuales presentaban elevados valores de MDA séricos en comparación con los de las de las adultas antes de iniciarse la administración del antioxidante. Tras dos meses de ingerir 600 mg/día de NAC, los niveles de MDA disminuyeron significativamente asemejándose a los de las mujeres de edad adulta (Arranz et al., 2008). Este efecto de la suplementación con antioxidantes explicaría que la misma activase, en el presente estudio, la quimiotaxis y la fagocitosis de neutrófilos y la respuesta proliferativa de los linfocitos, mientras que disminuye los niveles de anión superóxido. La adherencia de neutrófilos también aumenta tras la ingestión de los antioxidantes. Ya se ha comentado que un aumento de adherencia si va seguido de una mayor quimiotaxis es una ventaja para llegar al foco infeccioso. Curiosamente, el aumento de adherencia no alcanza significación estadística en las mujeres con depresión, aunque son sus neutrófilos los que mayores aumentos experimentan en la quimiotaxis. En relación a la función de linfocitos estudiada, la proliferación, de la que ya se ha comentado su relevancia en la respuesta inmunitaria y como es una de las actividades que más se deteriora al envejecer, pero también en ciertas patologías como la depresión (Hernanz et al., 2008) y la ansiedad (Arranz et al., 2008), apareció aumentada en los tres grupos tras la suplementación con los antioxidantes. La vitamina E ha demostrado ser capaz en humanos de aumentar esta función cuando la misma se encuentra disminuida (De la Fuente y Victor, 2000), y se ha sugerido que una de las acciones de los antioxidantes en esta función podría ejercerse a través de su capacidad de disminuir la apoptosis (Briehl y Baker, 1996). Efectos similares en las funciones inmunitarias han sido también encontrados en las mujeres postmenopáusicas, antes mencionadas, tras la ingestión de otro antioxidante como es la NAC (Arranz et al., 2008).

La suplementación utilizada disminuye los niveles de cortisol sérico, y de forma estadísticamente significativa en las mujeres con enfermedad coronaria. En el contexto de la comunicación neuroinmunoendocrina, se sabe que el estrés emocional, valorado por un aumento en los niveles de glucocorticoides, se relaciona con el estrés oxidativo y el deterioro inmunológico (Cruces et al., 2014). De hecho, mayores niveles de cortisol se han relacionado con una peor inmunidad en individuos adultos (Blalock, 1989), en el envejecimiento cronológico y biológico (Guayerbas, 2003; Vallejo et al., 2006), así como en individuos con ansiedad (Arranz et al., 2007; Vida et al., 2014). Los niveles de cortisol sérico valorados en el presente trabajo son significativamente más elevados en las mujeres con ambas patologías, lo que ratifica la relación entre situación de estrés oxidativo y estrés emocional, y la peor función inmunitaria. La ingestión de antioxidantes disminuye el cortisol sérico en las cardiópatas, lo que puede relacionarse con la mejoría en las funciones inmunitarias estudiadas.

3.2.2.7. Efecto de la ingestión durante 3 meses de un suplemento de vitamina E (200 mg/día), de vitamina C (500 mg/día) o de vitamina C (500 mg/día) conjuntamente con vitamina E (200 mg/día) sobre la función inmunitaria de hombres y mujeres septuagenarios, y comparación de los valores obtenidos con los de adultos

Conocido el efecto positivo de la ingestión de un suplemento con vitamina C y vitamina E por mujeres septuagenarias, se quiso comprobar si la ingestión de cada una de esas vitaminas por separado, la vitamina E en la cantidad ya utilizada en el trabajo anteriormente comentado, pero ingerida sólo durante 3 meses (**Artículo 14**) y la vitamina C en una cantidad menor (500 mg/día), así como la ingestión conjunta de los dos antioxidantes, vitamina C (500 mg/día) y vitamina E (200 mg/día) durante 3 meses (**Artículo 15**) podría mejorar la función inmunitaria tanto en mujeres como también en hombres de setenta años. Además, se incorporó un grupo de mujeres y hombres adultos, de treinta años, para poder determinar si los parámetros inmunitarios estudiados se deterioraban por el envejecimiento y la ingestión de los mencionados suplementos conseguían asemejarlos a los valores presentes en los individuos adultos. Otro objetivo que se planteó fue el conocer si tras 6 meses sin ingestión de ningún suplemento, los niveles en los parámetros analizados se mantenían o volvían a los iniciales. Los parámetros analizados fueron la adherencia y quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos, la capacidad de ingestión de partículas y los niveles de anión superóxido de neutrófilos, la

proliferación en respuesta a PHA, los niveles de IL-2 secretados en presencia de PHA y la actividad NK de las células mononucleares (principalmente linfocitos).

Los resultados correspondientes al **Artículo 14** muestran que si se comparan los valores de los parámetros analizados antes del tratamiento entre los adultos ($29,7 \pm 4,9$) y los septuagenarios ($70,4 \pm 5,1$ años de edad), se aprecia un aumento de la adherencia tanto de neutrófilos como de linfocitos y tanto en hombres como en mujeres, al envejecer. Se confirma, de nuevo, que esta capacidad, la primera que se establece en el proceso fagocítico de los neutrófilos y en la respuesta de los linfocitos, aumenta en situaciones de estrés oxidativo, como lo es la vejez y también el shock endotóxico, por la mayor expresión de las moléculas de adhesión en estas células (Damtew et al., 1990; Hirokawa, 1999; De la Fuente y Victor, 2000; De la Fuente et al., 2004b, 2005; Alonso-Fernández et al., 2008; Arranz et al., 2008; Maté, 2015). La movilidad dirigida o quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos disminuye significativamente en los septuagenarios en comparación con los adultos, tanto en hombres como en mujeres. Resultados similares han sido ya observados en otros estudios (Niwa et al., 1989; Di Lorenzo et al., 1999; Fulop et al., 2004; De la Fuente et al., 2005; Alonso-Fernández et al., 2008; Arranz et al., 2008; Huang et al., 2011; Maté, 2015). La menor capacidad de las células inmunitarias para alcanzar el foco infeccioso que tiene lugar al envejecer, y que parece no deberse a cambios en los valores de quimioquinas, podría ser la responsable del mayor tiempo en la curación de heridas que tiene lugar en la vejez (Brubaker et al., 2013). Se ha propuesto que esta menor quimiotaxis puede deberse a la inducción, por el estado de estrés oxidativo al envejecer, del “factor de inhibición de la migración de los macrófagos “ (MIF), el cual inhibe la quimiotaxis (Calandra et al., 1998; Calandra, 2003). Lo que sí parece aumentar con la edad es una movilidad aberrante de las células inmunitarias. De hecho, se ha comprobado que a partir de los 60 años la movilidad espontánea y defectuosa aumenta (Sapey et al., 2014; Maté, 2015). Esta mayor migración ineficiente podría aumentar el daño tisular, ya que los neutrófilos, por ejemplo, secretan proteasas para facilitar su migración a través de los tejidos. Esto extendería la inflamación y afectaría la resolución de la misma en las personas mayores (Shaw et al., 2010).

En lo que respecta a la capacidad de fagocitosis de los neutrófilos, los resultados del presente trabajo muestran una disminución de la misma en las mujeres septuagenarias. Una menor fagocitosis de los neutrófilos al avanzar la edad ya ha sido comprobada en otros estudios (Butcher et al., 2001; De la Fuente et al., 2005; Alonso-Fernández et al., 2008; Arranz et al., 2008; Simell et al., 2011; Sharma et al., 2014; Maté,

2015). Parece ser que esta disminución se podría deber, en parte, a la menor expresión en la superficie de los neutrófilos del receptor Fc γ CD16, el cual media esta actividad. De hecho, se ha propuesto que es la pérdida de expresión del CD16 el principal responsable del deterioro funcional de estas células y del consecuente aumento de la susceptibilidad a las infecciones que tiene lugar al avanzar la edad (Butcher et al., 2001). También, en personas mayores se ha relacionado la menor expresión de estos receptores con la mayor probabilidad de fallecimiento (Pawelec et al., 1998). Los niveles de anión superóxido aumentan significativamente en los septuagenarios, tanto en hombres como en mujeres, y tanto en condiciones de no estimulación como de estimulación. Esto es coincidente con lo observado en otros estudios (Arranz et al., 2008; Alonso-Fernández et al., 2008; Maté, 2015).

La actividad NK frente a células tumorales se encuentra disminuida en los septuagenarios, tanto hombres como mujeres, en relación a los adultos. Aunque hay algunos datos contradictorios, la mayoría de los resultados encontrados en seres humanos coinciden en una menor actividad NK al envejecer (Mariani et al., 1996; Di Lorenzo et al., 1999; Solana y Mariani, 2000; Arranz et al., 2008; Maté, 2015). Un posible responsable de esta menor actividad NK podría ser la disminución en la expresión de receptores como los NKp30 y NKp46, llamados receptores de citotoxicidad natural (NCRs, del inglés *Natural Cytotoxicity Receptors*) e implicados en el reconocimiento y eliminación de las células diana (Almeida-Oliveira et al., 2011).

La respuesta proliferativa de los linfocitos, especialmente de los T, a mitógenos es una capacidad que disminuye al envejecer, como ha sido ampliamente demostrado (Inkeles et al., 1977; Gillis et al., 1981; Song et al., 1993; De la Fuente y Víctor, 2000; De la Fuente et al., 2005; Arranz et al., 2008; Maté, 2015). Dado que la secreción de IL-2, la citoquina más relacionada con la capacidad proliferativa de los linfocitos T, también disminuye en los septuagenarios (hombres y mujeres), como se ha comprobado en otros trabajos (Maté, 2015), este podría ser uno de los mecanismos implicados en la menor proliferación linfoide (Nagel et al., 1988). No obstante, ya se comprobó que los linfocitos T de personas mayores no respondía a la PHA y a la IL-2 exógena como las de los adultos (Gillis et al., 1981), lo que apunta al deterioro en las vías de señalización asociadas a los recetores, por ejemplo la disminución en la activación de ERK y MAPK, como los más implicados en la menor respuesta proliferativa al envejecer (Li et al., 2000). Otros hechos, como la disminución en moléculas de coestimulación, por ejemplo el CD28, los cambios en el citoesqueleto o la presencia de subpoblaciones linfocitarias

menos funcionales, podrían estar también implicados en la menor respuesta proliferativa a mitógenos al avanzar la edad (Franceschi et al., 2000; Sansoni et al., 2008; Ongradi y Kövesdi, 2010; Maté, 2015).

La vitamina E fue administrada en dosis de 200 mg/día, la cual fue elegida en base al trabajo de Meydani et al (1997), en el que esa dosis de vitamina E fue la más efectiva para la función de las células T, y posteriormente resultó efectiva, en algunas funciones inmunitarias, en un trabajo llevado a cabo en nuestro laboratorio (De la Fuente y Victor, 2000). La suplementación durante 3 meses tuvo un efecto claramente modulador de las funciones inmunitarias estudiadas. Así, aquellos parámetros que aumentan al envejecer, como la adherencia de neutrófilos y linfocitos y los niveles de anión superóxido en neutrófilos, disminuyen, alcanzándose valores similares a los de los controles adultos. Por su parte, los parámetros que disminuyen en los septuagenarios en relación a los adultos, aumentan tras el tratamiento, también asemejándose los valores a los de los mismos. Incluso, en el caso de la quimiotaxis y la proliferación de linfocitos en mujeres y en el de la fagocitosis de neutrófilos en hombres, los valores tras el tratamiento son mayores que en los adultos. Estos resultados pueden ser entendibles si consideramos que la base de la inmunosenescencia es el estrés oxidativo (Daynes et al., 2003; De la Fuente et al., 2005; Vida et al., 2014), y que la administración de antioxidantes, como en este caso la vitamina E, puede prevenir o retrasar el estrés oxidativo del envejecimiento (Sastre et al., 2000). Un efecto positivo de la vitamina E en las células inmunitarias de personas mayores, especialmente en la adherencia, proliferación de los linfocitos y en la secreción de IL-2, ha sido ya observado en publicaciones anteriores (Meydani et al., 1990, 1997; De la Fuente y Victor, 2000). En otras funciones inmunitarias, el presente trabajo es el primero que demuestra el papel positivo de esta suplementación. La vitamina E es el principal antioxidante liposoluble de las membranas celulares, y son los lípidos de las membranas de las células inmunitarias muy susceptibles a la oxidación al envejecer, lo que podría explicar su deterioro funcional al avanzar la edad (Arranz et al., 2013). Así, uno de los mecanismos que podría utilizar la vitamina E para mejorar la función inmunitaria sería el aumentar la resistencia de las células inmunitarias a la peroxidación lipídica. Otro podría ser la capacidad de este antioxidante de disminuir la producción de prostaglandinas como la PGE₂, por los fagocitos, la cual se asocia con la disminución de ciertas funciones inmunitarias, como la respuesta proliferativa de los linfocitos T, al envejecer (Meydani et al., 1990; Meydani et al., 2005). Muchos otros mecanismos podrían plantearse para la acción de la vitamina E en las células inmunitarias, los cuales deberían ser investigados. Transcurridos 6 meses de la finalización de la suplementación,

algunas de las funciones estudiadas siguen mostrando valores semejantes a los de adultos, hecho que se da en las funciones de neutrófilos, en la NK en hombres y en la adherencia y quimiotaxis de linfocitos en hombres y mujeres.

En un nuevo experimento se llevo a cabo un diseño similar al comentado en el Artículo 14, pero en este caso se quiso comprobar el efecto de la vitamina C (500mg/día). También, en paralelo, se estudió el efecto de la suplementación con vitamina C (500 mg/día) y vitamina E (200 mg/día), siguiendo el mismo diseño experimental, para así poder comparar si el efecto de un único antioxidante era menor o similar a la utilización de dos conjuntamente. También en este estudio se analizaron las posibles diferencias entre hombres y mujeres (**Artículo 15**). Los resultados, al comparar los valores de los septuagenarios (hombres y mujeres) (74±4 años de edad) con los adultos (35±5 años), son similares a los encontrados en el estudio anteriormente comentado (Artículo 14). Así, hay un aumento de la adherencia en neutrófilos y linfocitos, y de los niveles de anión superóxido en neutrófilos, así como una disminución de todas las otras funciones (quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos, fagocitosis de neutrófilos, proliferación de linfocitos y secreción de IL-2 en respuesta a PHA y de actividad NK). La ingestión del suplemento de vitamina C durante 3 meses dio como resultado que los valores de las funciones que aumentaron al envejecer, disminuyeran, asemejándose los mismos a los de los adultos, o incluso dando valores menores que en ellos, como sucedió en la adherencia de linfocitos en los hombres y en el anión superóxido de neutrófilos en las mujeres. Por su parte, las funciones que disminuían al envejecer, aumentaron tras la suplementación, pareciéndose sus valores a los de los adultos, con la excepción de la quimiotaxis de neutrófilos en hombres, que permaneció menor que la de adultos, y la fagocitosis en las mujeres, que incluso superó el valor de los adultos. Tras 6 meses sin tomar el suplemento, varias funciones recuperaron los valores anteriores a la suplementación, pero en algunas otras se mantuvo el efecto positivo de la vitamina C, como sucedió en la adherencia y la fagocitosis de neutrófilos en hombres, en los niveles de anión superóxido, en la adherencia de linfocitos en mujeres, en la quimiotaxis y proliferación de linfocitos y en la secreción de IL-2 en los hombres.

Los resultados demuestran el carácter modulador de sobre la función inmunitaria tiene la suplementación utilizada de vitamina C, aumentando los valores de las funciones que están disminuidas por la edad y disminuyendo los de las que están aumentadas. De este modo, las funciones alcanzan valores semejantes a los que tienen las personas cronológicamente adultas. Aunque en el caso de la vitamina C, por su carácter

hidrosoluble, se toleran de 1000 a 5000 mg/día sin suponer efectos negativos para la función inmunitaria (Jacob y Sotoudeh, 2002), y se ha propuesto la ingestión de grandes cantidades para el resfriado y la prevención del cáncer (Verrax y Calderon, 2009), puede darse un posible efecto pro-oxidante si las cantidades de esta vitamina son muy elevadas y se dan determinadas circunstancias (Childs et al., 2001). No obstante, 1000 mg/día de vitamina C, acompañados de una dieta rica en frutas y vegetales, se ha recomendado para conseguir una salud óptima (Deruelle y Baron, 2008) y una buena respuesta inmunitaria (Wintergerst et al., 2006). También, se ha indicado que una ingestión de al menos 200 mg/día es necesaria para estimular la función del sistema inmunitario (Weber et al., 1996), y que una cantidad mayor no aumenta la incorporación de la vitamina a los leucocitos (Vodjani et al., 2000). Así, los 500 mg/día utilizados en el presente estudio parece una suplementación muy apropiada para mejorar la función inmunitaria, y, consecuentemente, la salud.

Aunque se ha comprobado en algunos casos que la vitamina C puede aumentar la adherencia, como se indicó en el Artículo 1 para macrófagos de ratón por la presencia *in vitro* de ácido ascórbico, otros autores, en concordancia con los resultados del presente trabajo, han encontrado una disminución de la adhesión de monocitos al endotelio (Woollard et al., 2002), así como una menor expresión de moléculas de adhesión en estas células (Rayment et al., 2003). En lo que respecta a la disminución que la ingestión de vitamina C produce en los niveles de anión superóxido, ya se ha comprobado en otro estudio que este antioxidante, en personas con insuficiencia cardíaca crónica y con altos niveles de estrés oxidativo, es capaz de disminuir los niveles de ese anión en neutrófilos y la situación de oxidación que acompaña a estos pacientes (Ellis et al., 2000). De nuevo, los efectos encontrados *ex vivo* no coinciden con los observados *in vitro* con ácido ascórbico en ratones (Artículo 1).

En lo que respecta a aquellas funciones disminuidas en la vejez que la ingestión de vitamin C consigue estimular, ya se ha comprobado que la suplementación con 2000 mg/día, durante 2 semanas, es capaz de restaurar la quimiotaxis de monocitos de fumadores, la cual se encontraba disminuida en comparación con la de no fumadores (Stadler et al., 2007). En cuanto a la fagocitosis, ya se ha comprobado que el ácido ascórbico es utilizado por macrófagos de ratones y cobayas para llevar a cabo su capacidad de fagocitar. Además, como en ese proceso disminuyen los niveles de este antioxidante estas células inmunitarias son capaces de incorporarlo desde el medio en el que se encuentren (Hernanz et al., 1990). Resultados más recientes han demostrado que la

vitamina C modula la actividad fagocítica de las células inmunitarias (Ströle et al., 2011). En estas funciones los resultados encontrados *ex vivo* en humanos septuagenarios sí son concordantes con el efecto *in vitro* obtenido por la presencia de ácido ascórbico en los macrófagos peritoneales de ratón adultos (Artículo 1).

En la capacidad proliferativa de los linfocitos y en la secreción de IL-2, la vitamina C no ha sido muy estudiada y los resultados existentes resultan contradictorios, dándose incluso falta de efectos en la proliferación (Douziech et al., 2002; Ströle et al., 2011) así como una inhibición, dosis dependiente, de la secreción de IL-2 por linfocitos estimulados con PAM/ionomicina (Hartel et al., 2004). Dado que una causa importante de la menor respuesta proliferativa de los linfocitos a mitógenos, al envejecer, es la menor proporción de linfocitos T funcionales, lo cual es debido a una mayor apoptosis, se ha sugerido que uno de los potenciales mecanismos que utiliza la vitamina C para estimular esta función inmunitaria sería la inhibición que causa en la señalización implicada en la apoptosis (Pérez-Cruz et al., 2003). Con respecto a la actividad NK la estimulación que la ingestión del suplemento de vitamina C produce en los septuagenarios es coincidente con la encontrada en un trabajo previo utilizando la misma cantidad del antioxidante (500mg/día) (Vodjani et al., 2000).

Cuando los septuagenarios ingirieron un suplemento de vitamina C y E, los resultados fueron muy similares a los observados y ya comentados con el suplemento de vitamina C sola. En algunas funciones, como la adherencia de neutrófilos y linfocitos y la proliferación linfoide a mitógenos, los efectos de la ingestión con vitamina C+E fueron menores que los de la vitamina C sola, mientras que en otras, como los niveles de anión superóxido fueron mayores cuando se ingieren las dos vitaminas conjuntamente, especialmente en los hombres. Dados los resultados ya comentados de la suplementación con vitamina E en las funciones inmunitarias de los septuagenarios (Artículo 14) y las que se han comentado de la vitamina C, parece lógico que la suplementación con ambas tenga efectos muy positivos en la mejoría de las funciones de neutrófilos y linfocitos en las personas de setenta años. Lo que demuestran estos últimos resultados es que no hacen falta cantidades mayores de los 500 mg/día de vitamina C junto con los 200 mg/día de vitamina E, ni un periodo mayor de 3 meses para obtener un efecto beneficioso sobre la funcionalidad inmunitaria. Así, los efectos positivos obtenidos en las mujeres septuagenarias que ingirieron durante 16 semanas 1000 mg/día de vitamina C y 200 mg/día de E (Artículo 13), pueden ser incluso mayores con una cantidad de C y un tiempo de suplementación menores. Otro hecho destacable es que los beneficios de tomar

solo vitamina E (Artículo 14) o solo vitamina C (Artículo 15) son similares a ingerir ambas. Aunque varios estudios han demostrado que para mejorar la función inmunitaria, era más conveniente la ingestión de dietas o suplementos con más de un antioxidante (Chandra, 2004; Alvarado et al., 2006a,b; Alvarez et al., 2006a,b; Vetvicka y Vetvickova, 2012), y de que si la combinación de vitamina C y E resultó ser eficaz para disminuir la prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer, lo que no se obtuvo con la ingestión de ambas de forma aislada (Zandi et al., 2004), esto no se ha conseguido en el presente trabajo. Por todo ello, mas investigaciones deberían llevarse a cabo en este campo para poder realmente hacer recomendaciones apropiadas a las personas mayores sobre la ingestión de suplementos antioxidantes que puedan mejorar su función inmunitaria y consecuentemente su salud, permitiendo una longevidad saludable.

Por todo lo observado en estos últimos trabajos desarrollados en humanos, se puede decir que además de lo efectos beneficiosos que los antioxidantes estudiados tienen en las funciones inmunitarias de animales de experimentación, tanto *in vitro* como *ex vivo*, y que han sido comentados en los Artículo del 1 al 12 de la presente tesis, hay efectos similares en el sistema inmunitario del ser humano. Este hecho es coincidente con lo observado en otros estudios llevados a cabo también con la vitamina C y E (De la Fuente y Victor, 2000; Han et al., 2000, 2004,2006; Adolfsson et al., 2001; Ahmed et al., 2004; Mcdonald et al., 2005; Maeng et al., 2009; Wu y Meydani, 2014; Bou Ghanem et al., 2015). Por tanto, aunque hay muchos resultados controvertidos sobre el papel beneficioso o no de la ingestión de antioxidantes como suplementos para mejorar la función inmunitaria, en el presente trabajo los resultados demuestran que, en las cantidades y el tiempo empleados, pueden ser útiles para mejorar algunas funciones de los neutrófilos y linfocitos de septuagenarios, tanto de hombres como de mujeres, y en estas últimas de forma relevante si las tienen más deterioradas por presentar alguna patología como depresión o una enfermedad coronaria.



4. DISCUSIÓN GENERAL

“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar lo que nadie más ha pensado”.

Albert Szent Györgi (1893-1986). Bioquímico húngaro estadounidense (Premio Nóbel de Medicina en 1937).

“En lo tocante a la ciencia, la autoridad de un millar no es superior al humilde razonamiento de un hombre”.

Galileo Galilei (1564-1642). Filósofo, astrónomo, ingeniero, físico,...italiano.

Los resultados de la presente tesis parecen confirmar la hipótesis planteada de que la administración de antioxidantes exógenos, en cantidades apropiadas, debe mejorar la función de las células inmunitarias en cualquier edad, pero especialmente en individuos viejos, en los cuales tiene lugar una inmunosenescencia y un estrés oxidativo. Evidentemente esto se hace en base a que estas células inmunitarias producen ROS en su habitual funcionamiento de defensa frente a infecciones y cánceres, lo que representa un consumo de los antioxidantes endógenos de que disponen.

Se hará en primer lugar un comentario general a los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* (Artículos del 1 al 5) y posteriormente a los de los experimentos *ex vivo* (Artículos del 6 al 15). Finalmente se hará una discusión global, más bien un corolario de lo obtenido en la presente tesis y que, con otras aportaciones, ha permitido generar una serie ideas, propuestas y teorías que se recogen en las revisiones presentadas en el Anexo (Revisiones de la 1 a la 8).

4.1. Discusión general de los resultados obtenidos sobre los efectos *in vitro* de antioxidantes en la modulación de la función inmunitaria y sus cambios al envejecer

Los resultados que se han obtenido de los trabajos llevados a cabo sobre los efectos *in vitro* de los antioxidantes en diversas funciones leucocitarias (recogidos en los 5 primeros artículos que se han comentado y que se adjuntan en el Anexo) demuestran claramente el efecto estimulador que tienen los antioxidantes estudiados. Así, el ácido ascórbico (AA), la vitamina E (VE), y los tiólicos: glutatión (GSH), N-acetilcisteína (NAC), tioprolina (TP) y taurina (TAU), en un rango amplio de concentraciones, estimulan una serie de funciones relevantes de las células inmunitarias, tanto macrófagos como linfocitos y células NK, procedentes de diferentes localizaciones (peritoneo, ganglios axilares, bazo y timo) de ratones BALB/c adultos. Las funciones como la adherencia, la movilidad espontánea, la dirigida al foco infeccioso (quimiotaxis) de macrófagos y linfocitos, la proliferación basal y en respuesta al mitógeno ConA de los linfocitos y la actividad antitumoral NK, son estimuladas en presencia de esos antioxidantes, fundamentalmente con las cantidades mayores utilizadas.

En las células de los ratones **adultos**, la estimulación encontrada por la presencia *in vitro* de los antioxidantes nos indica la necesidad que tienen los leucocitos de determinadas cantidades de estos compuestos para mantener su funcionamiento. De

hecho, se ha comprobado que las células inmunitarias utilizan sus reservas de antioxidantes cuando tienen que llevar a cabo su trabajo defensivo, en el cual es necesaria la producción de compuestos oxidantes e inflamatorios. Además, pueden incorporar antioxidantes desde el medio en el que se encuentran (Hernanz et al., 1990; Arranz et al., 2008). En este sentido, el ácido ascórbico parece tener un papel relevante ya que es consumido por los macrófagos en su proceso fagocítico (Oberriter et al., 1986; Hernanz et al., 1990; May et al., 2005), presumiblemente debido a su oxidación por los productos derivados de la NADPH oxidasa, como es el O_2^- (Schultz y Harrison, 2000). Este antioxidante resulta fundamental para la funcionalidad de las células inmunitarias, tanto fagocitos como linfocitos (Artículos 1 y 5 de la presente tesis), dado que ambos tipos celulares producen ROS en su respuesta defensiva (Victor et al., 1998, 2001, 2002b, De la Fuente y Victor, 2001). No obstante, durante un proceso infeccioso, linfocitos y macrófagos se comportan de forma diferente en lo que respecta al mantenimiento de sus niveles de AA. Así, los linfocitos acumulan gran cantidad del mismo en su interior, en paralelo con el aumento de la síntesis hepática de este antioxidante, hecho que se ha comprobado sucede en ratones sometidos a un proceso infeccioso por administración de LPS. Esto podría tener como finalidad obtener protección por parte de estas células frente al proceso de peroxidación lipídica. Por su parte, los macrófagos, en los que los niveles de AA disminuyen en el curso de la infección, parecen utilizar este antioxidante, posiblemente para protegerse del daño oxidativo que se podría producir debido a los elevados niveles de ROS que generan para eliminar el agente patógeno causante de la infección (Victor et al., 2001). Cuando el AA se administra *in vitro*, tanto linfocitos como macrófagos lo incorporan, hecho que es más rápido (10 minutos) si las células están respondiendo a una infección. Resulta curioso que la capacidad de incorporación de este antioxidante disminuya justo una hora antes de que los animales fallezcan como consecuencia de la endotoxemia (Victor et al., 2001).

Lo mismo puede suceder con los otros antioxidantes estudiados. De aquí que tanto vitamina E, como GSH y los aportadores del mismo (NAC, TP y TAU) estimulen *in vitro* las funciones inmunitarias estudiadas, coincidiendo con lo observado en otros estudios (Correa et al., 1999a; De la Fuente y Victor, 2001; Puerto et al., 2002; Pomaki et al., 2005).

Cuando las células proceden de ratones **viejos**, en los que las funciones inmunitarias se encuentran deterioradas respecto a las de las células de los adultos, como consecuencia del mayor estrés oxidativo (De la Fuente et al., 2004b), los antioxidantes *in*

vitro mejoran tales funciones asemejándose los valores de las mismas a los que presentan los adultos. Este hecho parece tener lugar en todos los tipos celulares estudiados, obtenidos de diferentes localizaciones, y tanto en células de ratones de la cepa BALB/c como de la cepa Swiss (Artículos del 3 al 5). El efecto modulador de los antioxidantes *in vitro* se comprueba claramente en el caso de la NAC (Artículo 3), ya que la capacidad de adherencia de macrófagos y linfocitos, que aumenta en las células de ratones viejos en comparación con los adultos, disminuye en presencia de este antioxidante, especialmente con las concentraciones mayores utilizadas de 1 y 2,5 mM. Este papel modulador *in vitro* de la NAC asemejando unos valores funcionales deteriorados a los que muestran las células de los animales utilizados como controles, ha quedado de manifiesto que ocurre no sólo en la comparación de células inmunitarias de animales viejos *versus* las de adultos, también en las funciones de células de animales con endotoxemia *versus* las de controles sanos (De la Fuente y Victor, 2001). De este modo, la presencia de los antioxidantes en el medio permite a las células inmunitarias aumentar sus niveles de defensas intracelulares, las cuales se encuentran muy disminuidas al avanzar la edad (Alvarado, 2006; Arranz et al., 2008), como también lo están en el desarrollo de un proceso infeccioso (Victor et al., 2001).

Los mayores estimulaciones funcionales que se han obtenido con los antioxidantes en células de adultos en comparación con las de viejos, por ejemplo al comparar los efectos de la NAC en las funciones estudiadas en macrófagos (Artículo 1 y 3), podrían deberse o bien a una menor capacidad de incorporación al interior celular en el caso de los leucocitos de animales viejos, o al hecho de que se parte de niveles funcionales peores que se tienen que mejorar. Un hecho similar sucede cuando se compara el efecto *in vitro* de antioxidantes como NAC y AA en la funcionalidad de células inmunitarias de ratones con endotoxemia letal y en las de los sanos (De la Fuente y Victor, 2001). Así, las células inmunitarias si disponen de niveles apropiados de antioxidantes en su entorno, en la edad adulta, pueden defender mejor el organismo, y en la vejez, con una clara inmunosenescencia, pueden permitirse una función inmunitaria más semejante a la de los adultos.

4.2. Discusión general de los resultados obtenidos sobre los efectos de ingestión de dietas suplementadas con antioxidantes en la modulación de la función inmunitaria y sus cambios al envejecer

En animales **jóvenes** y **adultos** se comprobó que la ingestión de antioxidantes en la dieta mejoraba una serie de funciones de las células inmunitarias. Al compararse el efecto de dietas con cantidades bajas y altas de un antioxidante, como la **vitamina E**, ingerido por animales jóvenes (cobayas), se observó que la mejoría de tales funciones, en macrófagos y linfocitos de peritoneo y de bazo, era más evidente con la dosis alta. En los macrófagos peritoneales de ratones de dos cepas, una singénica como la BALB/c y otra más alogénica como la Swiss, la ingestión de una dieta suplementada con 0,1 % p/p de dos antioxidantes tiólicos (**NAC+TP**) durante 5 semanas, mejoró significativamente la capacidad funcional de los mismos y disminuyó su producción de oxidantes, siendo mayores los efectos en la cepa Swiss. Explicar estos efectos beneficiosos en animales jóvenes se puede hacer en base a que hasta la edad adulta las células inmunitarias presentan un cierto estrés oxidativo acompañado de una peor funcionalidad que la que se muestra en la edad adulta (De la Fuente et al., 2004b; De la Fuente, 2009a). Además, en los jóvenes puede haber un envejecimiento prematuro de los animales, por lo que la ingestión de dietas con antioxidantes puede mejorar la función inmunitaria a esta edad (Alvarado et al., 2005b,2006a). Un hecho similar se puede indicar para la edad adulta, en el sentido de que los animales pueden ser, aunque cronológicamente adultos, biológicamente viejos, y la ingestión de dietas con antioxidantes resultar muy positivas para ellos a la hora de mejorar su función inmunitaria, hecho que se ha comprobado en ratones adultos prematuramente envejecidos (Guayerbas, 2003; Guayerbas et al., 2004; Alvarado et al., 2006b; Álvarez et al., 2006b).

Al comparar, en macrófagos peritoneales y en linfocitos del peritoneo y de ganglios, bazo y timo, procedentes de ratones Swiss **viejos**, los efectos que sobre toda una serie de funciones tendrían la ingestión de dietas suplementadas con dos cantidades, **baja** (0,1% p/p) y **alta** (0,3 % p/p) de los antioxidantes **NAC** y **TP**, se comprobó el mayor efecto de la alta, aunque en los animales adultos la baja resultó más efectiva. En principio estos resultados parecen lógicos dado el mayor estrés oxidativo y deterioro inmunitario presente en los animales viejos en comparación con el de adultos. Además, los resultados ponen de nuevo en evidencia la importancia de considerar las cantidades de antioxidantes en la dieta en relación con la edad del individuo que las ingiere.

En el caso de ratones Swiss viejos, con unas funciones de los linfocitos de bazo y timo disminuidas en comparación con las que presentan los animales adultos, la ingestión durante 5 semanas de una dieta enriquecida con 0,07% p/p de TP mejoró significativamente tales funciones, asemejando los valores de las mismas a los que muestran en los animales adultos. Comparando los resultados de estos dos últimos trabajos, se hace evidente la mayor efectividad de suplementar la dieta solo con TP que con TP y NAC, al menos en la vejez. Ya se comentó, en la discusión de los resultados, las ventajas que podría tener la ingestión de TP en la vejez. La disminución encontrada en los niveles de corticosterona sérica por la ingestión de la dieta con TP, apunta a un tema todavía no demasiado estudiado como lo es el efecto de los antioxidantes neutralizando el estrés emocional de los individuos viejos. Dado que el estrés oxidativo y todo lo que supone el deterioro de la homeostasis redox, está en la base de la neuroinflamación y las alteraciones neuroendocrinas (Vida et al., 2014; Bakunina et al., 2015), la ingestión de dietas con cantidades apropiadas de antioxidantes como la TP, parece poder controlar el estado de estrés emocional, el cual suele aparecer en mayor grado con el envejecimiento. Así, en el contexto de la comunicación neuroinmunoendocrina, los antioxidantes no sólo mejorarían el sistema inmunitario, también los otros dos sistemas homeostáticos, todos ellos muy deteriorados al envejecer, hecho que se ha comprobado sucede con la administración de dietas que son suplementadas con antioxidantes (Guayerbas, 2003; De la Fuente et al., 2011; Cruces et al., 2014).

Se estableció un **modelo** de inmunosenescencia prematura en ratones, de forma que aquellos que llevaban a cabo más lentamente el recorrido del brazo largo de un laberinto en T, tenían peor funcionalidad inmunitaria que los de su misma edad cronológica que lo recorrían más rápidamente. Los resultados de otros experimentos, que no forman parte de la presente tesis, demostraron que los ratones que recorrían más lentamente ese brazo de la T estaban prematuramente envejecidos, por los que se les denominó PAM (*Prematurely Aging Mice*). Así, tanto en Swiss como en BALB/c, y tanto en machos como en hembras, y en ratones de diferentes edades cronológicas (jóvenes, adultos, maduros y viejos), hemos comprobado que es posible detectar los individuos que están prematuramente envejecidos, esto es, los PAM. Estos PAM siempre tienen una mayor inmunosenescencia, un mayor estrés oxidativo, un envejecimiento del sistema nervioso y endocrino y una menor esperanza de vida que los correspondientes NPAM (Guayerbas, 2003; Alvarado, 2006; Álvarez, 2006; De la Fuente y Vida, 2013; Manassra, 2014; Vida et al., 2014). Este modelo de PAM, como se comentará más adelante, ha

servido para poder acreditar a una serie de funciones del sistema inmunitario como marcadores de la velocidad de envejecimiento.

Cuando a los **PAM viejos** de dos cepas (Swiss y BALB/c), y a los correspondientes NPAM (*Non Prematurely Aging Mice*), se les suministró, durante 5 semanas, una dieta enriquecida con **NAC+TP**, los resultados mostraron como a los PAM, los cuales tenían peor funcionalidad inmunitaria que los NPAM, la dieta les mejoró muy significativamente esa funcionalidad, asemejándola a la de los animales cronológicamente adultos. Este efecto también se observó en los NPAM, los cuales, dada su edad cronológica, mostraban lógicamente una inmunosenescencia. Estos resultados han ratificado otros obtenidos por nuestro grupo de investigación, en los que, a cualquier edad cronológica, como los PAM están siempre más envejecidos biológicamente que los NPAM, la administración de dietas con antioxidantes han resultado ser más efectivas en el grupo de los PAM (Guayerbas, 2003; Alvarado, 2006; Álvarez, 2006; De la Fuente y Vida, 2013; Vida et al., 2014).

Unos antioxidantes muy abundantes en la dieta, y que están siendo estudiados con mayor interés en los últimos años, son los **polifenoles**. Cuando se quiso comprobar si la ingestión de dietas suplementadas con diferentes fracciones de cereales que contenían cantidades variables de varios polifenoles, tendrían un efecto positivo en la funcionalidad de macrófagos y linfocitos peritoneales de ratones maduros y viejos, se observó una estimulación de aquellas funciones disminuidas al envejecer y una disminución de las que se activan al avanzar la edad. De nuevo se aprecia el efecto modulador de los antioxidantes en las funciones inmunitarias, reiteradamente observado. Que los fitoquímicos de los cereales podrían tener un importante efecto protector para la salud, a través de múltiples mecanismos fisiológicos como la estimulación del sistema inmunitario, es algo ya asumido desde hace años (Lupton y Maccher, 1988). Los polifenoles, al poder actuar como antioxidantes en las dos fases, acuosa y no acuosa (Cooper et al., 1997), pueden interactuar de una manera integrada con antioxidantes adyacentes en diferentes fases dentro de un compartimento celular, produciéndose una reacción en cadena en las actividades de los mismos (Eastwood, 1999). Además, Existe una extensa literatura acerca de las diferentes y numerosas propiedades de los polifenoles, como agentes antioxidantes, antialérgicos, antiinflamatorios, antivirales y anticancerígenos (Middleton, 1998; Eastwood, 1999; Hollman y Katan, 1999; Middleton et al., 2000; Havsteen, 2002). De este modo, los mecanismos de acción de los polifenoles van más allá de la modulación de las rutas relacionadas con el estrés oxidativo. De hecho,

se ha propuesto que la activación que ejercen los polifenoles en las células inmunitarias se lleva a cabo por mecanismos epigenéticos (Cuevas et al., 2013). Es este un aspecto que no debería descartarse para ser aplicado a otros antioxidantes estudiados en la presente tesis. El tiempo de ingesta de las dietas con polifenoles, 15 y 30 semanas, produjo algunos efectos diferentes, dependiendo de la función estudiada y de los polifenoles presentes, pero, en general, resultó más beneficioso inmunológicamente el mayor tiempo de ingestión. En otro estudio con dietas ricas en polifenoles administradas durante 5 y 20 semanas, fue el periodo más largo el que obtuvo mejores resultados a nivel inmunitario (Álvarez, 2006).

En el caso del **ser humano**, la ingestión diaria durante 16 semanas de un gramo de vitamina C y 200 mg de vitamina E por mujeres septuagenarias supuso una mejoría de las funciones estudiadas en células inmunitarias de sangre periférica (linfocitos y neutrófilos). Así, la proliferación de los linfocitos al mitógeno PHA, y la quimiotaxis y fagocitosis de neutrófilos aumentaron significativamente con la suplementación. Esto se acompañó de un menor estado de oxidación ya que los niveles de anión superóxido de los neutrófilos y los de lipoperoxidación en suero (medidos por el MDA) disminuyeron. Este hecho es muy relevante dado que se ha comprobado que el estrés oxidativo valorado en sangre periférica refleja el que tiene un individuo a nivel sistémico, y que la correlación que presentan algunos parámetros indicativos de este estrés, como sucede con el MDA, entre sus valores en sangre y en tejidos es muy elevada (Margaritelis et al., 2015). Por tanto, la ingestión de los antioxidantes parece suponer un menor estado oxidativo general del organismo, dada la disminución que del MDA se observó en suero. Cuando esa ingestión la llevan a cabo mujeres mayores que tenían depresión o enfermedad coronaria y que presentaban una peor funcionalidad de las células inmunitarias y mayor estado de oxidación y de estrés emocional (niveles séricos más elevados de cortisol) que las sanas de su misma edad, los efectos fueron todavía más significativos en cuanto a la estimulación de las funciones y a la disminución del estado de oxidación y de estrés emocional. Estos resultados confirman, por una parte, que en el ser humano los efectos de los antioxidantes son similares a los ya comentados en animales de experimentación. Por otra, que cuanto mayor es la edad biológica de la persona, por tener una mayor estrés oxidativo con menores niveles de antioxidantes, como sucede en las septuagenarias con depresión y cardiopatías coronarias (Cumurcu et al., 2009; Maes et al., 2011; Prohan et al., 2014; Siddiqui et al., 2014; Gruzdeva et al., 2014; Uppal et al., 2014; Buko et al., 2014; Siddiqui et al., 2014), la ingestión de suplementos antioxidantes resulta mucho más efectiva. Este hecho indica que en el ser humano se reproduce lo que se ha observado en

los animales de experimentación, esto es, que cuanto peor es el estado redox de los individuos como sucede en los animales cronológicamente viejos o adultos pero con envejecimiento prematuro (PAM) los efectos positivos de la ingestión de antioxidantes resultan mucho más significativos.

En hombres y mujeres septuagenarios, la ingestión de **vitamina E** (200 mg/día), de **vitamina C** (500 mg/día) o de **vitamina C y E** (500mg+200mg/día, respectivamente) durante 3 meses, mejoró la función inmunitaria de los leucocitos de sangre periférica, deteriorada en comparación con la que presentaban los controles cronológicamente adultos. Este efecto beneficioso hizo que los valores de las funciones de los septuagenarios se asemejaran a los de los adultos. Tras 6 meses sin ingestión de tales suplementos, aunque algunas funciones ya recuperaron sus valores anteriores al inicio de la suplementación, otras seguían manteniéndolos.

La vitamina E utilizada ha sido siempre el α -tocoferol, la forma más abundante en la naturaleza y la que posee una mayor actividad biológica (Brigelius-Flohe y Traber, 1999; Brigelius-Flohe, 2005). Aunque el papel de la vitamina E en la salud y la enfermedad sigue siendo objeto de debate, los datos recientes indican que en un rango de 23-800 UI/día su ingestión no afecta la mortalidad (Curtis et al., 2014) y puede tener efectos positivos en muchos aspectos fisiológicos, en estado de salud y en algunas enfermedades (Rizvi et al., 2014).

Los resultados demuestran que las cantidades administradas de vitaminas C y E son apropiadas, pues no se aprecia un posible efecto pro-oxidante como ha sido indicado puede tener el ácido ascórbico (Chakraborty et al., 2014). Los efectos beneficiosos obtenidos podrían deberse a la acción directa de los compuestos antioxidantes, pues ya se ha comprobado que, al menos en células inmunitarias de ratones, tienen una acción positiva *in vitro* (Artículo 1, 5) (Victor et al., 2000; De la Fuente y Victor, 2001). Pero también, los efectos pueden ser debidos al efecto estimulador que tienen muchos antioxidantes, como la vitamina C, sobre la actividad de las defensas antioxidantes, como las enzimas GPx y GR (Barja et al., 1994; Cadenas et al., 1994; Polidori et al., 2004). Por otra parte, los antioxidantes también puede actuar a través del control de la activación del NFkB, hecho que hace tanto la vitamina C, mediante la activación de la MAPK p38 (Bowie y O'Neill, 2000; Carcamo et al., 2002), como la vitamina E (Wu y Meydani, 2008). Además, esos estudios indican que la inhibición de la activación del NFkB por la acción de la vitamina C no se debe únicamente a la acción antioxidante de la misma, ya

que otras rutas de señalización, que no dependen del estado redox de la célula, parecen poder bloquearse por la vitamina C.

Resulta curioso que la ingestión de un suplemento sólo de vitamina C produzca el mismo efecto o incluso mejor que el tomar la misma cantidad de esa vitamina con la E. El papel relevante de la vitamina C en las células inmunitarias (Sorice et al., 2014), se manifiesta por el hecho de que la concentración de este antioxidante en dichas células, especialmente en los fagocitos, tanto macrófagos como neutrófilos, sea 10-40 veces mayor que la observada en el plasma (Oberritter et al., 1986). Así, este antioxidante hidrosoluble se ha propuesto como el más importante en la sangre de humanos y en las células de los mamíferos, con mecanismos de reciclaje y acumulación contra gradiente, lo que sugiere su relevancia para las funciones celulares (Duarte y Lunec, 2005), especialmente para las de los leucocitos. De hecho, cuando se da una suplementación con antioxidantes, como la vitamina C o los aportadores de GSH, son las células inmunitarias de sangre periférica las que retienen esos antioxidantes, no aumentando los mismos en el plasma. Esto se ha comprobado con la suplementación de NAC en mujeres postmenopáusicas, en las que la función de los neutrófilos y linfocitos mejoraba significativamente debido a un aumento de los niveles de GSH en dichas células, aumento que no tenía lugar en el plasma (Arranz et al., 2008). Como ya se ha mencionado, la concentración de ascorbato y glutatión se correlacionan de forma directa en muchas células, como por ejemplo en los linfocitos humanos (Lenton et al., 2000). Así al suplementar con vitamina C no solo se aumenta la concentración de ascorbato en estas células, también lo hace la del glutatión (Lenton et al., 2003). Todo ello podría explicar el efecto mayor que muestra la suplementación con vitamina C. Además, los efectos beneficiosos de la ingestión de vitamina C, incluso a corto plazo, tienen lugar incluso en individuos con niveles elevados de la misma, no haciendo falta la presencia de una deficiencia para observar los efectos positivos de su ingestión (Poliori et al., 2004).

El tema de las cantidades de antioxidantes que se ingieren es relevante, pues la vitamina C tomada en dosis muy bajas ó muy altas, ha mostrado efectos adversos tales como una disminución del peso corporal de los animales, de la actividad GR, así como una del grado de insaturación de los ácidos grasos de los lípidos de las membranas (Barja et al., 1994). No obstante, se ha sugerido que la importancia de un antioxidante no depende únicamente de su concentración y actividad sino también de su capacidad para interaccionar con los sistemas que lo regeneren (Brohee y Neve, 1995). De hecho, la vitamina C y el GSH, dos antioxidantes que actúan de manera cooperativa, serían los

reductores fisiológicos del radical tocoferilo (Burton et al., 1983) en el que se transforma la vitamina E tras su actuación.

Un hecho que se desprende de los resultados de la presente tesis, es la diferente respuesta, a la suplementación con antioxidantes, de los niveles de anión superóxido intracelulares en leucocitos peritoneales de animales de experimentación y en neutrófilos de humanos, como también lo es los cambios en este parámetro al avanzar la edad en unos y en otros. Así, al envejecer, disminuyen los niveles intracelulares de este anión en leucocitos peritoneales de animales de experimentación y aumentan en neutrófilos de sangre periférica del ser humano, lo cual ha sido detectado en muchos otros experimentos (Guayerbas, 2003; Alvarado, 2006; Arranz, 2009; Maté, 2015). Como ya se ha comentado, en el peritoneo de los animales, en cuya suspensión se han llevado a cabo las medidas de los niveles de anión superóxido, se encuentran macrófagos y linfocitos, y ambos producen este radical libre, aunque en mayor medida los macrófagos (De la Fuente y Victor, 2001; Victor, 2001). Sin embargo, en humanos siempre se han analizado los niveles de anión superóxido en neutrófilos aislados, células con menor esperanza de vida que los macrófagos (Bainton, 1980). Parece lógico pensar que, al envejecer, estas células, los neutrófilos, generen más ROS en un intento de cumplir su misión en el poco tiempo de vida de que disponen, y como una clara evidencia de su estado de desregulación. En este sentido, hay que tener en cuenta que aunque la producción de ROS es un importante mecanismo de destrucción de los microorganismos fagocitados, hay también una correlación positiva entre bajos niveles de anión superóxido y actividad bactericida (Boxer, 1995). Además, Wolach et al. (2000) observaron que una excesiva generación de anión superóxido no se asociaba a una adecuada capacidad bactericida, pero sí puede representar una fuente importante de daño oxidativo para otras células y tejidos. Por su parte, la ingestión de dietas o suplementos con antioxidantes, en individuos viejos, aumenta los niveles de anión superóxido en células peritoneales de animales de experimentación y disminuye los de los neutrófilos. En ambos casos los antioxidantes regulan los niveles que tienen que tener dichas células para asemejarse a los presentes en el estado adulto, que es cuando mejor funcionan. Este podría ser un claro ejemplo del papel modulador que pueden ejercer los antioxidantes, en cantidades apropiadas, en la función inmunitaria y, consecuentemente, en la salud de los individuos.

4.3. COROLARIO

“El verdadero viaje de descubrimiento no consiste en buscar nuevos paisajes sino en mirar con nuevos ojos”. Marcel Proust (1871-1922), escritor francés.

Los resultados obtenidos en la presente tesis apuntan a que los antioxidantes estudiados, y en las concentraciones utilizadas, en general, mejoran la función inmunitaria y lo hacen de forma más evidente en los individuos viejos que presentan una clara inmunosenescencia. Además, estos resultados han permitido confirmar muchos de los cambios que experimentan las funciones inmunitarias en el envejecimiento y aportar un modelo de envejecimiento prematuro en ratones con el que, tras otros estudios que forman parte de otras tesis doctorales, confirmar el papel del sistema inmunitario como marcador de la velocidad de envejecimiento de cada individuo y la incidencia del estado funcional de este sistema en dicha velocidad (**Revisiones** de la 1 a la 8). En este contexto, los resultados obtenidos avalan que los antioxidantes pueden jugar un papel importante modulando y mejorando la función inmunitaria y, consecuentemente, la salud del individuo, lo que le permitirá una longevidad saludable.

En el momento actual, a diferencia de lo que sucedía cuando se inició la presente tesis doctoral, el papel de los antioxidantes está siendo muy cuestionado. También hay una tendencia, por parte de una serie de investigadores, a plantearse la validez de la teoría de la oxidación en el contexto del envejecimiento. Si bien los resultados de esta tesis, y los recogidos en las revisiones, apoyan ambos hechos, no obstante, hay que saber ser críticos con todas las afirmaciones científicas.

Todo el enfoque de la presente tesis se ha hecho en el contexto fisiológico de la relevancia que tiene para el mantenimiento de la salud del organismo el alcanzar los equilibrios que definen la homeostasis, o mejor el equilibrio dinámico, la homeocinesis. Nada es bueno o malo en si mismo, depende de la cantidad y el momento. Así, se sabe que el estrés oxidativo, referido como un desbalance con elevados niveles de ROS y bajos de antioxidantes, causa daño a las macromoléculas y se encuentra asociado a un amplio número de patologías. Pero las ROS también, y en niveles relativamente elevados, activan señalizaciones celulares que permiten muchas funciones relevantes, siendo esenciales en la denominada “biología redox”. De este modo, el concepto de “hormesis” se está aplicando al papel de las ROS (Schieber y Chandel, 2014), destacando como ciertas cantidades de las mismas son muy necesarias y permiten activar defensas en el organismo, pero un exceso es lo que resulta nocivo (Ristow y Schmeisser, 2011).

Las células inmunitarias son un claro ejemplo de la importancia que tiene el conseguir, en cada momento, las cantidades de ROS y antioxidantes que se requieren. Durante los procesos infecciosos, los leucocitos, pero principalmente los que constituyen la respuesta innata, y especialmente los fagocitos, al activarse generan una gran cantidad de compuestos oxidantes con efectos microbicidas y citotóxicos, necesarios para llevar a cabo su función (De la Fuente et al., 2011; Paiva y Bozza, 2014). Así, estas células se hayan sometidas a un estrés oxidativo que no soportan otros tipos celulares. Si estos compuestos son liberados al medio extracelular ó bien son producidos en exceso, pueden llegar a dañar al organismo hospedador así como a la célula que los produce. También muchas funciones de las células de la respuesta adaptativa o adquirida, esto es de los linfocitos, se llevan a cabo gracias a la liberación de ROS (Kaminski et al., 2013). De hecho, la inflamación y la oxidación, procesos estrechamente relacionados, son fundamentales para el adecuado funcionamiento del sistema inmunitario (Vida et al., 2014). En ese funcionamiento, parece lógico que utilicen defensas antioxidantes, las cuales son también anti-inflamatorias, para evitar los daños oxidativos de las ROS y detener el proceso de inflamación. No obstante, si los antioxidantes se encuentran en exceso en el momento en que las células inmunitarias tienen que llevar a cabo su función destructora, se puede generar lo que se ha llamado un “estrés reductivo”, e imposibilitar el adecuado funcionamiento de dichas células. También, unas cantidades elevadas de antioxidantes pueden tener un papel pro-oxidante y pro-inflamatorio, hecho que se ha comprobado en varios de estos compuestos (Furukawa et al., 2003; Elbling et al., 2005; de Oliveira et al., 2012).

Por lo indicado, parece lógico que existan resultados muy diferentes y controvertidos en aquellas aproximaciones que utilizan dietas enriquecidas o suplementadas con antioxidantes. Entre algunas de las posibles razones se comentarán las diez siguientes. (1) La edad que presentan los individuos al comenzar el período de suplementación (Bezlepkin et al., 1996), ya que según sea esa edad las funciones inmunitarias pueden activarse de forma diferente frente a una misma cantidad de antioxidantes (Guayerbas et al., 2002) y los requerimientos de éstos para mantener una función inmunitaria óptima pueden ser mayores en la vejez (Guayerbas, 2003). (2) La duración del período de suplementación, la cual puede determinar los resultados obtenidos (Wood et al., 1999). (3) Las posibles interacciones existentes entre los antioxidantes utilizados en las suplementaciones y con otros compuestos del organismo (Palozza y Krinsky, 1992; Mukai et al., 2005). (4) La dosis de los antioxidantes administrada (Lowe et al., 1999), ya que la ingesta excesiva de algunos de estos

compuestos puede tener efectos nocivos (Chandra, 1984; Calder y Kew, 2002; Ibs y Rink, 2003), mientras que cantidades de antioxidantes que no cubren los requerimientos de las células pueden no mostrar efecto (Santos et al., 1997). Incluso, se ha llegado a proponer un efecto “hormético” para los antioxidantes (Rattan, 2014). (5) La manera en que son administrados los antioxidantes, hecho que va a condicionar una incorporación en mayor o menor grado (Shibamura et al., 2009). (6) La capacidad del antioxidantes administrado de poder ser sintetizado o no por el organismo, lo que conlleva una regulación diferente (Banhegyi et al., 1997). (7) La posible acción de los compuestos administrados para inducir defensas antioxidantes endógenas (Farr et al., 2012; Guerra-Araiza et al., 2013). (8) El estado nutricional de los sujetos antes del inicio de la suplementación (Solomons, 1999). (9) El estado psicológico y emocional del individuo, hecho que va a determinar, entre otras cosas, su edad biológica (Vida et al., 2014). (10) La microbiota que posea el sujeto, un factor recientemente incorporado en esta área de investigación (Zapata y Quagliarello, 2015).

Los resultados de la presente tesis parecen apuntar a que los antioxidantes estudiados, y en las cantidades analizadas, pueden ayudar a disponer de mejores funciones inmunitarias, tanto de los fagocitos, como de los linfocitos y de la actividad NK, en los individuos adultos, y esto parece deberse a una acción directa de los antioxidantes en las células inmunitarias. Aunque en adultos solo se han utilizado animales de experimentación, en resultados del laboratorio, se ha comprobado que también en hombres y mujeres jóvenes la ingestión de vitamina C y E, aunque no produce efectos muy significativos, sí mejora algunas funciones inmunitarias, o al menos no las modifica. Como la capacidad funcional de los leucocitos ha sido propuesta como el mejor marcador de salud (Wayne et al., 1990), parece evidente que la ingestión de cantidades apropiadas de antioxidantes puede ser un excelente candidato para mantenerla en la edad adulta, especialmente si estos antioxidantes pueden, directa o indirectamente, mejorar el estado redox de las células inmunitarias. En este sentido, hemos comprobado que otra estrategia que mejora la función inmunitaria como es la realización de ejercicio físico moderado, lo hace a través de aumentar las reservas antioxidantes de estas células (De la Fuente et al., 2005; 2011).

En lo que respecta a los efectos de los antioxidantes en el proceso de envejecimiento, lo que constituye la mayor parte de los estudios de la presente tesis, se han podido abordar los efectos de esos compuestos en animales de experimentación (ratones) y en hombres y mujeres septuagenarios. Los resultados parecen demostrar muy

claramente que la inmunosenescencia propia de una mayor edad (cronológica o biológica) puede ser modulada por la ingestión, durante tiempos no muy largos, de cantidades adecuadas de antioxidantes y conseguirse una funcionalidad inmunitaria semejante a la que muestran los individuos adultos sanos.

Los antioxidantes, el envejecimiento y la longevidad saludable

En la presente tesis nos hemos centrado en la definición de envejecimiento de Shock (1979): *“una pérdida progresiva de rendimiento, de homeostasis y de resistencia a los estreses medioambientales”*, asumiendo que es un proceso biológico que presentan todos los organismos, incluso en un medio ambiente óptimo. Si bien en el envejecimiento hay cambios bioquímicos, morfológicos, fisiológicos y conductuales, consideramos que es posiblemente la perspectiva fisiológica la que mejor defina las alteraciones que se manifiestan al envejecer. Con el paso del tiempo se van dando pérdidas y deterioros en prácticamente todos los órganos y sistemas, bien de tipo primario o secundarias a otras alteraciones, aunque el ritmo al que tienen lugar los cambios depende de cada tipo celular. De hecho, los tres sistemas reguladores que tenemos y que mantienen nuestra homeostasis, el sistema nervioso, el endocrino y el inmunitario, se deterioran con la edad por lo que se responde peor a las variaciones del medio interno y externo.

De todas las teorías publicadas sobre cómo se produce el envejecimiento, y que han sido recogidas en diversas revisiones (Medvedev, 1990; Hughes y Reynolds, 2005; Rattan, 2006; Viña et al., 2007a; Miquel, 2009; Brewer, 2010; Cefalu, 2011), la que, a pesar de los muchos intentos, consideramos que no ha podido ser desechada es la de los radicales libres (Harman, 1956) o como ahora se denomina más comúnmente, del daño oxidativo. Evidentemente esta teoría debe ser matizada, y, en conjunción con otras teorías elaborar una “teoría integradora” que intente dar una explicación de los mecanismos claves de “cómo” se produce el envejecimiento a los principales niveles de organización biológica. Esto se ha pretendido hacer en la Revisión 5 y en el capítulo de Miquel (2009). En esta revisión (Revisión 5) se recoge también como investigadores que han defendido, con esplendidos experimentos, que el envejecimiento es un proceso únicamente programado genéticamente, como Hayflick y su teoría del “índice mitótico” (Hayflick, 1980) (en la que se basa la del acortamiento de los telómeros, tan ampliamente aceptada a pesar de sus limitaciones para ser aplicada de forma universal a células y organismos), han modificado más recientemente su punto de vista, desechando su teoría genética (Hayflick, 2007). Como indica Miquel (2009), las células que forman los tejidos

somáticos primero siguen un programa genéticamente controlado de diferenciación celular y luego se desorganizan como consecuencia no directamente programada o “efecto secundario” del estrés oxidativo, fundamentalmente mitocondrial.

Los antioxidantes han sido precisamente muy utilizados para intentar desacreditar la teoría de la oxidación. Si ya hace años se cuestionó en base a que las especies más longevas tenían menos antioxidantes que las menos longevas, luego se demostró que este hecho era lógico dado que eran las más longevas las que menos ROS producían en sus mitocondrias y, por tanto, no necesitaban de grandes cantidades de antioxidantes endógenos (revisado por Barja, 2013). En esta revisión de Barja (2013) se defienden los dos hechos incuestionablemente ligados a la longevidad: la menor velocidad de generación de daños endógenos y poseer macromoléculas en los tejidos con elevada resistencia a la oxidación. Más recientemente, se ha postulado que si la teoría de la oxidación fuese cierta, la administración de antioxidantes debería aumentar la esperanza de vida (Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2014). En la revisión de estos autores se indica como, a pesar del elevado número de trabajos en este sentido, la cuestión sigue sin estar clarificada. Así, en los estudios existentes sobre si la vitamina C y la E (antioxidantes utilizados en la presente tesis) aumentan la esperanza de vida de toda una serie de organismos multicelulares (desde el *C. elegans* hasta la rata, ratón y cobaya), se recogen desde datos que indican aumentos, a los que no observan ningún efecto o detectan una mayor mortalidad (Pallauf et al., 2013a,b; Ernst et al., 2013). Resultados similares se han encontrado con otros antioxidantes y con mezclas de los mismos (asemejando más lo que hay en los productos naturales). En la revisión de Sadowska-Bartosz y Bartosz (2014) se sugiere la idea de que dado que los antioxidantes no han demostrado alargar la vida, especialmente en mamíferos, esto hace que la teoría de los radicales libres no sea sostenible. No obstante, se recogen también en esa revisión una serie de evidencias de que la administración a corto plazo de antioxidantes mejora toda una serie de funciones, aunque luego se recuperen los niveles previos de las mismas tras suspenderse la administración. Por tanto, una cosa es criticar el papel de los antioxidantes en la longevidad y otra en la salud. En esa revisión también se recogen trabajos que han observado que la sobreexpresión de antioxidantes, como por ejemplo la SOD, puede proteger frente al estrés oxidativo pero no alargar la vida, y que mutantes carentes de SOD no tienen una vida más corta. Los autores utilizan estos hechos para decir que no hay relación entre el daño oxidativo por la generación de radicales libres y el envejecimiento. No obstante, ellos mismos dan como explicación que hay mecanismos compensatorios, y mencionan experimentos en los que la administración de antioxidantes

permiten una mayor longevidad. Por tanto, no es lo mismo lo que sucede en organismos genéticamente modificados, en los que la maquinaria de compensación se ha puesto en marcha desde el principio de su vida, que lo que tiene lugar en los individuos normales. En estos últimos se pueden activar, por factores de estilo de vida, como puede ser la ingestión de dietas con antioxidantes, los denominados “vitagenes” que permiten preservar la homeostasis celular y la del organismo en general. Si los antioxidantes de la dieta se ha visto que pueden ser protectores a través de activar vías horméticas, que incluyen a estos “vitagenes” (Calabrese et al., 2012; Rattan, 2012), ¿cómo se puede utilizar el efecto hormético de las ROS para cuestionar la teoría de los radicales libres del envejecimiento como hacen Ristow y Schmeisser (2011)?

Posiblemente muchas de las controversias sean debidas a algunos de los diez hechos anteriormente planteados y a que se confunde fácilmente longevidad máxima con longevidad media. Lo que nuestro grupo de investigación intenta estudiar son aquellos factores del estilo de vida, entre los que se encuentra la nutrición y la presencia de antioxidantes en la misma, que permitan una mejor esperanza de vida media de cada individuo, esto es, una longevidad saludable (De la Fuente et al., 2011). Las revisiones presentadas en el Anexo sustentan esta idea.

Papel del sistema inmunitario en el envejecimiento. Teoría de la oxidación-inflamación

Como consecuencia de los trabajos de nuestro grupo, y considerando las aportaciones de otros autores, hemos propuesto una nueva teoría del envejecimiento, la de la “oxidación-inflamación”, en la que se ha sugerido que el sistema inmunitario puede tener un papel importante regulando la velocidad de envejecimiento de cada individuo y modulando lo que hemos denominado como “oxi-inflamm-aging” (De la Fuente et al., 2005, Revisión 5 y Revisión 8). En esta teoría se parte de la base de que en el envejecimiento tiene lugar un estrés oxidativo crónico, y un estrés inflamatorio crónico, dado que, como ya se ha indicado, estos dos procesos, oxidación e inflamación, están íntimamente relacionados (Vida et al., 2014). Este estrés afectaría a todas las células del organismo, generando daño, pero tendría especial relevancia en las de los sistemas homeostáticos, el nervioso, el endocrino y el inmunitario, los cuales, al no poder conservar su equilibrio redox sufrirían el daño oxidativo y, consecuentemente, una falta de función, lo que impediría un mantenimiento adecuado de la homeostasis. Este deterioro de la homeostasis daría lugar al aumento de morbilidad y mortalidad típico de la vejez.

En este contexto, nuestro sistema inmunitario por su característico funcionamiento, en el que requiere generar continuamente una elevada cantidad de compuestos oxidantes e inflamatorios, podría activar factores, como el ubicuo factor de transcripción NF- κ B, que, al alcanzar un cierto grado de activación, podría estimular la expresión de genes de compuestos oxidantes e inflamatorios (Victor y De la Fuente, 2003a). De hecho, este factor manifiesta una gran activación en las células inmunitarias en situaciones de estrés oxidativo, como la septicemia (Victor y De la Fuente, 2003a). Además, resultados de nuestro grupo de investigación han demostrado que este factor se encuentra muy activado en leucocitos de individuos viejos, no dándose dicha activación en las células de los longevos en las que se encuentra como en las de los adultos (Arranz et al., 2010a). De este modo, si esa producción de compuestos oxidantes/inflamatorios por parte de las células inmunitarias al envejecer no se regula adecuadamente, se podría entrar en un “circulo vicioso” o mejor en una “espiral viciosa”, pues las nuevas situaciones que se van generando son similares, pero no idénticas. En esa situación, la mayor cantidad de compuestos oxidantes e inflamatorios, producidos por parte del sistema inmunitario, activarían más aún la producción de los mismos vía factores como el antes mencionado NF κ B. Si esa espiral no es controlada, tales compuestos afectarían con el tiempo no sólo a las células inmunitarias, también a todas las células del organismo, contribuyendo de este modo a mantener y aumentar el estrés oxidativo crónico del mismo (De la Fuente et al., 2005).

De hecho, al envejecer las células inmunitarias generan más oxidantes y compuestos inflamatorios, especialmente en situación basal en la que los mismos no son requeridos para la función defensiva. Esto se ha comprobado sucede tanto en animales de experimentación como en el ser humano, siendo este estrés oxidativo e inflamatorio la causa del deterioro funcional de las células inmunitarias, esto es, de la inmunosenescencia. De este modo, en aquellos individuos que llegan a gran longevidad, como hemos comprobado sucede en ratones y en personas centenarias, y también nonagenarias, sus células inmunitarias no muestran el estrés oxidativo e inflamatorio de las de los ratones viejos o de las personas septuagenarias, teniendo unos niveles de oxidantes y antioxidantes y de compuestos inflamatorios y anti-inflamatorios, similares a los que se encuentran en los leucocitos de los correspondientes adultos. Consecuentemente, las células inmunitarias de estos sujetos que alcanzan gran longevidad muestran una capacidad funcional similar a la de las células de los adultos (De la Fuente et al., 2005; Alonso-Fernández et al., 2008; Arranz et al., 2008; 2010a,b; Vida et al., 2014; Maté, 2015).

Por lo indicado, si bien no parece adecuado aceptar la “la teoría inmunitaria” del envejecimiento, tal cual fue emitida hace años (Makinodan, 1977, 1998; Makinodan y Kay, 1980; Walford, 1969,1987), ya que ésta proponía como causa del envejecimiento el deterioro del sistema inmunitario, y esta idea no se acoge al principio de universalidad, al no disponer todos los animales de sistemas defensivos similares al que muestran los mamíferos, sí se propone que el sistema inmunitario pueda jugar un papel trascendente en la oxidación que subyace al envejecimiento y en la aceleración del mismo.

Con este enfoque, la teoría de la oxidación-inflamación, en lo que respecta a la propuesta de que el sistema inmunitario puede modular la velocidad a la que envejecen los individuos, puede ser de aplicación universal, hecho imprescindible para poder aceptar cualquier teoría sobre el envejecimiento. En toda una serie de experimentos se ha comprobado que al envejecer son los fagocitos los que más se activan en lo que respecta a la generación de compuestos oxidantes e inflamatorios, hecho que no se aprecia de igual manera en los linfocitos (De la Fuente et al., 2004; Puerto et al., 2005b; Alonso-Fernandez, 2006; Maté, 2015, y resultados en vías de publicación). Curiosamente, los fagocitos están presentes en todos los animales, incluidos los invertebrados, los cuales carecen de linfocitos, pero presentan una inmunidad semejante a la innata de los vertebrados (Lavina y Strand, 2002; Tiouvanzian et al., 2003; Manaka et al., 2004; Meister, 2004; Crozatier y Mester, 2007). Además, el regulador clave de la inmunidad innata, el sistema NF-kB, es una vía antigua de señalización que ha sido encontrada tanto en vertebrados como en invertebrados y, como se ha indicado, es la clave de la inflamación en el envejecimiento (Salminen et al., 2008a,b).

¿Podría el sistema inmunitario estar diseñado para controlar la velocidad de envejecimiento?

Aceptando la idea de que el sistema inmunitario, al menos en su aspecto más primitivo y extendido de la inmunidad innata protagonizada por las células fagocíticas, podría ser un modulador de la velocidad de envejecimiento, gracias a poder modular el estado de oxidación e inflamación del organismo, sería posible dar un paso más y asumir que esa es una de sus funciones en la naturaleza. Siguiendo el razonamiento planteado por Besedovsky y Del Rey (1996), según el cual el sistema inmunitario no es sólo un claro sistema homeostático, también se puede comportar como antihomeostático, se entiende el hecho, que estos autores ponen como ejemplo, de que en un shock séptico, el individuo no muera como consecuencia del agente infeccioso, sino del sistema

inmunitario desregulado que al producir tantos compuestos oxidantes e inflamatorios acaba produciendo el fallo multiorgánico. La explicación que dan estos investigadores es que si el sistema inmunitario se encuentra incapaz de poder defender al individuo de la infección, utiliza sus herramientas de oxidación e inflamación para sacrificarlo en beneficio del resto de los individuos de la especie a los que podría infectar. Nuestra propuesta es aplicar esta idea a lo que sucede en el envejecimiento. Desde que nacemos nuestro sistema inmunitario se tiene que enfrentar a numerosos agentes extraños y, para defendernos de los mismos, ha ido liberando compuestos oxidantes e inflamatorios. Cuanto mejor lo hace, más fácil es que sobreviva el individuo y llegue a la edad reproductora (lo que le interesa a la especie para su mantenimiento). El sistema inmunitario no está diseñado evolutivamente para mantener mucho tiempo su función defensiva, especialmente en individuos de algunas especies como la humana que ha aumentado tanto su esperanza de vida media. Esta teoría evolutiva de la inmunosenescencia (Franceschi et al., 1999) nos explica por qué la inmunidad adquirida, más especializada y sofisticada y más reciente en términos evolutivos, es la que sufre el mayor deterioro con el envejecimiento, mientras que la inmunidad innata, más antigua y menos específica es la que mejor se preserva e incluso la que se estimula excesivamente, siendo la principal causante del estrés oxidativo que acontece al envejecer. Al igual que pasa con la utilización del oxígeno, que nos permite vivir con gran actividad pero que tiene la contrapartida de generar oxidación, un sistema inmunitario muy activo está diseñado para defendernos mejor de las infecciones y tumores a los que estamos sometidos continuamente, pero después hay que pagar las consecuencias de esa activación y la misma, si no se encuentra bien controlada o no hay una buena adaptación del individuo, participa acelerando el proceso de envejecimiento. Así, podría ser un sistema eficaz para eliminar a los individuos ya no útiles para el mantenimiento de la especie.

¿El efecto de los antioxidantes podría ratificar el papel del sistema inmunitario en el envejecimiento?

Una forma de confirmar la idea expuesta anteriormente sería que aquellas intervenciones que permitan mantener un mejor estado redox y función inmunitaria y, consecuentemente, puedan romper el “círculo vicioso” o “espiral viciosa” comentada en la teoría de la oxidación-inflamación, consigan una mayor longevidad saludable de los individuos.

Dentro de las estrategias que ha analizado y sigue estudiando nuestro grupo de investigación (De la Fuente et al., 2011), la presente tesis se enmarca en la de la nutrición con dietas que contengan cantidades apropiadas de antioxidantes. El planteamiento es que si el proceso de envejecimiento se debe a un estrés oxidativo e inflamatorio crónico en el que el sistema inmunitario mal regulado puede intervenir acelerando dicho proceso, la administración de cantidades adecuadas de antioxidantes, que también son anti-inflamatorios, podría permitir alcanzar el equilibrio que se requiere para el mantenimiento de un buen sistema inmunitario y, consecuentemente, de la salud.

Los datos de la presente tesis han comprobado que efectivamente, una serie de dietas con antioxidantes permiten mejorar la función inmunitaria y en el envejecimiento (en animales de experimentación y en el ser humano), tanto cronológico como biológico, hacer que los valores funcionales de las células inmunitarias sean similares a las de los adultos. Esto ha sido ratificado con los resultados de otras tesis doctorales del grupo. Así, se confirmó que esta intervención “rejuvenecía” la función inmunitaria, pero también mejoraba la de los otros sistemas reguladores, especialmente el sistema nervioso (la respuesta conductual de los ratones se mejoraba significativamente) (Guayerbas, 2003; Alvarado, 2006; Álvarez, 2006; Baeza, 2009 y Arranz, 2009). En algunos de los trabajos también se demostró que esta intervención aumentaba la longevidad de los animales (Guayerbas, 2003 y Alvarado, 2006).

El sistema inmunitario como marcador de edad biológica. Modelo de envejecimiento prematuro

La presente tesis ha permitido también hacer una cierta aportación a otro de los retos de nuestro grupo de investigación: el demostrar que algunas capacidades funcionales del sistema inmunitario pueden servir como marcadores de la velocidad a la que cada individuo envejece, esto es, que pueden ser indicadores de la edad biológica. Ya se comentó en la introducción el concepto de edad biológica, la cual tiene mayor valor de predicción de la longevidad que la edad cronológica (Soler y Miquel, 2009). Si cuantificar la edad cronológica es fácil, no lo es el conocer la edad biológica de un individuo. Como se indicó en la introducción, ha habido intentos de aportar marcadores de edad biológica, uno de ellos ha sido publicado muy recientemente (Belsky et al., 2015), pero, a pesar del progreso que ya representa este reciente trabajo y las novedades que aporta, no ha habido todavía una adecuada acreditación de los marcadores propuestos. Para acreditar a unos parámetros como marcadores de “edad biológica” y, por

tanto, predictores de longevidad, es necesario que el valor que muestren en un individuo se relacione con lo que vive el mismo. En este sentido hemos utilizado dos aproximaciones experimentales para acreditar a los parámetros inmunitarios como marcadores de edad biológica. Una de ellas, ha sido el comprobar que individuos que llegan a gran longevidad (personas centenarias y ratones longevos) tienen esos parámetros con valores típicos de la edad adulta (Alonso-Fernández et al., 2008; Arranz et al., 2010a,b,c). Otra aproximación ha sido demostrar que adultos que muestran en esos parámetros valores típicos de una edad cronológicamente mayor, realmente mueren antes. Esto, sólo es posible hacerlo en animales de experimentación con una longevidad media mucho menor que la humana, como sucede en los ratones con sus 2 años de esperanza de vida media. Y lo hemos podido hacer gracias a contar con el modelo de PAM que se inició con un trabajo que forma parte de la presente tesis. La inmunosenescencia prematura detectada en los PAM se acompaña con una menor esperanza de vida que la de los NPAM de la misma edad cronológica (Guayerbas et al., 2002a,c, Guayerbas,2003; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Álvarez, 2006; Alvarado, 2006).

En este modelo de PAM, cuya inmunosenescencia prematura se debe a un prematuro estrés oxidativo e inflamatorio, la ingestión de dietas con cantidades apropiadas de antioxidantes han demostrado que pueden “rejuvenecer” la edad biológica y consecuentemente, aumentar la longevidad (Guayerbas, 2003; Alvarado, 2006; Álvarez, 2006). En la presente tesis también se ha comprobado el efecto positivo que la ingestión de antioxidantes tiene en la función inmunitaria de los PAM.

Por todo lo indicado, y aún teniendo en cuenta las controversias sobre los efectos beneficiosos o nocivos de los antioxidantes, la propuesta es que si bien ingerir una dieta con alimentos que contengan antioxidantes es incuestionablemente positivo para la función inmunitaria, los suplementos pueden también serlo, dependiendo de la cantidad de antioxidantes, el tiempo de ingestión, la edad y el estado de salud del individuo. Si la capacidad funcional inmunitaria se acepta como un excelente marcador de salud, y la ingestión apropiada de antioxidantes mejora esta capacidad, podríamos plantear la ingestión de dietas con antioxidantes, con todas las precauciones ya mencionadas, como una herramienta útil para conseguir una longevidad saludable.



5. CONCLUSIONES

“La vida es el arte de sacar conclusiones suficientes a partir de datos insuficientes”.

Samuel Butler (novelista inglés: 1835-1902).

“All aspects of aerobic life involve free radicals and antioxidants- you cannot escape them, nor should you wish to”.

Barry Halliwell (2006). (Bioquímico inglés. Universidad Nacional de Singapur)

De los resultados obtenidos, como respuesta a los objetivos planteados, en la presente tesis se deducen las siguientes conclusiones:

1. Los antioxidantes ácido ascórbico (en rango de concentraciones de 0,005 a 1 mM), vitamina E (de 0,005 a 0,01 mM), glutatión (de 0,5 a 5 mM), N-acetil cisteína y tioprolina (en rango de 0,1 a 1 mM) estimulan *in vitro* las funciones del proceso fagocítico, esto es, adherencia, movilidad espontánea y dirigida (quimiotaxis), fagocitosis y niveles de anión superóxido, de macrófagos peritoneales de ratones adultos.
2. Los antioxidantes que contienen sulfuro como el glutatión (en rango de 0,5 a 5 mM), la N-acetilcisteína y tioprolina (de 0,1 a 1 mM) y la taurina (de 4 a 40 mM) estimulan *in vitro* diversas funciones de los linfocitos de ganglios axilares, bazo, timo y peritoneo de ratones adultos, como la adherencia, la movilidad espontánea, la quimiotaxis y la proliferación, tanto basal como en respuesta al mitógeno Concanavalina A. También aumentan la viabilidad de estas células en cultivo.
3. El antioxidante N-acetilcisteína, en un rango de concentraciones de 0,001 a 2,5 mM, mejora *in vitro* las funciones del proceso fagocítico de macrófagos (adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido), y la adherencia y quimiotaxis de linfocitos peritoneales de ratones viejos, asemejando los valores de las mismas a los de los animales adultos.
4. Los antioxidantes glutatión y tioprolina a las concentraciones de 5 y 1 mM, respectivamente, mejoran *in vitro* la movilidad espontánea, la quimiotaxis y la proliferación en respuesta al mitógeno Concanavalina A, de linfocitos de ganglios axilares, bazo y timo de ratones viejos, asemejando los valores de dichas funciones a los que tienen los ratones adultos. También mejoran la viabilidad de estas células en cultivo.

5. Los antioxidantes tioprolina y N-acetilcisteína a concentración 1mM y el ácido ascórbico y vitamina E a 0,005 mM, estimulan *in vitro* la actividad NK de células de ganglios axilares, bazo, timo y peritoneo, de ratones jóvenes, adultos, maduros y viejos.
6. La ingestión por cobayas de vitamina E en la dieta, en cantidades más altas que las habituales, de 1500 mg/kg, en comparación con otras dietas conteniendo una cantidad intermedia de 150 mg/kg o baja cantidad de 15 mg/kg, durante 5 semanas, mejora una serie de funciones de macrófagos y linfocitos peritoneales y la proliferación de linfocitos esplénicos.
7. La ingestión de una dieta con 0,1 % p/p de N-acetilcisteína y tioprolina durante 5 semanas estimula una serie de funciones de los macrófagos peritoneales de ratones adultos de las cepas Swiss y BALB/c, como la adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y secreción de IL-1 β , hecho que sucede de forma más significativa en los ratones Swiss.
8. La ingestión de dietas con 0,1 % y 0,3 % de N-acetilcisteína y tioprolina durante 4 semanas por ratones Swiss adultos y viejos estimula una serie de funciones de macrófagos peritoneales y de linfocitos del peritoneo, de ganglios axilares, bazo y timo, siendo más efectiva la de 0,1% en los animales adultos y la de 0,3% en los viejos.
9. La ingestión de una dieta suplementada con 0,07% p/p de tioprolina durante 5 semanas por ratones Swiss viejos asemeja los valores de la movilidad espontánea y dirigida (quimiotaxis), de la proliferación en respuesta a Concanavalina A, de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y de la actividad NK de leucocitos de bazo y timo, a los que tienen los animales adultos.

10. Los ratones Swiss viejos que realizan la exploración de un laberinto en T de forma “lenta” tienen unas funciones en las células inmunitarias de peritoneo, ganglios axilares, bazo y timo más deterioradas que las de los ratones que realizan la exploración de forma “rápida”.

11. En los ratones Swiss y BALB/c viejos que realizan de forma “lenta” la exploración del laberinto en T y que han sido denominados PAM (del inglés: *prematurely aging mice*), y en los que la hacen de forma “rápida” o NPAM (*non prematurely aging mice*), la ingestión de una dieta suplementada con 0,1 % p/p de N-acetilcisteína y tioprolina durante 5 semanas, mejora las quimiotaxis, proliferación y actividad NK de leucocitos de ganglios axilares, bazo y timo, asemejando sus valores a los de los animales adultos. Esta mejoría es más significativa en los PAM.

12. La ingestión de una dieta suplementada con polifenoles durante 15 y 30 semanas en ratones maduros y viejos, respectivamente, mejora las funciones de macrófagos y linfocitos peritoneales deterioradas por la edad.

13. La ingestión de un suplemento de vitamina C (1g/día) y vitamina E (200 mg/día) durante 16 semanas por mujeres septuagenarias sanas, con depresión y cardiopatía coronaria, mejora la capacidad funcional de neutrófilos y la proliferación de linfocitos de sangre periférica, disminuyendo los niveles de peroxidación lipídica sérica. Los efectos son más marcados en las mujeres con patologías, que parten de peores valores antes de la suplementación.

14. La ingestión de un suplemento de vitamina E (200 mg/día) durante 3 meses por hombres y mujeres septuagenarios mejora toda una serie de funciones de neutrófilos y linfocitos de sangre periférica (adherencia, quimiotaxis, fagocitosis, niveles de anión superóxido, proliferación, secreción de IL-2 y actividad NK), asemejando los valores de las mismas a los de los hombres y mujeres adultos. Los

efectos positivos se mantienen en algunas funciones tras 6 meses de finalizar la suplementación.

15. La ingestión de un suplemento de vitamina C (500 mg/día) y de vitamina C (500 mg/día) y vitamina E (200 mg/día) durante 3 meses por hombres y mujeres septuagenarios mejora las funciones de neutrófilos y linfocitos de sangre periférica, asemejando los valores de las mismas a los de los adultos. El efecto, que fue similar en la suplementación sólo de vitamina C o en la conjunta con vitamina E, permaneció al menos 6 meses después de finalizar la suplementación en algunas funciones.



CONCLUSIÓN GENERAL

“If we could give every individual the right amount of nourishment and exercise, not too little and not too much, we World have found the safest way to health”.

Hipócrates (460-377 antes de Cristo).

□

De los resultados obtenidos se desprende que la ingestión de algunos antioxidantes, como los estudiados de la presente tesis, en cantidades apropiadas, favorece una mejor función de las células inmunitaria, por una acción directa sobre las mismas, tanto en la edad adulta como, especialmente, al envejecer. Esto supone una mejor capacidad defensiva frente a infecciones y cánceres a lo largo de la vida. Además, dado el carácter de marcador de salud y edad biológica, así como de predicción de longevidad que poseen las funciones inmunitarias estudiadas y el deterioro inmunitario que tiene lugar al avanzar la edad, esa ingestión de antioxidantes podría permitir una mayor y más saludable longevidad.



6. BIBLIOGRAFÍA

(Utilizada en la Introducción y Discusión de la Tesis)

“Toda nuestra ciencia, contrastada con la realidad es primitiva y pueril; y, sin embargo, es lo más valioso que tenemos”.

Albert Einstein (físico: 1879-1955).

“Se cometen menos errores usando datos incorrectos que no empleando dato alguno”.

Charles Babbage (1792-1871). Matemático inglés

A

- Abdel-Wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Ellah MF, Helal GK, Khalifa F, Hamada FM. (2003). Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacol Res.* 48: 461-465.
- Abe N, Kashima Y, Izawa A, Motoki H, Ebisawa S, Miyashita Y, Imamura H, Ikeda U. (2015). A 2-year follow-up of oxidative stress levels in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: A subanalysis of the ALPS-AMI Study. *Angiology.* 66(3):271-7.
- Actis-Goretta L, Carrasquedo F, Fraga CG. (2004). The regular supplementation with an antioxidant mixture decreases oxidative stress in healthy humans. Gender effect. *Clin Chim Acta.* 340: 97-103.
- Adam A, Crespy V, Levrat-Verny M, Leenhardt F, Leulliet M, Demigne C, Remesy C. (2002). The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J Nutr.* 132: 1962-1968.
- Ademokun A, Wu YC, Dunn-Walters D (2010). The ageing B cell population: composition and function. *Biogerontology.* 11(2):125-37.
- Ader R. (2000). On the development of psychoneuroimmunology. *Eur J Pharmacol.* 405(1-3): 167-176.
- Ader R, Felten DL, Cohen N (eds). (2001). *Psiconeuroimmunology.* Academia Press, London
- 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.
- Afanas'eva IB, Ostrakhovitch EA, Mikhal'chik EV, Ibragimova GA, Korkina LG. (2001). Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochem Pharmacol.* 61: 677-684.
- Agarwal S, Busse PJ. (2010). Innate and adaptive immunosenescence. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 104(3):183-90.
- Agarwal R, Tripathi AK, Chakrabarty AK. (2003). Effect of ascorbic acid on stimulatory status of activated mouse peritoneal phagocytes. *Indian J Exp Biol.* 41(4): 290-295.
- Agus DB, Gambhir SS, Pardridge WM, Spielholz C, Baselga J, Vera JC, Golde DW. (1997). Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J Clin Invest.* 100(11): 2842-2848.
- Ahlwalia N, Mastro AM, Ball R, Miles MP, Rajendra R, Handte G. (2001). Cytokine production by stimulated mononuclear cells did not change with aging in apparently healthy, well-nourished women. *Mech Ageing Dev.* 122(12): 1269-1279.
- Ahmed T, Marko M, Wu D, Chung H, Huber B, Meydani SN. (2004). Vitamin E supplementation reverses the age-associated decrease in effective immune synapse formation in CD4+ T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1031: 361-364.
- Albers R, Antoine JM, Bourdet-Sicard R, Calder PC, Gleeson M, Lesourd B, Samartín S, Sanderson IR, Van Loo J, Vas Dias WF, Watzl B. (2005). Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. *Br J Nutr.* 94: 452-481.
- Albright JW, Albright JF. (1998). Impaired natural killer cell function as a consequence of aging. *Exp Gerontol.* 33(1-2):13-25.
- Albright JW, Bream JH, Bere EW, Young HA, Winkler-Pickett R, Ortaldo JR. (2004). Aging of innate immunity: functional comparisons of NK/LAK cells obtained from bulk cultures of young and aged mouse spleen cells in high concentrations of interleukin-2. *Exp Gerontol.* 39: 73-82.
- Allen RG, Tresini M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 28 (3): 463-499.

- Allman D, Miller JP. (2005). B cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol.* 17(5): 463-467.
- Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro Ados S, Falcão RR, Abdelhay E, Bouzas LF, Thuler LC, Ornellas MH, Diamond HR. (2011). Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol.* 72: 319-29.
- Alonso-Fernandez P, De la Fuente M. (2011). Role of the immune system in aging and longevity. *Curr Aging Sci.* 4 (2):78-100.
- Alonso-Fernandez P, Puerto M, Maté I, Ribera JM, De la Fuente M (2008) Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of adults *J Am Geriatr Soc* 56: 2244-51.
- Alvarado C. (2006). Efecto de la ingestión de una dieta enriquecida en antioxidantes sobre el estado funcional y de estrés oxidativo de leucocitos peritoneales de ratón. Cambios con la edad y en respuesta a un proceso infeccioso. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Alvarado C, Álvarez P, Guayerbas N, Puerto M, Jiménez L, De la Fuente M. (2005a). El daño peroxidativo en leucocitos peritoneales de ratones viejos disminuye suplementando la dieta con galletas enriquecidas con antioxidantes. Relación con la supervivencia. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 40(6): 362-367.
- Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L, De la Fuente M. (2005b). Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. *Antioxidants & Redox Signals.* 7 (9&10): 1203-1210.
- Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L, De la Fuente M. (2006a). Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants. *Develop. Comp. Immunol.* 30: 1168-1180.
- Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausserés N, Jimenez L, De la Fuente M. (2006b). Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* 22: 767-777.
- Álvarez P. (2006). La suplementación en la dieta con compuestos antioxidantes mejora la función y neutraliza el estrés oxidativo de leucocitos peritoneales de ratón. Papel en el envejecimiento y en el shock endotóxico. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Alvarez P, Alvarado C, Jimenez L, De la Fuente M. (2008). Effects of a diet with polyphenol-rich cereal supplementation on the function and redox state of peritoneal leukocytes from mice: differences between a short (5-weeks) and long (20-weeks) period of supplementation. *P Nutr Soc.* 67 (OCE): E23.
- Alvarez P, Alvarado C, Mathieu F, Jimenez L, De la Fuente M. (2006a). Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leukocytes. *Eur J Nutr.* 45: 428-438.
- Alvarez P, Alvarado C, Puerto M, Schlumberger A, Jimenez L, De la Fuente M. (2006b). Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals. *Nutrition.* 22: 913-921.
- Álvarez E, Conde M, Machado A, Sobrino F, Santa María C. (1995). Decrease in free-radical production with ageing rat peritoneal macrophages. *Biochem J.* 312 (2): 555-560.
- Álvarez E, Ruíz-Gutiérrez V, Sobrino F, Santa María C. (2001). Age-related changes in membrane lipid composition, fluidity and respiratory burst in rat peritoneal neutrophils. *Clin Exp Immunol.* 124(1): 95-102.
- Anastassiou ED, Pañiogianni F, Balow JP, Yamada H, Boumpas DT. (1992). Prostaglandin E2 and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL-2R alpha gene. *J Immunol.* 148: 2845-2852.

- Anderson R (1979). Effects of ascorbate on leucocytes: Part II. Effects of ascorbic acid and calcium and sodium ascorbate on neutrophil phagocytosis and post-phagocytic metabolic activity. *S Afr Med J.* 56(10):401-4.
- Anderson R, Luckey PT. (1987). A biological role for ascorbate in the selective neutralization of extracellular phagocyte-derived oxidants. *Ann N Y Acad Sci.* 498: 229-247.
- Andreasen MF, Landbo A-K, Christensen LP, Hansen A, Meyer AS. (2001). Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem.* 49: 4090-4096.
- Annunziato F, Romagnani S. (2009). Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther.* 11: 257.
- Arnalich F, Hernanz A, López-Maderuelo D, De la Fuente M, Arnalich FM, Andres-Mateos E, Fernández-Capitán C, Montiel C. (2001). Intracellular glutathione deficiency is associated with enhanced nuclear factor-kappaB activation in older non-insulin dependent diabetic patients. *Free Radic Res.* 35(6):873-84.
- Arranz L (2009). Mecanismos de inmunosenescencia y longevidad. Posibles estrategias para mejorar la calidad de vida en el envejecimiento. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Arranz L, Caamaño J, 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. *J Gerontol A Biol. Sci.* 65A:941-950.
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I, De la Fuente M. (2010b). Differential expression of Toll-like receptor 2 and 4 on peritoneal leukocyte populations from long-lived and non-selected old female mice. *Biogerontology.* 11:475-482.
- Arranz L, De Vicente A, Muñoz M, De la Fuente M. (2009). Impairment of immune function in the social excluded homeless population. *Neuroimmunomodulation.* 16: 251-60.
- Arranz L, Fernandez C, Rodriguez A, Ribera JM, De la Fuente M. (2008). The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Rad Biol Med.* 45: 1252-1262.
- Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M. (2007). Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res.* 62: 1-8.
- Arranz L, Lord JM, De la Fuente M. (2010c). Preserved ex vivo inflammatory status and cytokine responses in naturally long-lived mice. *Age* 32: 451-66.
- Arranz L, Naudi A, De la Fuente M, Pamplona R. (2013). Exceptionally old mice are highly resistant to lipoxidation-derived molecular damage. *AGE.* 35 (3):621-635.
- Arzi A, Hemmati AA, Razian A. (2004). Effect of vitamin C and E on cognitive function in mouse. *Pharmacol Res.* 49: 249-252.
- Ashfaq MK, Zuberi HS, Anwar Waqar M.(2000). Vitamin E and beta-carotene affect natural killer cell function. *Int J Food Sci Nutr.* 51 Suppl:S13-20.
- Aspinall R. (2000). Longevity and the immune response. *Biogerontology.* 1(3): 273-278.
- Atalay M, Marnila P, Lilius EM, Hänninen O, Sen CK. (1996). Glutathione-dependent modulation of exhausting exercise-induced changes in neutrophil function of rats. *Eur J Appl Physiol.* 74: 342-347.
- Aw D, Silva AB, Palmer DB. (2007). Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* 120: 435-446.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014:360438.
- Azzi A. (2004). The role of a-tocopherol in preventing disease. *Eur J Nutr.* 43 (1): 18-25.

- Azzi A, Gysi R, Kempná P, Munteanu A, Negis Y, Villacorta L, Visarius T, Zingg JM. (2004). Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 1031: 86-95.

B

- Babior BM. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 109: 3-44.
- Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 397(2): 342-344.
- Bachmann MF (2012). Taurine: energy drink for T cells. *Eur J Immunol.* 42(4):819-21.
- Bae ChY, Kang YG, Kim S, Cho Ch, Kang HCh, Yu BY, Lee S, Cho KH, Lee DCh, Lee K, Kim JS, Shin KK. (2008). Development of models for predicting biological age (BA) with physical, biochemical, and hormonal parameters. *Arch Gerontol Geriatr.* 47: 253-65.
- Baeuerle PA, Henkel T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 12: 141-179.
- Baeza (2009). La ovariectomía como modelo murino de envejecimiento prematuro y sus efectos sobre la función inmunitaria. Intervenciones hormonales y nutricionales. Tesis Doctoral. Universidad Complutense e Madrid.
- Baeza I, Alvarado C, Alvarez P, Salazar V, Castillo A, Ariznavarreta C, Tresguerras JF, De la Fuente M. (2009). Improvement of leukocyte functions in ovariectomised aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogens or phyto-oestrogens. *J Reprod Immunol.* 80:70-79.
- Baeza I, De Castro NM, Alvarado C, Alvarez P, Arranz L, Bayon J, De la Fuente M. (2007). Improvement of immune cell functions in aged mice treated for 5 weeks with soybean isoflavones. *Ann N Y Acad Sci.* 1100:497-504.
- Baeza I, De Castro NM, Arranz L, De la Fuente M. (2010). Soybean and green tea polyphenols improve immune function and redox status in very old ovariectomized mice. *Rejuvenation Res.* 13 (6): 665-674. 2010.
- Bagasra O, Howedy A, Kajdacsy-Balla A. (1988). Macrophage function in chronic experimental alcoholism. I. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunology.* 65(3): 405-409.
- Bai J, Cederbaum A. (2001). Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biol Signals Recept.* 10(3-4):189-99.
- Bai X, Han L, Liu Q, Shan H, Lin H, Sun X, Chen XM. (2010). Evaluation of biological aging process - a population-based study of healthy people in China. *Gerontology.* 56(2):129-40.
- Bainton DF. (1980). The cells of inflammation: A General View, En: Weissman G (Ed.), *Handbook of Inflammation*, pp: 1-25. Elsevier/North-Holand Biomedical Press, Amsterdam.
- Bakunina N, Pariante CM, Zunszain PA. (2015). Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology.* doi: 10.1111/imm.12443.
- Baldwin AS. (2001). Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest.* 107(1): 3-6.
- Balkan J, Doğru-Abbasoğlu S, Kanbağlı O, Cevikbaş U, Aykaç-Toker G, Uysal M. (2001). Taurine has a protective effect against thioacetamide-induced liver cirrhosis by decreasing oxidative stress. *Hum Exp Toxicol.* 20(5):251-4.
- Ball SS, Weindruch R, Walford RL. (1996) *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases.* Johnson Jr JE, Walford R, Harman D Miquel J (eds). pp 427-456. Liss New York.

- Ballatori N, Krance SM, Marchan R, Hammond CL.(2009). Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med.* 30(1-2):13-28.
- Banachlocha M. M. (2001). Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Med. Hypoth.* 56: 472-477
- Bánhegyi G1, Braun L, Csala M, Puskás F, Mandl J.(1997). Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radic Biol Med.* 23(5):793-803.
- Barak Y. (2006). The immune system and happiness. *Autoimmun Rev.* 5: 523-27.
- Barja G. (2004). Free radicals and aging. *Trends Neurosci.* 27: 595-600.
- Barja G. (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* 31(4): 347-366.
- Barja G (2013). Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts. *Antioxid Redox Signal.* 19(12):1420-45.
- Barja G, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M, Prat J, Pamplona R. (1996). Effect of dietary vitamin E levels on fatty acid profiles and nonenzymatic lipid peroxidation in the guinea pig liver. *Lipids.* 31(9): 963-970.
- Barja G, López-Torres M, Pérez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Prat J, Pamplona R. (1994). Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. *Free Radic Biol Med.* 17(2): 105-115.
- Bartoc R., Bruhis S., Klein R., Moldoveanu E., Oeriu I., Oeriu S. (1975). Effect of age and SH active groups on the activity of some enzymes involved in the carbohydrate metabolism. *Exp. Gerontol.* 10: 161.
- Baublis AJ, Lu C, Clydesdale FM, Decker EA. (2000). Potential of wheat-based breakfast cereals as a source of dietary antioxidants. *J Am Coll Nutr.* 19: 308-311.
- Bauer ME. (2005). Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress.* 8(1): 69-83.
- Bauer ME, Jeckel CM, Luz C.(2009). The role of stress factors during aging of the immune system. *Ann N Y Acad Sci.* 1153:139-52.
- Beharka AA, Han SN, Adolfsson O, Wu D, Smith D, Lipman R, Cao G, Meydani M, Meydani SN. (2000). Long-term dietary antioxidant supplementation reduces production of selected inflammatory mediators by murine macrophages. *Nutr Res.* 20(2): 281-296.
- Beharka AA, Wu D, Han SN, Meydani SN. (1997). Macrophage prostaglandin production contributes to the age-associated decreased in T cell function which is reversed by the dietary antioxidant vitamin E. *Mech Ageing Dev.* 93: 59-77.
- Beharka AA, Wu D, Mauro S, Meydani SN. (2002). Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. *Free Radic Biol Med.* 32: 503-511.
- Bellinger DL, Madden KS, Lorton D, Thyagarajan S, Felten DL. (2001). Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in immunosenescence. En: Ader R, Felten DL, Cohen N, Eds. *Psychoneuroimmunology.* pp. 241-86. Academic Press. San Diego.
- Belsky DW, Caspi A, Houts R, Cohen HJ, Corcoran DL, Danese A, Harrington H, Israel S, Levine ME, Schaefer JD, Sugden K, Williams B, Yashin AI, Poulton R, Moffitt TE. (2015). Quantification of biological aging in young adults. *PNAS* . doi/10.1073/pnas.1506264112:1-7.
- Bendich A. (1989). *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine II.* Miquel J, Quintanilla AT, Weber H (eds) 153-160. CRC Press Florida.
- Bendich A. (1997). Vitamin C safety in humans. En: Packer L, Fuchs J, eds. *Vitamin C in health and disease.* New York: Marcel Dekker Inc, 367-379.

- Benfante R, Reed D, Brody J. (1985). Biological and social predictors of health in an aging cohort. *J Chron Dis.* 38: 385-395.
- Berger MM, Oudemans-van Straaten HM.(2015). Vitamin C supplementation in the critically ill patient.*Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 18(2):193-201.
- Bergsten P, Amitai G, Kehrl J, Dhariwal KR, Klein HG, Levine M. (1990). Millimolar concentrations of ascorbic acid in purified human mononuclear leukocytes. Depletion and reaccumulation. *J Biol Chem.* 265(5):2584-7.
- Bertelli AA, Ferrara F, Diana G, Fulgenzi A, Corsi M. et al. (1999). Resveratrol, a natural stilbene in grapes and wine, enhances intraphagocytosis human promonocytes: a co-factor in antiinflammatory and anticancer chemopreventive activity. *Int J Tissue React.* 21: 93-104.
- Besedovsky H, Del Rey A. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrin Rev.* 17: 64-102.
- Besedovsky HO, Del Rey A. (2007). Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immunol.* 21: 34-44.
- Besedovsky HO, Del Rey A. (2011). Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem Res.* 36: 1-6.
- Besedovsky H, Sorkin E, Felix D, Haas H. (1977). Hypothalamic changes during the immuneresponse. *Eur J Immunol.* 7(5): 323-325.
- Besedovsky H, Sorkin E, Keller M, Muller J. (1975). Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc Soc Exp Biol Med.* 150(2): 466-470.
- Betz M, Fox BS. (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol.* 146:108-113.
- Bezlepkin VG, Sirota NP, Gaziev AI. (1996). The prolongation of survival in mice by dietary antioxidants depends on their age by the start of feeding this diet. *Mech Ageing Dev.* 92(2-3): 227-34.
- Bhullar KS, Hubbard BP. (2015). Lifespan and healthspan extension by resveratrol.*Biochim Biophys Acta.* 1852(6):1209-1218.
- Blalock JE. (1984). The immune system as a sensory organ. *J Immunol.* 132: 1067-70.
- Blalock JE (1989). A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev.* 69(1):1-32.
- Blalock JE. (1994). The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today.* 15: 504-511.
- Blalock JE. (2005).The immune system as the sixth sense. *J Intern Med.* 257(2): 126-138.
- Bollier F, Martin M. (1972). Thiazolidine-4-carboxylic acid, a fundamental molecule in the supply of sulphhydryl groups for liver detoxification and improvement of phatogenesis. *Gazz Med Ital.* 131: 251-255.
- Bonahomi L, Gazzaniga A. (1980).Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. *Eur J Respir Dis.* 61 (Suppl 111): 45 - 51.
- Borkan A, Norris AH. (1980). Assessment of biological age using a profile of physical parameters. *J Gerontol.* 35: 177-84.
- Borrego F, Alonso MC, Galiani MD, Carracedo J, Ramirez R, Ostos B, Peña J, Solana R. (1999). NK phenotypic markers and IL-2 response in NK cells from elderly people. *Exp Gerontol.* 34: 253-265.
- Bou Ghanem EN, Clark S, Du X, Wu D, Camilli A, Leong JM, Meydani SN (2015). The α -tocopherol form of vitamin E reverses age-associated susceptibility to streptococcus pneumoniae lung infection by modulating pulmonary neutrophil recruitment. *J Immunol.* 194(3):1090-9.
- Bowen HT, Omaye ST. (1998). Oxidative changes associated with beta-carotene and alpha-tocopherol enrichment of human low-density lipoproteins. *J Am Coll Nutr.* 17:171-179.

- Bowie AG, O'Neill LAJ. (2000). Vitamin C inhibits NF-kB activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol.* 165: 7180-7188.
- Boxer LA (1995) Neutrophil disorders: qualitative abnormalities of the neutrophil. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA (eds). *Hematology Fifth*, McGraw-Hill. New York.
- Boyd SD, Liu Y, Wang C, Martin V, Dunn-Walters DK. (2013). Human lymphocyte repertoires in ageing. *Curr Opin Immunol.* 25: 511-5.
- Braga PC, Sala MT, Dal Sasso M, Pecile A, Annoni G, Vergani C. (1998). Age-associated differences in neutrophil oxidative burst (chemiluminescence). *Exp Gerontol.* 33: 477-484.
- Brambilla D, Mancuso C, Scuderi MR, Bosco P, Cantarella G, Lempereur L, Di Benedetto G, Pezzino S, Bernardini R (2008) The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. *Nutr J* 7: 29-38.
- Brausi M, Rizzi F, Bettuzzi S (2008). Chemoprevention of human prostate cancer by green tea catechins: two years later. A follow-up update. *Eur Urol.* 54(2):472-3.
- Brewer GJ. (2010). Epigenetic oxidative redox shift (EORS) theory of aging unifies the free radical and insulin signaling theories. *Exp Gerontol.* 45(3):173-9.
- Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH.(2012). Reactive oxygen species: from health to disease *Swiss Med Wkly.* 142:w13659.
- Briehl MM, Baker AF. (1996). Modulation of the antioxidant defence as a factor in apoptosis. *Cell Death Differ.* 3(1):63-70.
- Brigelius-Flohé R. (2005). Induction of drug metabolizing enzymes by vitamin E. *J Plant Physiol.* 162: 797-802.
- Brigelius-Flohé R, Traber MG. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 13: 1145-1155.
- Brohée D, Nève P. (1995). Effect of dietary high doses of vitamin E on the cell size of T and B lymphocyte subsets in young and old CBA mice. *Mech Ageing Dev.* 85(2-3):147-59.
- Brubaker AL, Palmer JL, Kovacs EJ. (2011). Age-related dysregulation of inflammation and innate immunity: lessons learned from rodent models. *Aging Dis.* 2: 346-60.
- Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Hjelmberg J, Klarlund Pedersen B, Jeune B. (2003). Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am J Med.* 115: 278-283.
- Bub A, Watzl B, Blockhaus M, Briviba K, Liegibel U, Müller H, Pool-Zobel BL, Rechkemmer J. (2003). Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J Nutr Biochem.* 14: 90-98.
- Buko IV, Polonetskiĭ LZ, Mrochek AG, Moïseenok AG. (2014). [Antioxidant status and glutathione redox potential of erythrocytes in patients with acute coronary syndrome]. *Ukr Biokhim Zh.* 86: 114-24.
- Bulger EM, Maier RV. (2003). An argument for Vitamin E supplementation in the management of systemic inflammatory response syndrome. *Shock.* 19(2): 99-103.
- Burnet FM. (1970). An immunological approach to ageing. *Lancet.* 2: 358-360.
- Burton GW, Joyce A, Ingold KU. (1983). Is vitamin E the only lipid-soluble. Chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?. *Arch Biochem Biophys.* 221: 281-290.
- Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, O'Mahony D, Lord JM. (2001). Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol.* 70: 881-6.

C

- Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M. (1995). Vitamin E protects guinea pig liver from lipid peroxidation without depressing levels of antioxidants. *Int J Biochem Cell Biol.* 27(11): 1175-1181.
- Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M, Barja G. (1994). Effect of dietary vitamin C and catalase inhibition of antioxidants and molecular markers of oxidative damage in guinea pigs. *Free Rad Res.* 21(2): 109-118.
- Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Lavicoli I, Di Paola R, Koverech A, Cuzzocrea S, Rizzarelli E, Calabrese EJ. (2012). Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta.* 1822(5):753-83.
- Calabrese V, Cornelius C, Trovato A, Cavallaro M, Mancuso C, Di Rienzo L, Condorelli D, De Lorenzo A, Calabrese EJ. (2010). The hormetic role of dietary antioxidants in free radical-related diseases?, *Curr Pharm Des.* 16(7):877-83.
- Calandra T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune responses to microbes. *35(9): 573-576.*
- Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R. (1998). Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 95(19): 11383-11388.
- Calder PC, Kew S. (2002). The immune system: a target for functional foods?. *Br J Nutr.* 88: S165-S176.
- Camous X, Pera A, Solana R, Larbi A. (2012). NK cells in healthy and age-associated diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2012: 195956.
- Campbell JD, Cole M, Bunditruvorn B, Vella AT. (1999). Ascorbic acid is a potent inhibitor of various forms of T cell apoptosis. *Cell Immunol.* 194: 1-5.
- Carcamo JM, Pedraza A, Borquez-Ojeda O, Golde DW. (2002). Vitamin C suppresses TNF α -induced NF κ B activation by inhibiting I κ B α phosphorylation. *Biochemistry.* 41: 12995-13002.
- Carr AC, Frei B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr.* 69: 1086-1107.
- Caruso C, Candore G, Colonna-Romano G, Lio D, Franceschi C. (2005). Inflammation and life-span. *Science letters.* 307: 208.
- Carvallini D, De Marco C, Mondov B, Transati F. (1956). Studies of the metabolism of thiazolidine carboxylic acid by rat liver homogenate. *Biochem Biophys Acta.* 22: 558-564.
- Castle SC, Uyemura K, Fulop T, Hirokawa K, Makinodan T. (2006). A need to study the immune status of frail older adults. *Immun Ageing.* 3(1): 1.
- Cefalu CA (2011). Theories and mechanisms of aging. *Clin Geriatr Med.* 27(4):491-506.
- Chakraborty A, Ramani PI, Sherlin HJ, Premkumar P, Natesan A. (2014). Antioxidant and pro-oxidant activity of Vitamin C in oral environment. *Indian J Dent Res.* 25(4):499-504.
- Chandra RK. (1984). Excessive intake of zinc impairs immune responses. *JAMA.* 252(11):1443-6.
- Chandra RK. (1997). Graying of the immune system. Can nutrient supplementats improve immunity in the elderly?. *JAMA* 277:1398-1399.
- Chandra RK. (2002). Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr.* 56 Suppl 3: S73-S76.
- Chandra RK. (2004). Impact of nutritional status and nutrient supplements on immune responses and incidence of infection in older individuals. *Ageing Res Rev.* 3(1): 91-104.

- Chaves MM, Rocha-Vieira E, De Lima e Silva R, Pereira dos Reis A, Nogueira-Machado JA. (1998). Host defenses in the aged: evaluation of the balance between oxidizing species generation and reducing power in phagocytic human granulocytes. *Mech Ageing Dev.* 104: 103-109.
- Chen J, Flurkey K, Harrison DE. (2002). A reduce peripheral blood CD4+ lymphocyte proportion is a consistent ageing phenotype. *Mech Ageing Dev.* 123: 145-153.
- Cheng TY, Zhu Z, Masuda S, Morcos NC. (2001). Effects of multinutrient supplementation on antioxidant defense systems in healthy human beings. *J Nutr Biochem.* 12: 388-395.
- Chernoff R (2005). Dietary management for older subjects with obesity. *Clin Geriatr Med.* 21(4):725-33.
- Chernoff R (2005) Micronutrient requirement in older women. *Am J Clin Nutr* 81: 1240S-1245S.
- Chesney RW1, Helms RA, Christensen M, Budreau AM, Han X, Sturman JA. (1998). An updated view of the value of taurine in infant nutrition. *Adv Pediatr.* 45:179-200.
- Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, Lin CC. (2003). Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Med.* 69: 600-604.
- Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C. (2001). Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Rad Biol Med.* 31:745-753.
- Chow CK, Ibrahim W, Wei Z, Cham AC. (1999). Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Free Radic Biol Med.* 27: 580-587.
- Christen Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr.* 71: 621-629.
- Collaziol D, Luz C, Dornelles F, Da Cruz IM, Bauer ME. (2004). Psychoneuroendocrine correlates of lymphocyte subsets during healthy ageing. *Mech Ageing Dev.* 125(3): 219-227.
- Collet JF, Messens J. (2010). Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signal.* 13(8):1205-16.
- Colonna-Romano G, Aquino A, Bulati M, Di Lorenzo G, Listi F, Vitello S, Lio D, Candore G, Clesi G, Caruso C. (2006). Memory B cell subpopulations in the aged. *Rejuvenation Res.* 9(1):149-52.
- Colonna-Romano G, Potestio M, Aquino A, Candore G, Lio D, Caruso C. (2002). Gamma/delta T lymphocytes are affected in the elderly. *Exp Gerontol.* 37: 205-11.
- Comfort A. (1979). *En: The biology of senescence (3^a ed.)*. pp: 81-86. Elsevier. New York.
- Comstock GW, Burke AE, Hoffman SC, Helzlsouer KJ, Bendich A, Masi AT, Norkus EP, Malamet RL, Gershwin ME. (1997). Serum concentrations of alpha tocopherol, beta carotene, and retinol preceding the diagnosis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 56(5):323-5.
- Cook-Mills. (2002). VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygenspecies. *Mol Immunol.* 39(9): 499-508.
- Cooper DA, Webb DR, Peters JC. (1997). Evaluation of the potential for olestra to affect the availability of dietary phytochemicals. *J Nutr.* 127: 1699-1709.
- Coquette A, Vray B, Vanderpas J. (1986). Role of vitamin E protection of the resident macrophage membrane against oxidative damage. *Arch Int Physiol Biochim.* 94: 529-534.
- Correa R, Blanco B, Del Río M, Víctor VM, Guayerbas N, Medina S, De la Fuente M. (1999a). Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a modelo f premature aging. *BioFactors.* 10: 195-200.

- Correa R, Del Rio M, De la Fuente M. (1999b). Improvement of murine immune functions in vitro by thioproline". *Immunopharmacology*. 44: 281-291.
- Costa-Pinto FA, Palermo-Neto J. (2010). Neuroimmune interactions in stress. *Neuroimmunomodulation* 17: 196-9.
- Cotgreave IA. (1997). N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol*. 38: 205-227.
- Cross CE, Forte T, Stocker R. (1990). Oxidative stress and abnormal cholesterol metabolism in patients with adult respiratory distress syndrome. *J Lab Clin Med*. 115: 396-404.
- Crouvezier S, Powell B, Keir D, Yaqoob P. (2001). The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Cytokine*. 13(5):280-6.
- Crozatier M, Meister M. (2007). *Drosophila* haematopoiesis. *Cell Microbiol*. 9:1117-26.
- 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 (29): 4608-4628.
- Cruces J, Venero C, Pereda-Perez 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.
- Curnutte JT, Babior BM. (1987). Chronic granulomatous disease. *Adv Hum Genet*. 16: 229-297.
- Cuevas A, Saavedra N, Salazar LA, Abdalla DS. (2013). Modulation of immune function by polyphenols: possible contribution of epigenetic factors. *Nutrients*. 5(7):2314-32.
- Cumurcu BE, Ozyurt H, Etikan I, Demir S, Karlidag R. (2009). Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Psychiatry Clin Neurosci*. 63: 639-45.
- Curtis AJ, Bullen M, Piccenna L, McNeil JJ. (2014). Vitamin E supplementation and mortality in healthy people: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Cardiovasc Drugs Ther*. 28(6):563-73.
- Cutler RG. (1975). Evolution of human longevity and the genetic complexity governing aging rate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72(11): 4664-4668.
- Cutler RG. (1991). Recent progress in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypotheses of aging. *Arch Gerontol Geriatr*. 12(2-3): 75-98.

D

- Dallegrì F, Lanzi G, Patrone F. (1980). Effects of ascorbic acid on neutrophil locomotion. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 61(1):40-5.
- Damtew B, Spagnuolo PJ, Goldsmith GG, Marino JA. (1990). Neutrophil adhesion in the elderly: inhibitory effects of plasma from elderly patients. *Clin Immunol Immunopathol*. 54: 247-55.
- Dantzer R. (2001). Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci*. 933: 222-34.
- Davies KJ. (1999). The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*. 48(1):41-7.
- Dawson R Jr, Biasetti M, Messina S, Dominy J.(2002). The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury. *Amino Acids*. 22(4):309-24.
- Daynes RA, Enioutina EY, Jones DC. (2003). Role of redox imbalance in the molecular mechanisms responsible for immunosenescence. *Antioxid Redox Signal* 5: 537-48.
- Defeudis FV, Drieu K. (2000). Ginkgo biloba extract (egb 761) and cns functions: basic studies and clinical applications. *Curr Drug Targets* 1: 25-58.

- De Flora S, Cesarone CF, Balansky RM. (1995). Chemoprotective properties and mechanism of N-acetylcysteine. The experimental background. *J Cell Biol.* 22: 33-41.
- De Flora S, Izzoti A, D'Agostini F, Cesarone CF. (1991). Antioxidant activity and other mechanisms of thiol involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am J Med.* 91: 122-130.
- De Juan EJ. (1994). Marcadores de edad biológica en el envejecimiento del ratón: aplicación farmacológica. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante
- De la Asunción GJ, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardó FV, Sastre J, Viña J. (1996). Mitochondrial glutathione oxidation correlatos with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.* 10: 333-338.
- De la Flora S, Cesarone CF, Balansky R. (1995). Chemoprotective properties and mechanism of N-acetylcysteine. The experimental background. *J Cell Biol.* 22: 33-41.
- De la Fuente M. (1985). Changes in the macrophage function with aging. *Comp Biochem Physiol A.* 81(4): 935-938.
- De la Fuente M. (1989). Alteration of macrophage function in AKR/J leukemic mice". *Act. Pathol. Microbiol. Immunol. (B)*, 97: 917-922.
- De la Fuente, M. (1999). Modulation of immune function by neuropeptides". *Current Trends in Immunology.* 2: 111-122.
- De la Fuente M. (2005). La Gerontología en España . En: El Estado de España. Real Academia de Doctores de España. Ed. Borealia Asesores Editoriales SL. Pp: 714-731. Barcelona.
- De la Fuente M. (2009a). Envejecimiento del sistema inmunitario". En: Biogerontología Médica. Sastre J, Pamplona R, Ramón JR (eds). Pp: 135-152. Ergon. Madrid.
- De la Fuente M. (2009b). Teorías del envejecimiento " En: Retos de la Nutrición en el Siglo XXI ante el Envejecimiento Poblacional. Varela G, Alonso E (eds). pp:29-48. Instituto Tomás Pascuala Sanz y Universidad San Pablo CEU. Madrid.
- De la Fuente M. (2010). Desarrollo de la Respuesta del Sistema Inmunitario". En: Fisiología Humana. JAF Tresguerres (ed.). pp: 353-373. 4ª Edición. McGraw Hill. Mexico.
- De la Fuente M. (2011). Funcionamiento del sistema inmunitario". En: Inmunonutrición. En la salud y la enfermedad. A. Marcos (ed.). Pp: 2-25. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid.
- De la Fuente M. (2012). El sistema inmunitario y el envejecimiento". En: "Medicina Estética y Anti-envejecimiento". JAF Tresguerres (ed.). Pp: 629-645. 1ª Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid.
- De la Fuente, M. (2014). Inmunosenescencia. En: "Tratado de Medicina Geriátrica". Abizanda P. (Ed). Pp: 134-141. Elsevier España.
- De la Fuente M, Baeza I, Guayervas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF. (2004a). Changes with ageing in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology.* 5(6): 389-400.
- De la Fuente M, Campos M, Del Rio M, Hernanz A. (1995). Inhibition of murine peritoneal macrophage functions by sulfated cholecystokinin octapeptide Regul. *Pept.* 55: 47-56,1995.
- 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. *Current Pharm Des.* 17(36): 3966-3993.
- De la Fuente M, Del Río M, Medina S. (2001). Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J Neuroimmunol.* 116: 15-167.
- De la Fuente M, Ferrández MD, Muñoz F, De Juan E, Miquel J. (1993). Stimulation by the antioxidant thioproline of the lymphocyte functions of old mice. *Mech Ageing Develop.* 68: 27-36.

- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Álvarez P, Alvarado C. (2004b). Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol.* 50: OL-683-OL690.
- De la Fuente M, Hernanz A, Medina S, Guayerbas N, Fernández B, Viveros MP. (2003). Characterization of monoaminergic systems in brain regions of prematurely aging mice. *Neurochem Int.* 43: 165-172.
- De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo C. (2005). The immune system in the oxidative stress conditions of aging and hipertensión: favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal.* 7(9&10): 1356-1366.
- De la Fuente M, Medina S. (2005). NPY and phagocytic cells functions. En: *The NPY family of peptides in immune disorders, inflammation, angiogenesis and cancer.* Edited by Zukowska Z and Feuerstein GZ. pp: 107-122.
- De la Fuente M, Medina S, Del Río M, Ferrández MD, Hernanz A. (2000). Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides. *Life Science.* 67: 2125-2135.
- De la Fuente M, Víctor VM. (2000). Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol.* 78(1): 49-54.
- De la Fuente M, Víctor VM. (2001). Ascorbic acid and N-acetylcysteine improve in vitro the function of lymphocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Rad Res.* 35: 73-84.
- DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, Wikby A, Mariani E, Mocchegiani E, Tarazona R, Solana R. (2006). Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology.* 7(5-6):471-81.
- Deleuze C, Alonso G, Lefevre IA, Duvoid-Guillou A, Hussy N. (2005). Extrasynaptic localization of glycine receptors in the rat supraoptic nucleus: further evidence for their involvement in glia-to-neuron communication. *Neuroscience.* 133(1):175-83.
- De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. (2005). Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett.* 579: 2035-2039.
- De Martinis M, Modesti M, Loreto MF, Quagliano D, Ginaldi L. (2000). Adhesion molecules on peripheral blood lymphocyte subpopulations in the elderly. *Life Sci.* 68: 139-151.
- de Oliveira BF, Veloso CA, Nogueira-Machado JA, Martins Chaves M. (2012). High doses of in vitro beta-carotene, alpha-tocopherol and ascorbic acid induce oxidative stress and secretion of IL-6 in peripheral blood mononuclear cells from healthy donors. *Curr Aging Sci.* 5(2):148-56.
- Deponte M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1830(5):3217-66.
- Deruelle F, Baron B. (2008). Vitamin C: is supplementation necessary for optimal health? *J Altern Compl Med* 14: 1291-1298.
- Desai A, Grolleau-Julius A, Yung R (2010) Leukocyte function in the aging immune system. *J Leuk Biol* 87: 1001-1009.
- Desai S, Landay A. (2010). Early immune senescence in HIV disease. *Curr HIV/AIDS Rep.* 7(1):4-10.
- De Waart F, Portengen L, Doekes G, Verwaal CJ, Kok FJ. (1997). Effect of 3 months vitamin E supplementation on indices of the cellular and humoral immune response in elderly subjects. *Br J Nutr.* 78: 761-774.
- Di Lorenzo G, Balistreri CR, Candore G, Cigna D, Colombo A, Colonna-Romano G, Colucci AT, Gervasi F, Listi F, Potestio M, Caruso C. (1999). Granulocyte and natural killer activity in the elderly. *Mech Ageing Dev.* 108: 25-38.

- Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M.(2008). N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther.* 8(12):1955-62.
- Douzdech N, Seres I, Larbi A, Szikszay E, Roy PM, Arcand M, Dupuis G, Fulop T Jr. (2002). Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging. *Exp Gerontol.* 37: 369-387.
- Dröge W. (2002a). Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol.* 37(12): 1333-1345.
- Dröge W. (2002b). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82(1): 47-95.
- Dröge W. (2005). Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome?. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360(1464):2355-72.
- Dröge W, Breitkreutz R. (2000). Glutathione and immune function. *Proc Nut Soc.* 59: 595-600.
- Dröge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, Roth S, Gmünder H. (1994). Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J.* 8: 1131-1138.
- Duarte TL, Lunec J. (2005). Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Rad Res.* 39(7): 671-686.

E

- Eastwood MA. (1999). Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent diseases? *Q J Med.* 92: 527-530.
- Economos AC, Miquel J, Fleming J, Johnson JE Jr. (1980). Is there intrinsic mitochondrial aging?. *Age.* 3: 117.
- Effros RB. (2004). From Hayflick to Walford: the role of T cell replicative senescence in human aging. *Exp Gerontol.* 39: 885-890.
- Effros RB, Dagarag M, Spaulding C, Man J. (2005). The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev.* 205: 147-157.
- Ekremoglu M, Türközkan N, Erdamar H, Kurt Y, Yaman H. (2007). Protective effect of taurine on respiratory burst activity of polymorphonuclear leukocytes in endotoxemia. *Amino Acids* 32: 413-417.
- Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, Uhl M, Knasmueller S, Schulte-Hermann R, Berger W, Micksche M. (2005). Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J.* 19(7):807-9.
- El Idrissi A. (2008). Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection. *Amino Acids.* 34(2):321-8.
- Ellis GR, Anderson RA, Lang D, Blackman DJ, Morris RH, Morris-Thurgood J, McDowell IF, Jackson SK, Lewis MJ, Frenneaux MP. (2000). Neutrophil superoxide anion-generating capacity, endothelial function and oxidative stress in chronic heart failure: effects of short- and long-term vitamin C therapy, *J Am Coll Cardiol.* 36(5):1474-82.
- Enriquez JA, Lenaz G. (2014). Coenzyme q and the respiratory chain: coenzyme q pool and mitochondrial supercomplexes. *Mol Syndromol.* 5(3-4):119-40.
- Epelman S1, Liu PP2, Mann DL (2015). Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol.* 15(2):117-29.
- Erdem MG1, Cinkilic N, Vatan O, Yilmaz D, Bagdas D, Bilaloglu R. (2012). Genotoxic and anti-genotoxic effects of vanillic acid against mitomycin C-induced genomic damage in human lymphocytes in vitro. *Asian Pac J Cancer Prev.* 13(10):4993-8.
- Ergun MA, Soysal Y, Kismet E, Akay C, Dundaroz R, Ilhan M, Imirzalioglu N.(2006). Investigating the in vitro effect of taurine on the infant lymphocytes by sister chromatid exchange. *Pediatr Int.* 48: 284-286.

- Ernst IM, Pallauf K, Bendall JK, Paulsen L, Nikolai S, Huebbe P, Roeder T, Rimbach G. (2013). Vitamin E supplementation and lifespan in model organisms. *Ageing Res Rev.* 12(1):365-75.
- Espinosa-Oliva AM, de Pablos RM, Villarán RF, Argüelles S, Venero JL, Machado A, Cano J. (2011). Stress is critical for LPS-induced activation of microglia and damage in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging.* 32(1):85-102.
- Evans HM, Bishop KS. (1922). On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science.* 56: 650-651.
- Exon JH, Magnuson BA, South EH, Hendrix K. (1998). Dietary quercetin, immune functions and colonic carcinogenesis in rats. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 20: 173-190.
- Eylar E, Ribera-Quinones C, Molina C, Baez Y, Molina F, Mercado CM. (1993). Increased number of circulating Leu11+ (CD16) large granular lymphocytes and decreased NK activity during human aging. *Clin Exp Immunol.* 68: 340-347.

F

- Fabris N. (1991). Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to aging. *Arch Gerontol Geriatr.* 12: 219-230.
- Farr SA, Price TO, Dominguez LJ, Motisi A, Saiano F, Niehoff ML, Morley JE, Banks WA, Ercal N, Barbagallo M. (2012). Extra virgin olive oil improves learning and memory in SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis.* 28(1):81-92.
- Farriol M, Venereo Y, Rosselló J, Gomez P, Palao R, Orta X, Segovia-Silvestre T. (2002). Effects of taurine on polymorphonuclear phagocytosis activity in burned patients. *Amino Acids.* 23: 441-445.
- Fazzino F, Obregón F, Lima L. (2010). Taurine and proliferation of lymphocytes in physically restrained rats. *J Biomed Sci.* 17 Suppl 1:S24.
- Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B. (1995). Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and non-survivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 50: B378-82.
- Fletcher AE, Breeze E, Shetty PS. (2003). Antioxidant vitamins and mortality in older persons: findings from the nutrition add-on study to the Medical research Council Trial of assessment and management of older people in the community. *Am J Clin Nutr.* 78: 999-1010.
- Forman HJ, Torres M. (2001). Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med.* 22(4-5): 189-216.
- Franceschi C, Bonafe M. (2003). Centenarians as a model of healthy aging. *Biochem Soc Transact.* 31(2): 457-461.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S. (2000a). Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 18: 1717-20.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. (2000b). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 908: 244-54.
- Franceschi C, Monti D, Barbieri D, Salvioli S, Grassilli E, Capri M, Troiano L, Guido M, Bonafè M, Tropea F, Salomoni P, Benatti F, Bellesia E, Macchioni S, Anderlini R, Sansoni P, Mariotti S, Wratten ML, Tetta C, Cossarizza A. (1996). Successful immunosenescence and the remodelling of immune responses with ageing. *Nephrol Dial Transplant.* 11: 18-25.
- Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. (1995). The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today.* 16: 12-16.
- Franceschi C, Olivieri F, Marchegiani F, Cardelli M, Cavallone L, Capri M, Salvioli S, Valensin S, De Benedictis G, Di Iorio A, Caruso C, Paolisso G, Monti D. (2005). Genes

- involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway and response to oxidative stress play a major role in the genetics of human longevity: the lesson of centenarians. *Mech Ageing Dev.* 126(2): 351-361.
- Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, Barbi C, Bonafe M. (1999). Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp Gerontol.* 34:911-21.
- Franco R, DeHaven WI, Sifre MI, Bortner CD, Cidlowski JA. (2008). Glutathione depletion and disruption of intracellular ionic homeostasis regulate lymphoid cell apoptosis. *J Biol Chem.* 283: 36071-87.
- Franco R, Panayiotidis MI, Cidlowski JA. (2007). Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation. *J Biol Chem.* 282: 30452-65.
- Franklin RA, Li YM, Arkins S, Kelley KW.(1990). Glutathione augments in vitro proliferative responses of lymphocytes to concanavalin A to a greater degree in old than in young rats. *J Nutr.* 120(12):1710-7.
- Frasca D, Landin AM, Riley RL, Blomberg BB. (2008). Mechanisms for decreased function of B cells in aged mice and humans. *J Immunol.* 180(5):2741-6.
- 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.
- Frei B (1991). Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am J Clin Nutr.* 54(6 Suppl):1113S-1118S.
- Frei B, Higdon J V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J. Nutr.* 133: 3275-3284.
- Friedman EM, Irwin MR. (1997). Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system. *Pharmacol Ther.* 74: 27-38.
- Fritz H, Flower G, Weeks L, Cooley K, Callachan M, McGowan J, Skidmore B, Kirchner L, Seely D. (2014). Intravenous Vitamin C and Cancer: A Systematic Review. *Integr Cancer Ther.* 13(4):280-300.
- Fülop T. (1994). Signal transduction changes in granulocytes and lymphocytes with ageing. *Immunol Lett.* 40: 259-268.
- Fülop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guérard KP, Lesur O, Khalil A, Dupuis G. (2004). Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell* 3: 217–26.
- Fülop T, Witkowski JM, Pawelec G, Alan C, Larbi A. (2014). On the immunological theory of aging. *Interdiscip Top Gerontol.* 39:163-76.
- Furukawa T, Inoue M, Kajiya F, Inada H, Takasugi S, Fukui S, Takeda H, Abe H. (1975). Assessment of biological age by multiple regression analysis. *J Gerontol* 30: 422-34
- Furukawa A, Oikawa S, Murata M, Hiraku Y, Kawanishi S. (2003). (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochem Pharmacol.* 66(9):1769-78.

G

- Gambini J. (2007). Efecto de estradiol y otros compuestos estrogénicos sobre la expresión de genes asociados a la longevidad. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Gammone MA, Riccioni G, D'Orazio N. (2015). Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? *Food Nutr Res.* 59:26762.
- Ganguly R, Waldman RH. (1985). Macrophage functions in aging: effects of vitamin C deficiency. *Allerg Immunol.* 31(1): 37-43.

- García-Conesa MT, Plumb GW, Waldron KW, Ralph J, Williamson G. (1997). Ferulic acid dehydrodimers from wheat bran: Isolation, purification and antioxidant properties of 8-O-4'-diferulic acid. *Redox Rep.* 3: 319-323.
- García de la Asunción J, Del Olmo ML, Gómez-Cambronero LG, Sastre J, Pallardó FV, Viña J. (2004). AZT induces oxidative damage to cardiac mitochondria: protective effect of vitamins C y E. *Life Sciences.* 76: 47-56.
- García de la Asunción J, Millán A, Plá R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardó FV, Sastre J, Viña J. (1996). Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.* 10: 333-338.
- Gaziev AI, Podlutzky AJ, Panfilov BM, Bradbury R. (1995). Dietary supplements of antioxidants reduce hprt mutant frequency in splenocytes of aging mice. *Mutat Res.* 338: 77-86.
- Gaziev AI, Ushakova TE, Podlutzki AJ. (1997). Dietary antioxidants increases life span in mice, decreases incidence of mutations and increases an expression of defense genes. *Adv Gerontol.* 1: 80-84.
- Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science.* 119: 623-626.
- Ghatak SB, Panchal SJ. (2012). Investigation of the immunomodulatory potential of oryzanol isolated from crude rice bran oil in experimental animal models. *Phytother Res.* 26(11):1701-8.
- Ghibelli L, Coppola S, Rotillo G, Lafavia E, Maresca V, Ciriolo MR. (1995). Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem Biophys Res Commun.* 216: 313-320.
- Gibney SM, Drexhage HA. (2013). Evidence for a dysregulated immune system in the etiology of psychiatric disorders. *J Neuroimmune Pharmacol.* 8(4):900-20.
- Gil P, Farinas F, Casado A, López-Fernández E. (2002). Malondialdehyde: a possible marker of ageing. *Gerontology.* 48(4): 209-214.
- Gilad GM, Gilad VH. (1995). Strain, stress, neurodegeneration and longevity. *Mech Ageing Dev.* 78 : 75-83.
- Gillis S, Kozak R, Durante M, Weksler ME. (1981). Immunological studies of aging. Decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans. *J Clin Invest.* 67: 937-42.
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Martorelli V, Quagliano D. (1999a). The immune system in the elderly II: Specific cellular immunity. *Immunol Res.* 20: 109-115.
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quagliano D. (1999b). The immune system in the elderly. III Innate immunity. *Immunol Res.* 20: 117-126.
- Ginaldi L, Loreto MF, Corsi MP, Modesti M, De Martinis M. (2001). Immunosenescence and infectious diseases. *Microbes Infect.* 3(10): 851-857.
- Ginter E, Simko V, Panakova V. (2014). Antioxidants in health and disease. *Bratisl Lek Listy.* 115(10):603-6.
- Globerson A, Effros RB. (2000). Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today.* 21: 515-521.
- Gosálvez M, Vivero C, Álvarez I. (1979). Restoration of "contact inhibition" in tumour cells in tissue culture by treatment with thiazolidine-4-carboxylic acid. *Biochem Soc Transact.* 7: 191-192.
- Gosset P, Wallaert B, Tonnel AB, Fourneau C. (1999). Thiol regulation of the production of TNF-alpha, IL-6 and IL-8 by human alveolar macrophages. *Eur Respir J.* 14(1): 98-105.
- Gressier B, Cabanis A, Lebegue S, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC. (1994). Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: comparisons in vitro of some thiol-containing drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 16: 9-13.

- Grimble RF. (1998). Modification of inflammatory aspects of immune function by nutrients. *Nutrition Res.* 18(7): 1297-1317.
- Gruzdeva O, Uchasova E, Dyleva Y, Belik E, Karetnikova V, Shilov A, Barbarash O. (2014). Multivessel coronary artery disease, free fatty acids, oxidized LDL and its antibody in myocardial infarction. *Lipids Health Dis.* 13: 111.
- Gu JW, Makey KL, Tucker KB, Chinchar E, Mao X, Pei I, Thomas EY, Miele L. (2013). EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 α and NF κ B, and VEGF expression. *Vasc Cell.* 5(1):9.
- 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, Miquel J, De la Fuente M. (2002a). Relation of behavoir and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res.* 134: 41-48.
- 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.
- Guayerbas N, Puerto M, Alvarado C, De la Fuente M. (2005a). Effect of diet supplementation with N-acetylcysteine on leucocyte functions in prematurely aging mice. *J Appl Biomed.* 3:199-205.
- Guayerbas N, Puerto M, Álvarez P, De la Fuente M. (2004). Improvement of macrophage functions in prematurely aging mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. *Cell Mol Biol.* 50: OL-683-OL690.
- Guayerbas N, Puerto M, Ferrández MD, De la Fuente M. (2002b). A diet supplemented with thiolic anti-oxidants improves leucocyte function in two strains of prematurely aging mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29: 1009-1014.
- Guayerbas N, Puerto M, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. (2005b). Thiolic antioxidant supplementation of the diet reverses age-related behavioral dysfunction in prematurely aging mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 80: 45-51.
- Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. (2002c). Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol.* 37: 249-256.
- Guerra-Araiza C, Álvarez-Mejía AL, Sánchez-Torres S, Farfan-García E, Mondragón-Lozano R, Pinto-Almazán R, Salgado-Ceballos H. (2013). Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Radic Res.* 47(6-7):451-62.
- Guerrero JM, Reiter RJ. (2002). Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem.* 2(2):167-179.
- Guglielmi F, Luceri C, Giovannelli L, Dolara P, Lodovici M. (2003). Effect of 4-coumaric acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid on oxidative DNA damage in rat colonic mucosa. *Br J Nutr.* 89: 581-587.
- Gupta S, Su H, Bi R, Agarwal S, Gollapudi S. (2005). Life and death of lymphocytes: a role in immunesenescence. *Immun Ageing.* 2: 12.
- Gutteridge JMC. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarker of tissue damage. *Clin Chem.* 41: 1819-1828.
- Gwinn MR, Vallyathan V. (2006). Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 9(1): 27-39.

H

- Haddad JJ. (2002). Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal.* 14(11): 879-897.

- Hajishengallis G. (2010). Too Old to Fight? Aging and its Toll on Innate Immunity. *Mol Oral Microbiol.* 25: 25–37.
- Halliwell B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* 31: 261-272.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. (1989). Free radicals aging and disease. En *Free radical in biology and medicine.* (Eds. Halliwell B., Gutteridge J.M.C.).P.p. 416-508. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell B, Gutteridge JC (1995) The definition and measure of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med.* 18: 125-126.
- Ham AJ, Liebler DC. (1997). Antioxidant reactions of vitamin E in the perfused rat liver: product distribution and effect of dietary vitamin E supplementation. *Arch Biochem Biophys.* 339: 157-164.
- Hammond CL, Madejczyk MS, Ballatori N. (2004). Activation of plasma membrane reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 195: 12-22.
- Han SN, Adolfsson O, Lee CK, Prolla TA, Ordovas J, Meydani SN. (2004). Vitamin E and gene expression in immune cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1031: 96-101.
- Han SN, Adolfsson O, Lee CK, Prolla TA, Ordovas J, Meydani SN. (2006). Age and vitamin E-induced changes in gene expression profiles of T cells. *J Immunol.* 177: 6052-6061.
- Han SN, Meydani SN. (1999). Vitamin E and infectious diseases in the aged. *Proc Nutr Soc.* 58(3): 697-705.
- Han SN, Wu D, Ha HK, Beharka AA, Smith DE, Bender BS, Meydani SN. (2000). Vitamin E supplementation increases T helper 1 cytokine production in old mice infected with influenza virus. *Immunology.* 100(4): 487-93.
- Harman D. (1956). Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11: 298-300.
- Härtel C, Strunk T, Bucsky P, Schultz C. (2004). Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes. *Cytokine.* 7: 101-106.
- Hashizume K, Hatanaka Y, Fukuda I, Sano T, Yamaguchi Y, Tani Y, Danno G, Suzuki K, Ashida H. (2002). N-acetylcysteine suppresses constitutive expression of CD11a/LFA-1a protein in myeloid lineage. *Leuk Res.* 26: 939-944.
- Hasnis E, Reznick AZ. (2003). Antioxidants and healthy aging. *Isr Med Assoc J.* 5(5):368-70.
- Hatman LJ, Kayden HJ. (1979). A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. *J lipid Res.* 20: 639-645.
- Havsteen BH. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 96: 67-202.
- Hawkley LC, Cacioppo JP. (2004). Stress and the aging immune system. *Brain Behav Immun.* 18(2): 114-119.
- Hayek MG, Mura C, Wu D, Beharka AA, Han SN, Paulson KE, Hwang D, Meydani SN. (1997). Enhanced expression of inducible cyclooxygenase with age in murine macrophages. *J Immunol.* 159(5): 2445-2451.
- Hayflick L. (1980). Recent advances in the cell biology of aging. *Mech Ageing Dev.* 14: 59-79.
- Hayflick L. (2007). Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci.* 1100:1-13.
- Held P, Harding CO. (2003). L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate supplementation in murine g-GT deficiency. *Free Rad Biol Med.* 34: 1482-1487.
- Hemilä H. (2003). Vitamin C, respiratory infections and the immune system. *TRENDS Immunol.* 24(11): 579-580.

- Hernandez M, Zhou H, Zhou B, Robinette C, Crissman K, Hatch G, Alexis NE, Peden D. (2009). Combination treatment with high-dose vitamin C and alpha-tocopherol does not enhance respiratory-tract lining fluid vitamin C levels in asthmatics. *Inhal Toxicol.* 21(3):173-81.
- Hernanz A, Bayon J, Bisbal E, Sanchez M, De la Fuente M. (2008). Leukocyte functions are altered in patients with depressive disorder. *J Neuroimmunol.* 197:167.
- 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 Appl Immunol.* 1990; 91(2): 166-170.
- Hernanz A, Tato E, De la Fuente M, De Miguel E, Arnalich F. (1996). Differential effects of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y, somatostatin and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by whole blood cells from healthy young and old subjects. *J Neuroimmunol.* 71: 25-30.
- Herrero C, Sebastián C, Marqués L, Comalada M, Xaus J, Valledor AF, Lloberas J, Celada A. (2002). Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression. *Exp Gerontol.* 37: 389-394.
- Heussler VT, Fernández PC, Machado J, Botteron C, Dobbelaere DA. (1999). N-acetylcysteine blocks apoptosis induced by N-alpha-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone in transformed T-cells. *Cell Death Differ.* 6(4): 342-350.
- High KP. (2004). Infection as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing Res Rev* 3: 1-14.
- Higuchi H, Nagahata H. (1998). Comparisons of superoxide production, protein kinase C and tyrosine kinase activities in neutrophils from neonatal calves and cows. *Res Vet Sci.* 65: 139-143.
- Hildeman DA. (2004). Regulation of T-cell apoptosis by reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 36: 1496-504.
- Hilkens CM, Snijders A, Snijdwint FG, Wierenga EA, Kapsenberg ML. (1996). Modulation of T-cell cytokine secretion by accessory cell-derived products. *Eur Respir J Suppl.* 22: 90s-94s.
- Hirokawa K. (1999). Age-related changes of signal transduction in T cells. *Exp Gerontol.* 34: 7-18.
- Hirokawa J, Sakaue S, Furuya Y, Ishii J, Hasegawa A, Tagami S, Kawakami Y, Sakai M, Nishi S, Nishihira J. (1998). Tumor necrosis factor-alpha regulates the gene expression of macrophage migration inhibitory factor through tyrosine kinase-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Biochem.* 123: 733-739.
- Hofbauer R, Frass M, Gmeiner B, Handler S, Speiser W, Kapiotis S. (1999). The green tea extract epigallocatechin gallate is able to reduce neutrophil transmigration through monolayers of endothelial cells. *Wien Klin Wochenschr.* 111(7):278-82.
- Hogan JS, Weiss WP, Todhunter DA, Smith KL, Schoenberger PS. (1992). Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. *J Dairy Sci.* 75(2):399-405.
- Hollman PC, Katan MB. (1999). Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Rad Res.* 31: 75-80.
- Hsieh CC, Lin BF. (2005). Opposite effects of low and high dose supplementation of vitamin E on survival of MRL/lpr mice. *Nutrition.* 21: 940-948.
- Hu H, Forsey RJ, Blades TJ, Barratt ME, Parmar P, Powell JR. (2000). Antioxidants may contribute in the fight against ageing: an in vitro model. *Mech Ageing Dev.* 121: 217-230.
- Huang MC, Greig NH, Luo W, Tweedie D, Schwartz JB, Longo DL, Ferrucci L, Ershler WB, Goetzl EJ. (2011). Preferential enhancement of older human T cell cytokine

- generation, chemotaxis, proliferation and survival by lenalidomide. *Clin Immunol.* 138: 201-11.
- Hughes DA. (1999). Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. *Proc Nutr Soc.* 58: 79-84.
- Hughes KA, Reynolds RM. (2005). Evolutionary and mechanistic theories of aging. *Annu Rev Entomol.* 50:421-45.
- Huijskens MJ, Walczak M, Sarkar S, Atrafi F, Senden-Gijsbers BL, Tilanus MG, Bos GM, Wieten L, Germeaad WT. (2015). Ascorbic acid promotes proliferation of natural killer cell populations in culture systems applicable for natural killer cell therapy. *Cytotherapy.* 17(5):613-20.
- Huxtable RJ. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiol Rev.* 72: 101-163.

I

- Ibs KH, Rink L. (2003). Zinc-altered immune function. *J Nutr.* 133: 1452S-1456S.
- Ichikawa D, Matsui A, Imai M, Sonoda Y, Kasahara T. (2004). Effect of various catechins on the IL-12p40 production by murine peritoneal macrophages and a macrophage cell line, J774.1. *Biol Pharm Bull.* 27(9):1353-8.
- Iiyama M, Shimada Y, Kita T, Ito H. (1992). Effect of aging on macrophage adherence to extracellular matrix proteins. *Mech Ageing Dev.* 66(2): 149-158.
- Inal ME, Kanbak G, Sunal E. (2001). Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta.* 305: 75-80.
- Indo HP1, Yen HC2, Nakanishi I3, Matsumoto K3, Tamura M4, Nagano Y4, Matsui H4, Gusev O5, Cornette R6, Okuda T6, Minamiyama Y7, Ichikawa H8, Suenaga S9, Oki M10, Sato T9, Ozawa T11, Clair DK12, Majima HJ13. (2015). A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr.* 56(1):1-7.
- Ingold KU, Bowry VW, Stocker R, Walling C. (1993). Autoxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(1): 45-49.
- Ingram DK, Nakamura E, Smucny D, Roth GS, Lane MA. (2001). Strategy for identifying biomarkers of aging in long-lived species. *Exp Gerontol.* 36(7):1025-1034.
- Inkeles B, Judith B, Kuntz MM, Kadish AS, Weksler ME. (1977). Immunologic studies of aging. III. Cytokinetic basis for the impaired response of lymphocytes from aged humans to plant lectins. *J Exp Med.* 145: 1176.
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature. (1982). Nomenclature of tocopherols and related compounds. Recommendations 1981. *Eur J Biochem.* 123: 473-475.

J

- Jacob RA, Sotoudeh G. (2002). Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutr Clin Care* 5: 66-74.
- Jain A, Madsen DC, Auld PA, Frayer WW, Schwartz MK, Meister A, Martensson J. (1995). L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid, a cysteine precursor, stimulates growth and normalizes tissue glutathione concentrations in rats fed a sulfur amino acid-deficient diet. *J Nutr.* 125: 851-856.
- Jakus J, Kriska T, Vanyúr R. (2002). Effect of multivitamins in an effervescent preparation on the respiratory burst of peritoneal macrophages in mice. *Br J Nutr.* 87: 501-508.

- Janisch KM, Milde J, Schempp H, Elstner EF. (2005). Vitamin C, vitamin E and flavonoids. *Dev Ophthalmol.* 38: 59-69.
- Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. (2000). Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med.* 28: 1317-1327.
- Jariwalla RJ, Harakeh S. (1996). *Ascorbic acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology.* Harris RJ (ed).pp: 215-231. Plenum Press New York
- Jeng KC, Yang CS, Siu WY, Tsai YS, Liao WJ, Kuo JS. (1996). Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults. *Am J Clin Nutr.* 64: 960-965.
- Jialal I, Vega GL, Grundy SM. (1990). Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis.* 82(3):185-91.
- Jiang Q. (2014). Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic Biol Med.* 72:76-90.
- Johnston CS, Martin LJ, Cai X. (1992). Antihistamine effect of supplemental ascorbic acid and neutrophil chemotaxis. *J Am Coll Nutr* 121 172-176
- Jonas E, Dwenger A, Hater J (1993). In vitro effect of ascorbic acid on neutrophil-endothelial cell interaction. *J Biolumin Chemilumin* 8: 15-20

K

- Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. (2005). Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal.* 7(3-4): 395-403.
- Kalinina EV, Chernov NN, Novichkova MD. (2014). Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry* 79(13):1562-83.
- Kamiński MM, Röth D, Krammer PH, Gülow K. (2013). Mitochondria as oxidative signaling organelles in T-cell activation: physiological role and pathological implications. *Arch Immunol Ther Exp.* 61(5):367-84.
- Kang IS, Kim C. (2013). Taurine chloramine administered in vivo increases NRF2-regulated antioxidant enzyme expression in murine peritoneal macrophages. *Adv Exp Med Biol.* 775:259-67.
- Kanungo MS. (1980). *Biochemistry of aging.* New York: Academic Press.
- Kaul A., Khanduja K. L. (1999). Plant polyphenols inhibit benzoyl peroxide-induced superoxide anion radical production and diacylglyceride formation in murine peritoneal macrophages. *Nutr. Cancer* 35: 207-211.
- Kelley DS, Bendich A. (1996). Essential nutrients and immunologic functions. *Annu Rev Nutr.* 63: 994S-996S.
- Kenny M. T., Balistrery F. J., Torney H. L. (1990). Flavonoid modulation of murine neutrophil cytokinesis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 12: 527-541.
- Kheir-Eldin AA, Motawi TK, Gad MZ, Abd-ElGawad HM. (2001). Protective effect of vitamin E, beta-carotene and N-acetylcysteine from the brain oxidative stress induced in rats by lipopolysaccharide. *Int J Biochem Cell Biol.* 33(5): 475-482.
- Kim C, Cha YN. (2009). Production of reactive oxygen and nitrogen species in phagocytes is regulated by taurine chloramines. *Adv Exp Med Biol.* 643: 463-472.
- Kim JE, Cho HS, Yang HS, Jung DJ, Hong SW, Hung CF, Lee WJ, Kim D (2012). Depletion of ascorbic acid impairs NK cell activity against ovarian cancer in a mouse model. *Immunobiology.* 217(9):873-81.
- Kim MC, Kim SJ, Kim DS, Jeon YD, Park SJ, Lee HS, Um JY, Hong SH. (2011). Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF-κB in

- lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 33(3):525-32.
- Kim HJ, Kim KW, Yu BP, Chung HY. (2000). The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-kB activation and Ikb α degradation. *Free Rad Biol Med.* 28: 683-692.
- Kim W, Lee H. (2013). Advances in nutritional research on regulatory T-cells. *Nutrients.* 5(11):4305-15.
- Kirkwood TB, Rose MR. (1991). Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 332(1262): 15-24.
- Klebanoff SJ. (1980). Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Int Med.* 93: 480-89.
- Knight JA. (2000). Review: free radicals, antioxidants and the immune system. *Ann Clin Lab Sci.* 30(2): 145-158.
- Knowles RG, Moncada S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 298(Pt 2): 249-258.
- Koga T, Meydani M. (2001). Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr.* 73(5):941-8.
- Kohut ML, Senchina DS, Madden KS, Felten DL, Moynihan JA. (2004). Age effects on macrophage function vary by tissue site, nature of stimulant, and exercise behavior. *Exp Gerontol.* 39(9): 1347-1360.
- Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA, Wallace DC. (2001). Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(5): 2278-2283.
- Kovacic P, Somanathan R. (2010). Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: Focus on antioxidant action, cell signaling and safety. *Oxid Med Cell Longev.* 3(2):86-100.
- Kowdley KV, Mason JB, Meydani SN, Cornwall S, Grand RJ. (1992). Vitamin E deficiency and impaired cellular immunity related to intestinal fat malabsorption. *Gastroenterol.* 102: 2139-2142.
- Krause D, Mastro AM, Handte G, Smiciklas-Wright H, Miles MP, Ahluwalia N. (1999). Immune function did not decline with aging in apparently healthy, well-nourished women. *Mech Ageing Dev.* 112: 43-57.
- Krishnaraj R. (1992). Negative modulation of human NK cell activity by purinoceptors. Age-associated, gender-specific partial loss of sensitivity to ATP. *Cell Immunol.* 144: 11-21.
- Krishnaraj R. (1997). Senescence and cytokines modulate the NK cell expression. *Mech Ageing Dev.* 96: 89-101.
- Kwon KH, Murakami A, Ohigashi H. (2004). Suppressive effects of natural and synthetic agents on dextran sulfate sodium-induced interleukin-1 β release from murine peritoneal macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68: 436-439.

L

- Lambert IH, Kristensen DM, Holm JB, Mortensen OH. (2015). Physiological role of taurine--from organism to organelle. *Acta Physiol.* 213(1):191-212.
- Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ. (1996). Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(26): 15069-15074.
- Laskin DL, Pendino KJ. (1995). Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 35: 655-677.

- Lasram MM, Dhouib IB, El Fazaa S, Gharbi N. (2015). A review on the possible molecular mechanism of action of N-acetylcysteine against insulin resistance and type-2 diabetes development. *Clin Biochem*. pii: S0009-9120(15)00141-1.
- Laurent F, Benoliel AM, Capo C, Bongrand P. (1991). Oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes: modulation by adhesive stimuli. *J Leukoc Biol*. 49(3):217-26.
- Lavie L. (2005). Sleep-disordered breathing and cerebrovascular disease: a mechanistic approach. *Neurol Clin*. 23(4):1059-75.
- Lavina MD, Strand MR. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol*. 32: 1295-309.
- Le Bourg E. (2001). Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*. 498: 183-186.
- Lederman MM, Georges D, Dando S, Schmelzer R, Averill L, Goldberg D. (1995). L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid (procysteine) inhibits expression of the human immunodeficiency virus and expression of the interleukin-2-receptor alpha chain. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 8: 107-115.
- Lee CYJ, Wan JMF. (2000). Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women. *J Nutr*. 130: 2932-2937.
- Le Garff-Tavernier M, Béziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, Debré P, Merle-Beral H, Vieillard V. (2010). Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* 9: 527-35.
- Lehtonen L, Eskola J, Vainio O, Lehtonen A. (1990). Changes in lymphocyte subsets and immune competence in very advanced age. *J Gerontol*. 45(3):M108-12.
- Leibovitz B, Siegel BV. (1981). Ascorbic acid and the immune response. *Adv Exp Med Biol*. 135: 1-25.
- Lenton KJ, Sane AT, Therriault H, Cantin AM, Payette H, Wagner JR. (2003). Vitamin C augments lymphocytes glutathione in subjects with ascorbate deficiency. *Am J Clin Nutr*. 77: 189-195.
- Lenton KJ, Therriault H, Cantin AM, Fülöp T, Payette H, Wagner JR. (2000). Direct correlation of glutathione and ascorbate and their dependence on age and season in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr*. 71: 1194-2000.
- Li Q, Verma IM. (2002). NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Reviews* 2: 725-734.
- Li M, Walter R, Torres C, Sierra F. (2000). Impaired signal transduction in mitogen activated rat splenic lymphocytes during aging. *Mech Aging Dev*. 113(2): 85-99.
- Liang WJ, Johnson D, Jarvis SM. (2001). Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Mol Membr Biol*. 18(1): 87-95.
- Licastro F, Candore G, Lio D, Porcellini E, Colonna-Romano G, Francesci C, Caruso C. (2005). Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun Ageing*. 2: 1-14.
- Lin S, Hirai S, Yamaguchi Y, Goto T, Takahashi N, Tani F, Mutoh C, Sakurai T, Murakami S, Yu R, Kawada T. (2013). Taurine improves obesity-induced inflammatory responses and modulates the unbalanced phenotype of adipose tissue macrophages. *Mol Nutr Food Res*. 57(12):2155-65.
- Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM, Liu RM. (2004). Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1019: 346-349.
- Lleu PL, Bowers RJ, Gargano A, Sturman J, Huxtable RJ. (1994). Taurine depletion and synaptosomal phospholipid content in cat brain. *Adv Exp Med Biol*. 359:355-60.
- Lloberas J, Celada A. (2002). Effect of aging on macrophage function. *Exp Gerontol*. 37: 1325-1331.
- Lohmiller JJ, Roellich KM, Toledano A, Rabonovitch PS, Wolf NS, Grossman A. (1996). Aged murine T-lymphocytes are more resistant to oxidative damage due to the

- predominance of the cells possessing the memory phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 51(2): B132-B140.
- Lord JM, Butcher S, Killampali V, Lascelles D, Salmon M. (2001). Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Dev.* 122: 1521-1535.
 - Lowe GM, Booth LA, Young AJ, Bilton RF. (1999). Lycopene and b-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Rad Res.* 30: 141-151.
 - Lu J, Holmgren A. (2014). The thioredoxin superfamily in oxidative protein folding. *Antioxid Redox Signal.* 21(3):457-70.
 - Lupton JR, Maccher MM. (1988). Radiographic analysis of the effect of dietary fibers on rat colonic transit time. *Am J Physiol.* 255: 633-639.
 - Luz C, Dornelles F, Preissler T, Collaziol D, Da Cruz IM, Bauer ME. (2003). Impact of psychological and endocrine factors on cytokine production of healthy elderly people. *Mech Ageing Dev.* 124(8-9): 887-895.
 - Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R, Sempowski GD. (2009). Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* 30: 366-73.

M

- Ma ZC, Hong Q, Wang YG, Tan HL, Xiao CR, Liang QD, Cai SH, Gao Y. (2010). Ferulic acid attenuates adhesion molecule expression in gamma-radiated human umbilical vascular endothelial cells. *Biol Pharm Bull.* 33(5):752-8.
- Ma ZC, Hong Q, Wang YG, Tan HL, Xiao CR, Liang QD, Wang DG, Gao Y. (2011). Ferulic acid protects lymphocytes from radiation-predisposed oxidative stress through extracellular regulated kinase. *Int J Radiat Biol.* 87(2):130-40.
- Machado A, Herrera AJ, de Pablos RM, Espinosa-Oliva AM, Sarmiento M, Ayala A, Venero JL, Santiago M, Villarán RF, Delgado-Cortés MJ, Argüelles S, Cano J. (2014). Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease. *Rev Neurosci.* 25(6):785-804.
- Madden KS, Felten DL.(1995). Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol Rev.* 75(1):77-106.
- Maeng HG, Lim H, Jeong YJ, Woo A, Kang JS, Lee WJ, Hwang YI. (2009). Vitamin C enters mouse T cells as dehydroascorbic acid in vitro does not recapitulate in vivo vitamin C effects. *Immunobiol.* 214: 311-320.
- Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. (2011). A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 676-92.
- Maes M, Weeckx S, Wauters A, Neels H, Scharpé S, Verkerk R, Demedts P, Desnyder R. (1996). Biological variability in serum vitamin E concentrations: relation to serum lipids. *Clin Chem.* 42(11):1824-31.
- Maher SG, Condrón CE, Bouchier-Hayes DJ, Toomey DM. (2005). Taurine attenuates CD3/interleukin-2-induced T cell apoptosis in an in vitro model of activation-induced cell death (AICD). *Clin Exp Immunol.* 139: 279-286.
- Majewicz J, Rimbach G, Proteggente AR, Lodge JK, Kräemer K, Minihane AM. (2005). Dietary vitamin C down-regulates inflammatory gene expression in apoE4 smokers. *Biochem Biophys Res Commun.* 338(2): 951-955.
- Makinodan T. (1977). Biology of aging: retrospect and prospect. *Compr Immunol.* 1: 1-7.
- Makinodan T. (1998). Studies on the influence of age on immune response to understand the biology of immunosenescence. *Exp Gerontol.* 33: 27-38.
- Makinodan T, Kay MMB. (1980). Age influence on the immune system. *Adv Immunol.* 29: 287-331.

- Malaguarnera L, Ferlito L, Imbesi RM, Gulizia GS, Di Mauro S, Maugeri D, Malaguarnera M, Messina A. (2001). Immunosenescence: a review. *Arch Gerontol Geriatr.* 32: 1-14.
- Malorni W, Rivabene R, Lucía BM, Ferrara R, Mazzone AM, Cauda R, Paganelli R. (1998). The role of oxidative imbalance in progression to AIDS: Effect of the thiol supplier N-acetylcysteine. *AIDS Res Hum Retrovir.* 14: 1589-1596.
- Malorni W, Rivabene R, Santini MT, Donelli G. (1993). NAC inhibits apoptosis and decreases viral particles in HIV-chronically infected U937 cells. *FEBS Lett.* 327: 75-78.
- Manaka J, Kuraishi T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Higashida H, Henson P, Nakanishi Y. (2004). Draper-mediated and phosphatidilserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J Biol Chem.* 279: 48466-76.
- Manassra R. (2014). Función inmunitaria y estado redox en el envejecimiento cronológico, prematuro y patológico de ratones. Tesos Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Manning J, Mitchell B, Appadurai DA, Shakya A, Pierce LJ, Wang H, Nganga V, Swanson PC, May JM, Tantin D, Spangrude GJ. (2013). Vitamin C promotes maturation of T-cells. *Antioxid Redox Signal.* 19(17):2054-67.
- Marcos A. (2011). Inmunonutrición. En la salud y la enfermedad. Panamericana. Madrid.
- Marcos A, Nova E, Montero A. (2003). Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *Eur J Clin Nutr.* 57(1): S66-S69.
- Mardones P, Rigotti A. (2004). Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance of a-tocopherol and potencial implications for disease. *J Nutr Biochem.* 15: 252-260.
- Margaritelis NV, Veskokouk AS, Paschalis V, Vrabas IS, Dipla K, Zafeiridis A, Kyparos A, Nikoladis MG. (2015). Blood reflects tissue oxidative stress: a systematic review. *Biomarkers.* 13:1-12.
- Mariani E, Meneghetti A, Neri S, Ravaglia G, Forti P, Cattini L, Facchini A. (2002a). Chemokine production by natural killer cells from nonagenarians. *Eur J Immunol.* 32(6): 1524-1529.
- Mariani E, Pulsatelli L, Meneghetti A, Dolzani P, Mazzetti I, Neri S, Ravaglia G, Forti P, Facchini A. (2001). Different IL-8 production by T and NK lymphocytes in elderly subjects. *Mech Ageing Dev.* 122: 1383-1395.
- Mariani E, Pulsatelli L, Neri S, Dolzani P, Meneghetti A, Silvestri T, Ravaglia G, Forti P, Cattini L, Facchini A. (2002b). RANTES and MIP-1 α production by T lymphocytes, monocytes and NK cells from nonagenarian subjects. *Exp Gerontol.* 37: 219-226.
- Mariani E, Sgobbi S, Meneghetti A, Tadolini M, Tarozzi A, Sinoppi M, Cattini L, Facchini A. (1996). Perforins in human cytolytic cells: the effect of age. *Mech Ageing Dev.* 92: 195-209.
- Marko MG, Ahmed T, Bunnell SC, Wu D, Chung H, Huber BT, Meydani SN. (2007). Age-associated decline in effective immune synapse formation of CD4(+) T cell is reversed by vitamin E supplementation. *J Immunol.* 178: 1443-1449.
- Marosz A, Chlubek D. (2014). The risk of abuse of vitamin supplements. *Ann Acad Med Stetin.* 60(1):60-4.
- Martensson J, Lai JC, Meister A. (1990). High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(18): 7185-7189.
- Marthandan S, Hyland P, Pawelec G, Barnett Y. (2013). An investigation of the effects of the antioxidants, ebselen or N-acetyl cysteine on human peripheral blood mononuclear cells and T cells. *Immun Ageing.* 10(1):7.
- Martínez M. (2000). N-acetylcysteine elicited increase in complex I activity in synaptic mitochondria from aged mice: implications for treatment of Parkinson's disease. *Brain Res.* 859: 173-175.

- Martínez-Banaeloch M, Hernández AI, Martínez N, Ferrándiz ML. (1997). N-acetylcysteine protects against age-related increase in oxidized proteins in mouse synaptic mitochondria. *Brain Res.* 762: 256-258.
- Martínez M, Hernández AI, Martínez N. (2000). N-acetylcysteine delays age-associated memory impairment in mice: role in synaptic mitochondria. *Brain Res.* 855: 100-106.
- Martínez M, Martínez N. (1999). N-acetylcysteine elicited increase in cytochrome c oxidase activity in mice synaptic mitochondria. *Brain Res.* 842: 249-251.
- Martínez M, Martínez N, Hernández AI, Ferrándiz ML. (1999). Hypothesis: Can N-acetylcysteine be beneficial in Parkinson´s disease?. *Life Sci.* 64: 1253-1257.
- Martínez J, Moreno JJ. (2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol.* 59: 865-870.
- Martínez-Taboada V, Bartolomé MJ, Amado JA, Blanco R, García-Unzueta MT, Rodríguez-Valverde V, López-Hoyos M. (2002). Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in elderly subjects are associated with an impaired function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Mech Ageing Dev.* 123(11):1477-86.
- Massie HR, Aiello VR, Doherty TJ. (1984). Dietary vitamin C improves the survival of mice. *Gerontology.* 30(6): 371-375.
- Massip L, Garand C, Paquet ER, Cogger VC, O'Reilly JN, Tworek L, Hatherell A, Taylor CG, Thorin E, Zahradka P, Le Couteur DG, Lebel M. (2010). Vitamin C restores healthy aging in a mouse model for Werner syndrome. *FASEB J.* 24(1):158-72.
- 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, Madrid JA, De la Fuente M. (2014). Chronobiology of the neuroimmunoendocrine system and aging". *Curr Pharm Des.* 20 (29): 4642-4655.
- May JM, Li L, Qu ZC, Huang J. (2005). Ascorbate uptake and antioxidant function in peritoneal macrophages. *Arch Biochem Biophys.* 440: 165-172.
- McArthur WP. (1998). Effect of aging on immunocompetent and inflammatory cells. *Periodontol 2000.* 16: 53-79.
- McCord JM, Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244(22):6049-55.
- McDonald SR, Forster MJ. (2005). Lifelong vitamin E intake retards age-associated decline of spatial learning ability in apoE-deficient mice. *Age (Dordr).* 27(1):5-16.
- McDonald SR, Sohal RS, Forster RJ. (2005). Concurrent administration of coenzyme Q10 and alpha-tocopherol improves learning in aged mice. *Free Radic Biol Med.* 38(6): 729-736.
- McEwen BS. (2002). Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging.* 23(5):921-39.
- McFarland RA. (1953). Human factors in air transportation: occupational health and safety. MacGraw-Hill, New York.
- McLaughlin KA, Osborne BA, Goldsby RA. (1996). The role of oxygen in thymocyte apoptosis. *Eur J Immunol.* 26(5):1170-4.
- Mecocci P, Polidori C, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U. (2000). Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med.* 28(8): 1243-1248.
- Medina S, Del Río M, Hernánz A, De la Fuente M. (2000). Age-related changes in the neuropeptide Y effects on murine lymphoproliferation and interleukin-2 production. *Peptides* 21: 1403-1409.
- Medina S, Del Río M, Hernánz A, De la Fuente M. (2000a). The NPY effects on murine leukocyte adherence and chemotaxis change with age. Adherent cell implication. *Reg Peptides* 95: 35-45.

- Medina S, Del Río M, Víctor VM, Hernánz A, De la Fuente M. (1998). Changes with ageing in the modulation of murine lymphocyte chemotaxis by CCK-8s, GRP and NPY. *Mech Ageing Dev.* 102: 249-261.
- Medvedev ZA. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev.* 65: 375-398.
- Meister A. (1988). On the discovery of glutathione. *Trends Biochem Sci.* 13(5): 185-188.
- Meister M. (2004). Blood cells of *Drosophila*. cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol* 16: 10-15.
- Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. (2009). Epigallocatechin gallate reduces human monocyte mobility and adhesion in vitro. *Br J Pharmacol.* 158(7):1705-12.
- Menon SG, Goswami PC. (2007). A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* 26: 1101-9.
- Meydani M. (1999). Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction. *Mech Ageing Dev.* 111: 123-132.
- Meydani SN, Baklund MP, Liu S, Meydani M, Miller RA, Cannon JG, Morrow FD, Rockling R, Blumberg JB. (1990). Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am J Clin Nutr.* 52: 557-563.
- Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Dinarello CA, Gorbach SL.(1991). Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr.* 121(4):547-55.
- Meydani SN, Han SN, Wu D. (2005). Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications. *Immunol Rev.* 205: 269-281
- Meydani SN, Leka LS, Fine BC, Dallal GE, Keusch GT, Singh MF, Hamer DH (2004) Vitamin E and respiratory tract infections in elderly nursing home residents. A randomized controlled trial. *JAMA* 292: 828-836.
- Meidany M, Lipman RD, Han SN, Wu D, Beharka A, Martin KR, Bronson R, Cao G, Smith D, Meydani SN. (1998). The effect of long-term dietary supplementation with antioxidants. *Ann N Y Acad Sci.* 854: 352-360.
- Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS, Siber G, Loszewski R, Thompson C, Pedrosa MC, Diamond RD, Stollar BD. (1997). Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. *JAMA* 277: 1380-1386.
- Meydani SN, Meydani M, Rall LC, Morrow F, Blumberg JB. (1994). Assessment of the safety of high-dose, short-term supplementation with vitamin E in healthy older adults. *Am J Clin Nutr.* 60(5): 704-709.
- Meydani M, Natiello F, Goldin B, Free N, Woods M, Schaefer E, Blumberg JB, Gorbach SL. (1991b). Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. *J Nutr.* 121(4):484-91.
- Meydani SN, Wu D, Santos MS, Hayek M. (1995). Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am J Clin Nutr.* 62: 1462S-1476S.
- Middleton E. (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol.* 439: 175-182.
- Middleton EJ, Kandaswami CH, Theoharides TC. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 52(4): 673-751.
- Milaneschi Y, Cesari M, Simonsick EM, Vogelzangs N, Kanaya AM, Yaffe K, Patrignani P, Metti A, Kritchevsky SB, Pahor M, Ferrucci L, Penninx BW; Health ABC study. (2013). Lipid peroxidation and depressed mood in community-dwelling older men and women. *PLoS One* 8: e65406.

- Miles EA, Zoubouli P, Calder PC.(2005). Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production. *Clin Nutr.* 24(5):780-4.
- Miquel J. (1998). An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol.* 33: 113-126.
- Miquel J. (2001). Nutrition and ageing. *Public Health Nutr.* 4(6A): 1385-1388.
- Miquel J. (2002). Can antioxidant diet supplementation protect against age-related mitochondrial damage? *Ann. NY Acad. Sci.* 959: 508-516.
- Miquel J. (2009). Teorías del envejecimiento: selección e integración. En: *Biogerontología Médica.* Sastre J, Pamplona R, Ramón JR (eds). Pp: 1-12. Ergon. Madrid.
- Miquel J, Economos AC. (1979). Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxilate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol.* 14: 279-285.
- Miquel J, Ramírez-Boscá A, Ramírez-Bosca JV, Alperi JD. (2006). Menopause: a review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr.* 42(3):289-306.
- Miquel J, Weber H. (1990). Aging and increased oxidation of the sulfur pool. En: *Glutathione: Metabolism and physiological functions.* (Ed. J. Viña). pp: 187-192. CRC Press. Boca Ratón Florida.
- Mitnitski AB, Graham JE, Mogilner AJ, Rockwood K. (2002). Frailty, fitness and late-life mortality in relation to chronological and biological age. *BMC Geriatr.* 2:1.
- Miyaji C1, Watanabe H, Toma H, Akisaka M, Tomiyama K, Sato Y, Abo T. (2000). Functional alteration of granulocytes, NK cells, and natural killer T cells in centenarians. *Hum Immunol.* 61(9):908-16.
- Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachi A, Yonehara S, Taniguchi N. (1992). Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulation in human peripheral blood. *J Immunol.* 149: 3753-3578.
- Mo R, Chen J, Han Y, Bueno-Cannizares C, Misek DE, Lescure PA, Hanash S, Yung RL. (2003). T cell chemokine receptor expression in aging. *J Immunol.* 170(2): 895-904.
- Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R, Cipriano C, Gasparini N, Franceschi C, Gaetti R, Cavalieri E, Suzuki H. (2003). Metallothioneins/PARP-1/IL-6 interplay on natural killer cell activity in elderly: parallelism with nonagenarians and old infected humans. Effect of zinc supply. *Mech Ageing Dev.* 124: 459-468.
- Molano A, Meydani SN. (2012). Vitamin E, signalosomes and gene expression in T cells. *Mol Aspects Med.* 33(1):55-62.
- Moller P, Viscovich M, Lykkesfeldt J, Loft S, Jensen A, Poulsen HE. (2004). Vitamin C supplementation decreases oxidative DNA damage in mononuclear blood cells of smokers. *Eur J Nutr.* 43: 1-7.
- Monget AL, Richard MJ, Cournot MP, Arnaud J, Galan P, Preziosi P, Herbeth B, Favier A, Hercberg S. (1996). Effect of 6 month supplementation with different combinations of an association of antioxidant nutrients on biochemical parameters and markers of the antioxidant defence system in the elderly. *The Geriatrie/Min.Vit.AoxNetwork.* *Eur J Clin Nutr.* 50(7): 443-449.
- Morante M, Sandoval J, Gómez-Cabrera MC, Rodríguez JL, Pallardó FV, Viña JR, Torres L, Barber T. (2005). Vitamin E deficiency induces liver nuclear factor-kappaB DNA-binding activity and changes in related genes. *Free Radic Res.* 39(10): 1127-1138.
- Mori M, Gähwiler BH, Gerber U. (2002). Beta-alanine and taurine as endogenous agonists at glycine receptors in rat hippocampus in vitro. *J Physiol.* 539(Pt 1):191-200.
- Moriguchi S, Kobayashi N, Kishino Y. (1990). High dietary intakes of vitamin E and cellular immune functions in rats. *J Nutr.* 120(9):1096-102.

- Morimoto M, Takagi Y, Higashi N, Suzuki T. (2011). Orally administered rutin inhibits the gene expression of Th2 cytokines in the gut and lung in aged mice. *J Vet Med Sci.* 73(10):1257-63.
- Morris G, Anderson G, Dean O, Berk M, Galecki P, Martin-Subero M, Maes M. (2014). The glutathione system: a new drug target in neuroimmune disorders. *Mol Neurobiol.* 50(3):1059-84.
- Morrison DC, Chen LC, Pace JL. (1993). Altered regulation of nitric oxide production in vitro by macrophages from senescent mice. *J Leuk.* 54: 575-580.
- Mühling J, Nickolaus KA, Matejee R, Langefeld TW, Harbach H, Engel J, Wolff M, Weismüller K, Fuchs M, Welters ID, Krüll M, Heidt MC, Hempelmann G. (2008). Which mechanisms are involved in taurine-dependent granulocytic immune response or amino- and alpha-keto acid homeostasis. *Amino Acids.* 34: 257-270.
- Mukai K, Mitani S, Ohara K, Nagaoka S. (2005). Structure-activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins. *Free Radic Biol Med.* 38(9): 1243-56; 2005.
- Müller L, Pawelec G. (2015). As we age: Does slippage of quality control in the immune system lead to collateral damage? *Ageing Res Rev.* pii: S1568-1637(15)00007-0.
- Murakami S. (2015). Role of taurine in the pathogenesis of obesity. *Mol Nutr Food Res.* doi: 10.1002/mnfr.201500067.
- Mytar B, Siedlar M, Woloszyn M, Ruggiero I, Pryjma J, Zembala M. (1999). Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumour cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. *Br J Cancer* 79: 737-743.

N

- Nagel JE, Chopra RK, Chrest FJ, McCoy MT, Schneider EL, Holbrook NJ, Adler WH. (1988). Decreased proliferation, interleukin 2 synthesis, and interleukin 2 receptor expression are accompanied by decreased mRNA expression in phytohemagglutinin-stimulated cells from elderly donors. *J Clin Invest.* 81: 1096-102.
- Nagyova A, Krajcovicova-Kudlackova M, Horska A, Smolkova B, Blazicek P, Raslova K, Collins A, Dusinska M. (2004). Lipid peroxidation in men after dietary supplementation with a mixture of antioxidant nutrients. *Bratisl Lek Listy.* 105: 277-280.
- Nakai K, Urushihara M, Kubota Y, Kosaka H. (2003). Ascorbate enhances iNOS activity by increasing tetrahydrobiopterin in RAW 264.7 cells. *Free Radic Biol Med.* 35(8): 929-937.
- Naudi A, Jove M, Ilieva E, Cacabelos D, Gonzalo H, Serrano J, Boada J, Ayala MV, Porterp-Ortín M, Pamplona R. (2009). Oxidación de macromoléculas, envejecimiento y longevidad. En: *Biogerontología Médica.* Sastre J, Pamplona R, Ramon JR (eds). Cp. 4. 43-69. Ergon Madrid.
- Navarro A, Gómez C, López-Cepero JM, Boveris A. (2004). Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286(3): R505-R511.
- Navarro A, Gómez C, Sánchez-Pino MJ, González H, Bández MJ, Boveris AD, Boveris A. (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.
- Navarro A, Sánchez-Pino MJ, Gómez C, Bández MJ, Cadenas E, Boveris A (2007). Dietary thioproline decreases spontaneous food intake and increases survival and neurological function in mice. *Antioxid Redox Signal.* 9(1):131-41.

- Netea MG, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Dinarello CA, Joosten LA. (2015). Inflammation-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annu Rev Immunol.* 33:49-77.
- Niki E. (1987). Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol. *Ann N Y Acad Sci.* 498: 186-99.
- Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr.* 62: 1322S-1326S.
- Niwa Y, Kasam 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: 1655-64.
- Noelle RJ, Nowak EC. (2010). Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat Rev Immunol.* 10: 683-7.
- Nordberg J, Arnér ESJ. (2001). Reactive species oxygen, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad Biol Med.* 31: 1287-1312.

O

- Oberley LW, Oberley TD, Buettner GR. (1981). Cell division in normal and transformed cells: the possible role of superoxide and hydrogen peroxide. *Med Hypotheses* 7: 21-42.
- Oberritter H, Glarthaar B, Moser U, Schmidt KH. (1986). Effect of functional stimulation on ascorbate content in phagocytes under physiological and pathological conditions. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 81: 46-50.
- O'Dowd Y, Driss F, Dang PM, Elbim C, Gougerot-Pocidal MA, Pasquier C, El-Benna J. (2004). Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 68(10):2003-8.
- Oeriu S, Vochitu E. (1965). The effect of administration of compounds which contain SH groups on the survival rate of mice, rats and guinea pigs. *J Gerontol.* 20: 417-419.
- Ogata K, An E, Shioi Y, Nakamura K, Luo S, Yokose N, Minami S, Dan K. (2001). Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people. *Clin Exp Immunol.* 124: 392-7.
- Ogiwara T, Satoh K, Kadoma Y, Murakami Y, Unten S, Atsumi T, Sakagami H, Fujisawa S. (2002). Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid. *Anticancer Res.* 22: 2711-2717.
- Ogiwara T, Satoh K, Negoro T, Okayasu H, Sakagami H, Fujisawa S. (2003). Inhibition of NO production by activated macrophages by phenolcarboxylic acid monomers and polymers with radical scavenging activity. *Anticancer Res.* 23: 1317-1323.
- Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Kusuyama J, Matsuguchi T. (2014). Long-time treatment by low-dose N-acetyl-L-cysteine enhances proinflammatory cytokine expressions in LPS-stimulated macrophages. *PLoS One.* 9(2):e87229.
- Oldham KM, Bowen PE. (1998). Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial?. *J Am Diet Assoc.* 98(9):1001-8.
- O'Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YPNMOB, Williamson G. (2004). Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res.* 551: 245-254.
- Omara FO, Blakley BR, Bernier J, Fournier M. (1997). Immunomodulatory and protective effects of NAC in mitogen-activated splenocytes in vitro. *Toxicology* 116: 219-226.
- Ongrádi J, Kövesdi V. (2010). Factors that may impact on immunosenescence: an appraisal. *Immun Ageing* 7: 7.
- Oppenheim JJ, Gery I. (1982). Interleukin 1 is more than an interleukin. *Immunol Today.* 3(4):113-9.

- Ordy JM, Rolsten C, Samorajski T, Collins RL. (1964). Environmental stress and biological ageing. *Nature*. 204:724-7.
- Orr WC, Radyuk SN, Prabhudesai L, Toroser D, Benes JJ, Luchak JM, Mockett RJ, Rebrin I, Hubbard JG, Sohal RS. (2005). Overexpression of glutamate-cysteine ligase extends life span in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*. 280 (45): 37331-37338.
- Ortega E, García JJ, De la Fuente M. (2000). Ageing modulates some aspects of the non-specific immune response of murine macrophage and lymphocytes. *Exp Physiol*. 85: 519-525.
- Otero P, Viana M, Herrera E, Bonet B. (1997). Antioxidant and prooxidant effects of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and flavonoids on LDL submitted to different degrees of oxidation. *Free Radic Res*. 27(6):619-26.

P

- Packer L. (1994). Vitamin E is nature's master antioxidant. *Sci Am Sci Med*. 1: 54-63.
- Packer L, Kraemer K, Rimbach G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*. 17: 888-895.
- Pae M, Meydani SN, Wu D. (2012). The role of nutrition in enhancing immunity in aging. *Aging Dis*. 3(1):91-129.
- Pahlavani MA, Richardson A. (1996). The effect of age on the expression of interleukin-2. *Mech Ageing Dev*. 89: 125-154.
- Paiva CN, Bozza MT. (2014). Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens?. *Antioxid Redox Signal*. 20(6):1000-37.
- Palacio JR, Markert UR, Martínez P. (2011). Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflamm Res*. 60(7):695-704.
- Pallauf K, Bendall JK, Scheiermann C, Watschinger K, Hoffmann J, Roeder T, Rimbach G. (2013a). Vitamin C and lifespan in model organisms. *Food Chem Toxicol*. 58:255-63.
- Pallauf K, Giller K, Huebbe P, Rimbach G. (2013b). Nutrition and healthy ageing: calorie restriction or polyphenol-rich "Mediterranean" diet?. *Oxid Med Cell Longev*. 2013:707421.
- Palozza P, Calviello G, Serini S, Maggiano N, Lanza P, Ranelletti FO, Bartoli GM. (2001). β -carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. *Free Radic Biol Med*. 30: 1000-1007.
- Palozza P, Krinsky NI. (1992). β -carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch Biochem Biophys*. 297: 184-187.
- Palozza P, Serini S, Di Nicuolo F, Piccioni E, Calviello G. (2003). Prooxidant effects of β -carotene in cultured cells. *Mol Asp Med*. 24: 353-362.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Sanz A, Requena J, Barja G. (2004). Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exp Gerontol*. 39(5): 725-733.
- Pandya CD, Howell KR, Pillai A. (2013). Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46: 214-23.
- Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine: 'Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids'. Washington, DC: National Academy Press, 2000.
- Pani G, Colavitti R, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Galeotti T. (2000a). A redox signalling mechanism for density-dependent inhibition of cell growth. *J Biol Chem*. 275: 38891-9.

- Pani G, Colavitti R, Borrello S, Galeotti T. (2000b). Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes. *Biochem J.* 347: 173-181.
- Park EJ, Pezzuto JM. (2015). The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochim Biophys Acta.* 1852(6):1071-113.
- Pasantes-Morales H, Cruz C. (1984). Protective effect of taurine and zinc on peroxidation-induced damage in photoreceptor outer segments. *J Neurosci Res.* 1984;11(3):303-11.
- Patil CS, Singh VP, Satyanarayan PS, Jain NK, Singh A, Kulkarni SK. (2003). Protective effect of flavonoids against aging- and lypopolisaccharide-induced cognitive impairment in mice. *Pharmacology* 69: 59-67.
- Pawelec G. (2012). Hallmarks of human “immunosenescence”: adaptation or dysregulation?. *Immun Ageing* 2012; 9: 15.
- Pawelec G. (2014). T-cell immunity in the aging human. *Haematologica.* 99(5):795-7.
- Pawelec G, Adibzadeh M, Pohla H, Schaudt K. (1995). Immunosenescence: ageing of the immune system. *Immunol Today* 16: 420-2.
- Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fülöp T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R. (2002). T cells and aging. *Front Biosci.* 7: d1056-d1183.
- Pawelec G1, Larbi A, Derhovanessian E. (2010). Senescence of the human immune system. *J Comp Pathol.* 142 Suppl 1:S39-44.
- Pawelec G, Solana R. (2001). Immunoageing-the cause or effect of morbidity. *Trends Immunol.* 22: 348-349.
- Pekmezci D. (2011). Vitamin E and immunity. *Vitam Horm.* 86:179-215.
- Pedersen B, Bruunsgaard H, Ostrowski K, Krabbe K, Krzywdowski K, Toft A, Sondergaard A, Petersen E, Ibfelt T, Schjerling P. (2000). Cytokines in aging and exercise. *Int J Sports Med.* 21: S4-S21.
- Peng YM, Peng YS, Childers JM, Hatch KD, Roe DJ, Lin Y, Lin P. (1998). Concentrations of carotenoids, tocopherols, and retinol in paired plasma and cervical tissue of patients with cervical cancer, precancer, and noncancerous diseases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7(4):347-50.
- Pérez-Álvarez L, Baeza I, Arranz L, Marco EM, Borcel E, Guaza C, Viveros MP, De la Fuente M. (2005). Behavioral, endocrine and immunological characteristics of a murine modelo f premature aging. *Dev Comp Immunol.* 29: 965-976.
- Perez-Cruz I, Carcamo JM, Golde DW. (2003). Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. *Blood* 102:336-343.
- Perls T, Terry D. (2003). Understanding the determinants of exceptional longevity. *Ann Int Med.* 139: 445-449.
- Phan TT, Wang L, See P, Grayer RJ, Chan SY, Lee ST. (2001). Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implications for cutaneous wound healing. *Biol Pharm Bull.* 24: 1373-1379.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L.(2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 30(1):11-26.
- Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Gunawardena R, Rahbari-Oskoui F. (2003). Increased oxidative stress in younger as well as in older humans. *Clin Chim Acta.* 328: 83-86.
- Piazza M, Borgia G, Crowell J, Nappa S, Lambiase A, Perrissoud D, Schreil W. (1985). The effect of 3-palmitoyl-(+)-catechin on Kupffer cells in guinea pig liver. *Hepatology.* 5(5):867-9.
- Pieri C, Moroni F, Recchioni R. (1992). Glutathione influences the proliferation as well as the extent of mitochondria activation in rat splenocytes. *Cell Immunol.* 145: 210-217.
- Pierre V. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Rev Immunol.* 10: 411-452.

- Pion PD, Sanderson SL, Kittelson MD. (1998). The effectiveness of taurine and levocarnitine in dogs with heart disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 28(6):1495-514.
- Pirayesh Islamian J, Mehrali H. (2015). Lycopene as a carotenoid provides radioprotectant and antioxidant effects by quenching radiation-induced free radical singlet oxygen: an overview. *Cell J.* 16(4):386-91.
- Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. (2004). Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell.* 3(4): 161-167.
- Polidori MC, Meccoci P, Levine M, Frei B. (2004). Short-term vitamin C supplementation in humans dose-dependently increases the resistance of plasma to ex vivo lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 423: 109-115.
- Polito A, Intorre F, Andriollo-Sanchez M, Azzini E, Raguzzini A, Meunier N, Ducros V, O'Connor JM, Coudray C, Roussel AM, Maiani G. (2005). Estimation of intake and status of vitamin A, vitamin E and folate in older European adults: the ZENITH. *Eur J Clin Nutr.* 59:S42-S47.
- Pomaki M, Mota MJ, De la Fuente M, Berger J. (2005). Effect of thiolic antioxidants on in vitro mouse peritoneal macrophage functions. *Comp Clin Path.* 13: 176-181.
- Porta P, Aebi S, Summer K, Lauterburg BH. (1991). L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid, a cysteine prodrug: pharmacokinetics and effects on thiols in plasma and lymphocytes in human. *J Pharmacol Exp Ther.* 257: 331-334.
- Porter Starr KN, McDonald SR, Bales CW. (2015). Nutritional Vulnerability in Older Adults: A Continuum of Concerns. *Curr Nutr Rep.* 4(2):176-184.
- Pragasam SJ, Venkatesan V, Rasool M.(2013). Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation.* 36(1):169-76.
- Preziosi P, Galan P, Herbeth B, Valeix P, Roussel AM, Malvy D, Paul-Dauphin A, Arnaud J, Richard M-J, Briancon S, Favier A, Hercberg S. (1998). Effects of supplementation with a combination of antioxidant vitamins and trace elements, at nutritional doses, on biochemical indicators and markers of the antioxidant system in adult subjects. *J Am Coll Nutr.* 17(3): 244-249.
- Prohan M, Amani R, Nematpour S, Jomehzadeh N, Haghhighizadeh MH. (2014). Total antioxidant capacity of diet and serum, dietary antioxidant vitamins intake, and serum hs-CRP levels in relation to depression scales in university male students. *Redox Rep.* 19: 133-9.
- Puerto M, Guayerbas N, Álvarez P, De la Fuente M. (2005a). Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol.* 165(1-2): 33-40.
- Puerto M, Medina S, Baeza I, Alvarado C, Alvarez P, Arranz L, De la Fuente M. (2005b). El estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales de ratones viejos es debido principalmente a los macrófagos. *Inmunología.* 24 (1): 174.
- Puerto M, Guayerbas G, Victor VM, De la Fuente M. (2002). Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behav.* 73: 797-804.
- Puri RN, Meister A. (1983). Transport of glutathione, as glutamylcysteinylglycyl ester, into liver and kidney. *Proc Natl Acad Sci.* 80:5228-5260.
- Purwanto B, Prasetyo DH. (2012). Effect of oral N-acetylcysteine treatment on immune system in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Acta Med Indones.* 44(2):140-4.

R

- Rahman I, Biswas SK, Jiménez LA, Torres M, Forman HJ. (2005). Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 7(1-2): 42-59.
- Ratner S, Clarke HT. (1937). The action of formaldehyde upon cysteine. *J. Am. Chem. Soc.* 59: 200-206.
- Rattan SI. (2006). Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free Radic Res.* 40(12):1230-8.
- Rattan SI. (2012). Rationale and methods of discovering hormetins as drugs for healthy ageing. *Expert Opin Drug Discov.* 7(5):439-48.
- Rattan SI. (2014). Molecular gerontology: from homeodynamics to hormesis. *Curr Pharm Des.* 20(18):3036-9.
- Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Bastagali L, Facchini A, Erminia M, Savarino L, Sassi S, Cucinotta D, Lenaz G. (2000). Effect of micronutrient status on natural killer cell immune function in healthy free-living subjects ≥ 90 y. *Am J Clin Nutr.* 71: 590-598.
- Rayment SJ, Shaw J, Woollard KJ, Lunec J, Griffiths HR. (2003). Vitamin C supplementation in normal subjects reduces constitutive ICAM-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 308: 339-345.
- Rebrin I, Zicker S, Wedekind KJ, Paetau-Robinson I, Packer L, Sohal RS. (2005). Effect of antioxidant-enriched diets on glutathione redox status in tissue homogenates and mitochondria of the senescence-accelerated mouse. *Free Radic Biol Med.* 39(4): 549-557.
- Rice-Evans C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 8: 797-807.
- Riso P, Visioli F, Gardana C, Grande S, Brusamolín A, Galvano F, Galvano G, Porrini M. (2005). Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *J Agric Food Chem.* 53(4): 941-947.
- Riso P, Visioli F, Erbo D, Testolin G, Porrini M. (2004). Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection. *Eur J Clin Nutr.* 58: 1350-1358.
- Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. (2004). Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med.* 32(2): 342-349.
- Ristow M, Schmeisser S. (2011). Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 51(2):327-36.
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehnopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M (2009) Antioxidants prevent health-promoting effect of physical exercise in humans. *PNAS* 106:8665-8670.
- Rivabene R, Viora M, Matarrese P, Rainaldi G, D'Ambrosio A, Malorni W. (1995). N-acetylcysteine enhances cell adhesion properties of epithelial and lymphoid cells. *Cell Biol Internat.* 19: 681-686.
- Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F. (2014). The role of vitamin e in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 14(2):e157-65.
- Roberts RL, Aroda VR, Ank BJ. (1995). N-acetylcysteine enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity in neutrophils and mononuclear cells from healthy adults and human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis.* 172: 1492-1502.
- Rojas C, Cadenas S, Herrero A, Mendez J, Barja G. (1996). Endotoxin depletes ascorbate in the guinea pig heart. Protective effects of vitamins C and E against oxidative stress. *Life Sci.* 59(8): 649-657.
- Romanyukha AA, Yashin AI. (2003). Age related changes in population of peripheral T cells: towards a model of immunosenescence. *Mech Ageing Dev.* 124(4): 433-443.

- Rosenblat M, Coleman R, Aviram M. (2002). Increased macrophage glutathione content reduces cell-mediated oxidation of LDL and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 163: 17-28.

S

- Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. (2014). Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *Biomed Res Int*. 2014:1-17.
- Sagun KC, Carcamo JM, Golde DW. (2005). Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (GLUT-1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury. *FASEB J*. 19(12): 1657-1667.
- Saleh F, Raghupathy R, Asfar S, Oteifa M, Al-Saleh N. (2014). Analysis of the effect of the active compound of green tea (EGCG) on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells. *BMC Complement Altern Med*. 14:322.
- Sakamoto W, Fujie K, Handa H, Nishihira J, Mino M. (1991). Vitamin E inhibits PGE₂ and O₂⁻ production in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1074(2): 251-255.
- Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Handa H, Ozaki M, Yukawa S. (1998). Inhibition of macrophage migration inhibitory factor secretion from macrophages by vitamin E. *Biochim Biophys Acta*. 1404(3):427-34.
- Sakai S, Moriguchi S. (1997). Long-term feeding of high vitamin E diet improves the decreased mitogen response of rat splenic lymphocytes with aging. *J Nutr Sci Vitaminol*. 43(1):113-22.
- Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. (2008a). Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Research Reviews* 7: 83-105.
- Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K. (2008b). SIRT 1 longevity factor suppresses NF- κ B-driven immune responses: regulation of aging via NF- κ B acetylation?. *Bioessays* 30:939-42.
- Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, Telera A, Lucchini G, Passeri G, Monti D, Franceschi C, Passeri M. (2008). The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol*. 43: 61-5.
- Santos MS, Leka L, Ribaya-Mercado JD, Russell RM, Meydani M, Hennekens CH, Gaziano JM, Meydani SN. (1997). Short- and long-term beta-carotene supplementation do not influence T cell-mediated immunity in healthy elderly persons. *Am J Clin Nutr*. 66: 917-924.
- Sapey E, Greenwood H, Walton G, Mann E, Love A, Aaronson N, Insall RH, Stockley RA, Lord JM. (2014). Phosphoinositide 3-kinase inhibition restores neutrophil accuracy in the elderly: toward targeted treatments for immunosenescence. *Blood* 123: 239-48.
- Sapolsky RM. (1992). Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat?. *Neurobiol Aging*. 13(1):171-4.
- Saraymen R, Kilic E, Yazar S, Cetin M. (2003). Influence of sex and age on the activity of antioxidant enzymes of polymorphonuclear leukocytes in healthy subjects. *Yonsei Med J*. 44(1): 9-14.
- Sasaki S, Miwa K, Fujimura T, Oba M, Miyashita T, Kinami S. (2007). Ingestion of thioproline suppresses rat esophageal adenocarcinogenesis caused by duodenogastroesophageal reflux. *Oncol Rep*. 18(6):1443-9.
- Sasaki T, Senda M, Kim S, Kojima S, Kubodera A. (2001). Age-related changes of glutathione content, glucose transport and metabolism, and mitochondrial electron transfer function in mouse brain. *Nucl Med Biol*. 28(1): 25-31.
- Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Viña J. (2000). Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res*. 32(3):189-98.

- Sastre J, Pallardó FV, Viña J. (2003). The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med.* 35: 1-8.
- Satarug S, Haswell-Elkins MR, Tsuda M, Mairiang P, Sithithaworn P, Mairiang E, Esumi H, Sukprasert S, Yongvanit P, Elkins DB. (1996). Thiocyanate-independent nitrosation in humans with carcinogenic parasite infection. *Carcinogenesis* 17: 1075-1081.
- Sayers TJ, Mason LH, Wiltout TA. (1990). Trafficking and activation of murine natural killer cells: differing roles for IFN-gamma and IL-2. *Cell Immunol.* 127(2):311-26.
- Scalbert A, Morand C, Manach C, Remesy C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.* 56: 276-282.
- Schafer FQ, Buettner GR. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 30: 1191-1212.
- Schieber M, Chandel NS. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 24(10):R453-62
- Schoonbroodt S, Piette J. (2000). Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappaB activation pathways. *Biochem Pharmacol.* 60(8): 1075-1083.
- Schriner SE, Lindford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Ravinovich PS. (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science.* 308(5730): 1909-1911.
- Schröder AK, Rink L. (2003). Neutrophil immunity of the elderly. *Mech Ageing Dev.* 124: 419-25.
- Schuller-Levis GB, Park E. (2004). Taurine and its chloramines: modulators of immunity. *Neurochem Res.* 29: 117-126.
- Schultz D, Harrison DG. (2000). Quest for fire: seeking the source of pathogenic oxygen radicals in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(6): 1412-1413.
- Schwages J, Schulze J. (1998). "Modulation of interleukin production by ascorbic acid", *Vet Immunol Immunopathol.* 64: 45-67.
- Schwarz K. (1965). Role of vitamin E, selenium, and related factors in experimental nutritional liver disease. *Federation Proc.* 24: 58-67.
- Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C. (2003). Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp Toxicol Pathol.* 54: 313-318.
- Shaik-Dasthagirisahab YB, Varvara G, Murmura G, Saggini A, Caraffa A, Antinolfi P, Tete' S, Tripodi D, Conti F, Cianchetti E, Toniato E, Rosati M, Speranza L, Pantalone A, Saggini R, Tei M, Speziali A, Conti P, Theoharides TC, Pandolfi F. (2013). Role of vitamins D, E and C in immunity and inflammation. *J Biol Regul Homeost Agents.* 27(2):291-5.
- Shandu SK, Kaur G. (2002). Alterations in oxidative stress scavenger system in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontology.* 3(3): 161-173.
- Sharma R, Kapila R, Haq MR, Salingati V, Kapasiya M, Kapila S. (2014). Age-associated aberrations in mouse cellular and humoral immune responses. *Aging Clin Exp Res.* 26: 353-62.
- Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. (2010). Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 22: 507-13.
- Shen SC, Lee W R, Lin HY, Huang HC, Ko CH, Yang LL, Chen YC. (2002). In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E(2) production. *Eur J Pharmacol.* 446: 187-194.
- Shibamura A, Ikeda T, Nishikawa Y. (2009). A method for oral administration of hydrophilic substances to *Caenorhabditis elegans*: Effects of oral supplementation with antioxidants on the nematode lifespan. *Mech Ageing Dev.* 130(9):652-5.

- Shimizu K, Kinouchi Shimizu N, Hakamata W, Unno K, Asai T, Oku N. (2010). Preventive effect of green tea catechins on experimental tumor metastasis in senescence-accelerated mice. *Biol Pharm Bull.* 33(1):117-21.
- Shock NW. (1979). Physiological and chronological age. En: *Aging its chemistry* (AA Dietz, Ed). The American Association for Clinical Chemistry.
- Sierra S, Lara-Villoslada F, Olivares M, Jiménez J, Boza J, Xaus J. (2005). Increased immune response in mice consuming rice bran oil. *Eur J Nutr.* 44: 509-516.
- Siddiqui AH, Gulati R, Tauheed N, Pervez A. (2014). Correlation of Waist-to-hip Ratio (WHR) and Oxidative Stress in Patients of Acute Myocardial Infarction (AMI). *J Clin Diagn Res.* 8: 4-7.
- Sies H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie.* 25: 1058-1071.
- Sies H, Stahl W. (1995). Vitamins E, C, b-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr.* 62(suppl): 1315S-1321S.
- Sies H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 27: 916-921.
- Sies H, Stahl W, Sundquist WR. (1992). Antioxidant functions of vitamins. Vitamin E, C, β - and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci.* 669: 7-20.
- Simell B, Vuorela A, Ekström N, Palmu A, Reunanen A, Meri S, Käyhty H, Väkeväinen M. (2011). Aging reduces the functionality of anti-pneumococcal antibodies and the killing of *Streptococcus pneumoniae* by neutrophil phagocytosis. *Vaccine* 29: 1929-34.
- Simioni PU, Costa EH, Tamashiro WM. (2007). Aging reduces the primary humoral response and the in vitro cytokine production in mice. *Braz J Med Biol Res.* 40: 1111-20.
- Singh U, Devaraj S, Jialal I. (2005). Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Ann Rev Nutr.* 25: 151-174.
- Sirdah MM.(2015). Protective and therapeutic effectiveness of taurine in diabetes mellitus: a rationale for antioxidant supplementation. *Diabetes Metab Syndr.* 9(1):55-64.
- Smyth M. (1991). Glutathione modulates activation-dependent proliferation of human peripheral blood lymphocytes populations without regulating their activated function. *J Immunol.* 146: 1921-1927.
- Sohal RS. (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med.* 33: 37-44.
- Sohal RS, Weindruch R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63.
- Solana R, Alonso MC, Peña J. (1999). Natural killer cells in healthy aging. *Exp Gerontol.* 34: 435-443.
- Solana R, Mariani E. (2000). NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine* 18: 1613-1620.
- Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T.(2012). Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin Immunol.* 24(5):331-41.
- Soler A, Holgado MC, de Juan E, Prieto A, Ribera D, Miquel J. Perfil de edad biológica (biograma o gerograma) en una población laboral. *Geriatrka* 1990; 6: 369-73.
- Soler A, Miquel J (2009). Objetivar el envejecimiento mediante marcadores biológicos de la edad. En: *Biogerontología Médica.* Sastre J, Pamplona R, Ramón JR (eds). Pp: 235-242. Ergon. Madrid.
- Soler A, Prieto A, Sevilla I, Ribera D, Reig A, Miquel J. Biograma: instrument de análisis de edad biológica en grupos poblacionales diversos. *Geriatrka* 1992; 8: 3-9.
- Solomons NW. (1999). Single-nutrient interventions with zinc. *Am J Clin Nutr.* 70: 111-112.

- Song C, Vandewoude M, Stevens W, De Clerck L, Van der Planken M, Whelan A, Anisman H, Dossche A, Maes M. (1999). Alterations in immune functions during normal aging and Alzheimer's disease. *Psychiatry Res.* 85: 71-80.
- Song L, Kim YH, Chopra RK, Proust JJ, Nagel JE, Nordin AA, Adler WH. (1993). Age-related effects in T cell activation and proliferation. *Exp Gerontol.* 28: 313-21.
- Sonntag WE, Goliszek AG, Brodish A, Eldridge JC. (1987). Diminished diurnal secretion of adrenocorticotropin (ACTH), but not corticosterone, in old male rats: possible relation to increased adrenal sensitivity to ACTH in vivo. *Endocrinology.* 120(6):2308-15.
- Soriani A, Iannitto ML, Ricci B, Fionda C, Malgarini G, Morrone S, Peruzzi G, Ricciardi MR, Petrucci MT, Cippitelli M, Santoni A.(2014). Reactive oxygen species- and DNA damage response-dependent NK cell activating ligand upregulation occurs at transcriptional levels and requires the transcriptional factor E2F1. *J Immunol.* 193(2):950-60.
- Sorice A, Guerriero E, Capone F, Colonna G, Castello G, Costantini S. (2014). Ascorbic acid: its role in immune system and chronic inflammation diseases. *Mini Rev Med Chem.* 14(5):444-52.
- Spriet LL, Whitfield J. (2015). Taurine and skeletal muscle function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 18(1):96-101.
- Springer TA. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 346: 425-434.
- Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen L, Aarssman CJ, Oirschot JF, van der Bruggen T, van Asbeck BS. (1998). Low dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high dose increases mortality. *Am J Resp Cr Care Med.* 14: 525-528.
- Stadler N, Eggermann J, Vöo N, Kranz A, Waltenberger J. (2007). "Smokin-induced monocyte dysfunction is reversed by vitamin C supplementation in vivo", *Arterios Thromb Vascular Biol.* 27:120-127.
- Stahl W, Ale-Agha N, Polidori MC. (2002). Non-antioxidant properties of carotenoids. *Biol Chem.* 383: 553-558.
- Stein M, Miller AH, Trestman RL. (1991). Depression, the immune system, and health and illness. Findings in search of meaning. *Arch Gen Psychiatry.* 1991 Feb;48(2):171-7.
- Stein-Behrens BA, Sapolsky RM (1992). Stress, glucocorticoids, and aging. *Aging* 4(3):197-210.
- Steinhauser ML, Kunkel SL, Hogaboam CM, Evanoff H, Strieter RM, Lukacs NW. (1998). Macrophage/fibroblast coculture induces macrophage inflammatory protein-1 alpha production mediated by intercellular adhesion molecule-1 and oxygen radicals. *J Leuk Biol.* 64: 636-641.
- Stio M, Iantomasi T, Favilli F, Marraccini P, Lunghi B, Vincenzini MT, Treves C. (1994). Glutathione metabolism in heart and liver of the aging rat. *Biochem Cell Biol.* 72(1-2): 58-61.
- Stipanuk MH, Ueki I. (2011). Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inherit Metab Dis.* 34(1):17-32
- Stohs SJ, Lawson T, Al-Turk WA. (1984). Changes in glutathione and glutathione metabolizing enzymes in erythrocytes and lymphocytes of mice as a function of age. *Gen Pharmacol.* 15(3):267-70.
- Stout RD, Suttles J. (2005). Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev.* 205: 60-71.
- Straub RH, Cutolo M, Zietz B, Schölmerich J. (2001). The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems. *Mech Ageing Dev.* 122: 1591-1611.

- Straub RH, Miller LE, Schölmerich J, Zietz B. (2000). Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Neuroimmunol.* 109: 2197-2202.
- Strehler BL. (1977). *Time, cells and aging.* NY Academic Press.
- Ströle A, Wolters M, Hahn A (2011). Micronutrients at the interface between inflammation and infection-ascorbic acid and calciferol: part 1, general overview with a focus on ascorbic acid. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 10: 54-63.
- Sturman JA. (1990). Taurine deficiency. *Prog Clin Biol Res.* 351:385-95.
- Sturman JA. (1993). Taurine in development. *Physiol Rev.* 73(1):119-47.
- Sturman JA, Chesney RW.(1995). Taurine in pediatric nutrition. *Pediatr Clin North Am.* 42(4):879-97.
- Sturman JA, Lu P, Xu YX, Imaki H. (1994). Feline maternal taurine deficiency: effects on visual cortex of the offspring. A morphometric and immunohistochemical study. *Adv Exp Med Biol.* 359:369-84.
- Su KY, Yu CY, Chen YP, Hua KF, Chen YL.(2014). 3,4-Dihydroxytoluene, a metabolite of rutin, inhibits inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated macrophages by reducing the activation of NF- κ B signaling. *BMC Complement Altern Med.* 14:21.
- Sumien N, Forster MJ, Sohal RS. (2003). Supplementation with vitamin E fails to attenuate oxidative damage in aged mice. *Exp Gerontol.* 38: 699-704.
- Suthanthiran M1, Anderson ME, Sharma VK, Meister A. (1990). Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proc Natl Acad Sci.* 87(9):3343-7.
- 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.

T

- Takao S, Smith EH, Wang D, Chan CK, Bulkley GB, Klein AS. (1996). Role of reactive oxygen metabolites in murine peritoneal macrophage phagocytosis and phagocytic killing. *Am Phys Soc.* 271: 1278-1284.
- Tang Y, Di Pietro L, Feng Y, Wang X. (2000). Increased TNF- α and PFI2, but not NO release from macrophages in 18 months old rats. *Mech Ageing Dev.* 114: 79-88.
- Tappel AL. (1962). Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitamin Horm.* 20: 493-510.
- Taub DD, Longo DL. (2005). Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol Rev.* 205: 72-93.
- Thorner RE, Barker CF, MacGregor RR. (1983). Improvement of granulocyte adherence and in vivo granulocyte delivery by ascorbic acid in renal transplant patients. *Transplantation* 34 432-436
- Tian L, Cai Q, Wei H. (1998). Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med.* 24(9): 1477-1484.
- Tirouvanzian R, Davidson CJ, Lipsick JS, Herzenberg LA. (2003). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of *Drosophila* hemocytes reveals important functional similarities to mammalian leukocytes. *PNAS* 101: 2912-17.
- Tortorella C, Piazzolla G, Antonaci S. (2001). Neutrophil oxidative metabolism in aged humans: a perspective. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 23: 565-72.
- Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Jirillo E, Antonaci S. (1999). Age-related effects of oxidative metabolism and cyclic AMP signaling on neutrophil apoptosis. *Mech Ageing Dev.* 110: 195-205.
- Tower J. (2015). Programmed cell death in aging. *Ageing Res Rev.* 23(Pt A):90-100.

- Traber MG. (1999). En: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. Modern nutrition in health and disease. pp 347- 362. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Traber MG. (2014). Vitamin E inadequacy in humans: causes and consequences. *Adv Nutr.* 5(5):503-14.
- Traverso N, Patriarca S, Balbis E, Furfaro AL, Cottalasso D, Pronzato MA, Carlier P, Botta F, Marinari UM, Fontana L. (2003). Anti-malondialdehyde-adduct immunological response as a possible marker of successful aging. *Exp Gerontol.* 38(10): 1129-1135.
- Treinen MM, Smith CV. (1992). Free radical mechanism of tissue injury. P.1-20.CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Trnkova L, Drsata J, Bousova I. (2015). Oxidation as an important factor of protein damage: Implications for Maillard reaction. *J Biosci.* 40(2):419-39.
- Tsuda M. (1995). Marked increase in urinary excretion of nitrate and N-nitrosothioproline in the osteogenic disordered syndrome rats, lacking ascorbic acid biosynthesis, by administration of lipopolysaccharide and thioproline. *Carcinogenesis* 16: 2653-2657.
- Tsukamoto K, Machida K. (2012). Effects of life events and stress on neutrophil functions in elderly men. *Immun Ageing* 9: 13.

U

- Uchio R, Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, Ishigami A.(2015). High dietary intake of vitamin C suppresses age-related thymic atrophy and contributes to the maintenance of immune cells in vitamin C-deficient senescence marker protein-30 knockout mice. *Br J Nutr.* 113(4):603-9.
- Ueno LM, Yamashita Y, Moritani T, Nakamura E. (2003). Biomarkers of aging in women and the rate of longitudinal changes. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci.* 22(1):37-46.
- Uitz E, Bahadori B, McCarty MF, Moghadasian MH. (2014). Practical strategies for modulating foam cell formation and behavior. *World J Clin Cases.* 2(10):497-506.
- Ulatowski LM, Manor D. (2015). Vitamin E and neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* pii: S0969-9961(15)00128-X.
- Uppal N, Uppal V, Uppal P. (2014). Progression of Coronary Artery Disease (CAD) from Stable Angina (SA) Towards Myocardial Infarction (MI): Role of Oxidative Stress. *J Clin Diagn Res.* 8: 40-3.
- Urban T, Akerlund B, Jarstrand C, Lindoke B. (1997). Neutrophil function and glutathione peroxidase activity activity in healthy individuals after treatment with NAC. *Biomed Pharmacother.* 51: 388-390.

V

- Vallejo C, Hernanz A, De la Fuente M. (2006). Relation between plasma cortisol levels and blood leukocyte function in elderly people. Effect of moderate physical exercise. *Neuroimmunomodulation.* 13: 248.
- Van der Berg JM, Weyer S, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW. (2001). Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils. *J Leuk Biol.* 69: 467.
- Vázquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. (2000). Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med.* 192(2): 227-236.
- Vera JC, Rivas CI, Fischbarg J, Golde DW. (1993). Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature.* 364: 79-82.

- Verrax J, Calderon PB. (2009). Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. *Free Rad Biol Med.* 47: 32-40.
- Vetvicka V, Vetvickova J. (2012). Combination of glucan, resveratrol and vitamin C demonstrates strong anti-tumor potential. *Anticancer Res.* 32(1):81-7.
- Victor VM. (2001). Estudio comparado de la función inmune en modelos murinos de shock endotóxico. Papel de los antioxidantes. Tesis Doctoral UCM.
- Víctor VM, De la Fuente. (2000). Comparative study of peritoneal macrophage functions in mice receiving lethal and non-lethal doses of LPS. *J Endotoxin Res.* 6(3): 235-241.
- Víctor VM, De la Fuente M. (2002). N-acetylcysteine improves in vitro the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Rad Res.* 36(1): 33-45.
- Víctor VM, De la Fuente M. (2003a). Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF-kappaB. *Free Rad Res.* 37:19-27.
- Víctor VM, De la Fuente M. (2003b). Changes in the superoxide production and other macrophage functions could be related to the mortality of mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Physiol Res.* 52(1): 101-110.
- Víctor VM, De la Fuente M. (2003c). Several functions of immune cells in mice changed by oxidative stress caused by endotoxin. *Physiol Res.* 52(6): 789-796.
- Víctor VM, Guayerbas N, De la Fuente M. (2002a). Changes in the antioxidant content of mononuclear leukocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Mol Cell Biochem.* 229(1-2): 107-111.
- Víctor VM, Guayerbas N, Garrote D, Del Río M, de la Fuente M. (1999). Modulation of murine macrophage function by N-acetylcysteine in a model of endotoxic shock. *Biofactors.* 10(4): 347-357.
- Víctor VM, Guayerbas N, Puerto M, De la Fuente M. (2001). Changes in the ascorbic acid levels of peritoneal lymphocytes and macrophages of mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Rad Res.* 35: 907-916.
- Víctor VM, Guayerbas N, Puerto M, Medina S, de la Fuente M. (2000). Ascorbic acid modulates in vitro the function of macrophages from mice with endotoxic shock. *BioFactors.* 10: 347-357.
- Víctor VM, Miñano M, Guayerbas N, Del Río M, Medina S, De la Fuente M. (1998). Effects of endotoxic shock in several functions of murine peritoneal macrophages. *Mol Cell Biochem.* 189(1-2): 25-31.
- Víctor VM, Rocha M, De la Fuente M. (2003a). Regulation of macrophage function by the antioxidant N-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin. *Int Immunopharmacol.* 3(1): 97-106.
- Víctor VM, Rocha M, De la Fuente M. (2003b). N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. *Free Rad Res.* 37(9): 919-929.
- Víctor VM, Rocha M, Espulgues JV, De la Fuente M. (2005). Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. *Curr Pharm Des.* 11(24):3141-3158.
- Víctor VM, Rubio D, De la Fuente M. (2002b). Comparative study of several lymphocyte functions in two strains of mice with different models of endotoxic shock. *Physiol Res.* 51(3): 291-298.
- Vida C, De la Fuente M. (2013). Stress-related Behavioural Responses, Immunity and Ageing in animal models". In. "Immunosenescence: Psychosocial and Behavioral Determinants". J.A. Bosch, A.C. Phillips, J.M. Lord (eds.). Chapter 8. Pp.: 125-144. Springer, Science+Business Media NY.
- Vida C, Gonzalez EM, De la Fuente M. (2014). Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr Pharm Des.* 20 (29): 4656-4678.

- Viña J. (1990). Glutathione: metabolism and physiological functions. CRC press Boca Raton Florida.
- Viña J, Borrás C, Miquel J.(2007a). Theories of ageing. IUBMB Life. 59(4-5):249-54.
- Viña J, Borrás C, Gómez-Cabrera MC, Orr WC. (2006). Part of the Series: From Dietary Antioxidants to Regulators in Cellular Signalling and Gene Expression Role of reactive oxygen species and (phyto) oestrogens in the modulation of adaptive response to stress. Free Radic Res. 40(2): 111-119.
- Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borrás C. (2007b). Fostering antioxidant defences: up-regulation of antioxidant genes or antioxidant supplementation?. British J Nutr. 98: S36-S40.
- Viña JR, Saez GT, Viña J. (1989). The physiological functions of glutathione. En: Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. CRC press,pp: 121-132.
- Viña J, Sastre J, Pallardó F, Borrás C. (2003). Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males. Antioxid Redox Signal. 5(5): 549-556.
- Viora M., Quaranta M. G., Straface E., Vari R., Masella R., Malorni W. (2001). Redox imbalance and immune functions: opposite effects of oxidized low-density lipoproteins and N-acetylcysteine. Immunology 104: 431-438.
- 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.
- Vodjani A, Bazargan M, Vodjani E, Wright J. (2000). New evidence for antioxidant properties of vitamin C. Cancer Detec Preven 24: 508-523.
- Volkert D. (2013). Malnutrition in older adults - urgent need for action: a plea for improving the nutritional situation of older adults. Gerontology. 59(4):328-33.
- Vrolijk MF, Opperhuizen A, Jansen EH, Godschalk RW, Van Schooten FJ, Bast A, Haenen GR. (2015). The shifting perception on antioxidants: the case of vitamin E and β -carotene. Redox Biol. 4:272-8.

W

- Wakikawa A, Utsuyama M, Wakabayashi A, Kitagawa M, Hirokawa K. (1999). Vitamin E enhances the immune functions of young but not old mice under restraint stress. Exp Gerontol. 34: 853-862.
- Walford RL. (1969). En: The immunological theory of aging. pp70-75. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Walford RL. (1987). MHC-regulation of aging: An extension of the immunologic theory of aging. En Modern Biological Theories of Aging. Warner HR, Butler RN, Sprott RL, Schneider EL eds. p 243-260. Raven Press New York.
- Wang H, Liu H, Liu RM. (2003). Gender difference in glutathione metabolism during aging in mice. Exp Gerontol. 38: 507-517.
- Wang J, Mazza G. (2002). Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. J Agric Food Chem. 50: 4183-4189.
- Wang T, Zhang X, Li JJ. (2002). The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. Int Immunopharmacol. 2(11): 1509-1520.
- Watzl B, Bub A, Pretzer G, Roser S, Barth S W, Rechkemmer G. (2004). Daily moderate amounts of red wine or alcohol have no effect on the immune system of healthy men. Eur J Clin Nutr. 58: 40-45.
- Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. (1990). Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. J Gerontol. 45: 45-98.
- Weber P, Bendich A, Schalch W. (1996). Vitamin C and human health-are view of recent data relevant to human requirements. Int J Vit Nutr Res. 66: 19-30.

- Weber HW, Fleming J F, Miquel J. (1982). Thiazolidine-4-carboxylic acid, a physiologic sulfhydryl antioxidant with potential value in geriatric medicine. *Arch. Gerontol Geriatr.* 1: 299- 310.
- Weinert BT, Timiras PS. (2003). Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol.* 95(4): 1706-1716.
- Weksler ME. (2000). Changes in B cell repertoire with age. *Vaccine.* 18: 1624-1628.
- Weksler ME, Szabo P. (2000). The effect of age on the B-cell repertoire. *J Clin Immunol.* 20: 240-249.
- Wessels I, Jansen J, Rink L, Uciechowski P. (2010). Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils. *ScientificWorld J.* 10: 145-160.
- Winterbourn CC (1993). Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Rad Biol Med* 14: 85-90
- Wintergerst ES, Maggini S, Horning DH. (2006). Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *An Nutr Metabol.* 50: 85-94.
- Włodek L1, Grabowska A, Marcinkiewicz J. (1995). The modulation of IL-2 dependent proliferation of CTLL-2 cells by 2-methyl-thiazolidine-2,4-dicarboxylic acid. *Immunopharmacol.* 30(1):51-8.
- Włodek L, Rommelspacher H, Susilo R, Radomski J, Höfle G. (1993). Thiazolidine derivatives as source of free L-cysteine in rat tissue. *Biochem Pharmacol.* 46(11):1917-28.
- Wolach B, Gavrieli R, Ross D. (2000). The clinical significance of neutrophil dysfunction. *Adv Exp Med Biol.* 479:223-5.
- Wood SM, Beckham C, Yosioka A, Darban H. (1999). b-carotene and selenium supplementation enhances immune response in aged humans. *Int Med.* 2: 85-92.
- Woodall AA, Ames BN. (1997). Diet and oxidative damage to DNA: the importance of ascorbate as an antioxidant. En: Packer L, Fuchs J, eds. *Vitamin C in health and disease.* 193-203. New York: Marcel Dekker Inc.
- Woollard KJ, Loryman CJ, Meredith E, et al., (2002). Effects of oral vitamin C on monocyte: endothelial cell adhesion in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Comm.* 294: 1161-1168.
- Wrona D. (2006). Neural-immune interactions: an integrative view of bidirectional relationship between the brain and immune system. *J Neuroimmunol.* 172: 38-8.
- Wu D, Guo Z, Ren Z, Guo W, Meydani SN. (2009). Green tea EGCG suppresses T cell proliferation through impairment of IL-2/IL-2 receptor signaling. *Free Radic Biol Med.* 47(5):636-43.
- Wu D, Liu L, Meydani M, Meydani SN. (2005). Vitamin E increases production of vasodilator prostanoids in human aortic endothelial cells through opposing effects on cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. *J Nutr.* 135: 1847-1853.
- Wu D, Meydani SN. (2004). Mechanism of age-associated up-regulation in macrophage PGE2 synthesis. *Brain Behav Immun.* 18: 487-494.
- Wu D, Meydani SN. (2008). Age-associated changes in immune and inflammatory responses: impact of vitamin E intervention. *J Leuk Biol.* 84(4):900-14.
- Wu D, Meydani SN. (2014). Age-associated changes in immune function: impact of vitamin E intervention and the underlying mechanisms. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 14(4):283-9.
- Wu D, Mura C, Beharka AA, Han SN, Paulsen KE, Hwang D, Meydani SN. (1998). Age-associated increase in PGE2 synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. *Am J Physiol.* 275(3 Pt 1): C661-668.

Y

- Yan CYI, Greene LA. (1998). Prevention of PC12 cell death by N-acetylcysteine requires activation of the Ras pathway. *J Neurosci.* 18: 4042-4049.

- Yeligar SM, Harris FL, Hart CM, Brown LA. (2014). Glutathione attenuates ethanol-induced alveolar macrophage oxidative stress and dysfunction by downregulating NADPH oxidases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 306(5):L429-41.
- Youdim KA, Joseph J A. (2001). A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Rad Biol Med.* 30: 583-594.
- Young AJ, Lowe GM. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys.* 385: 20-27.

Z

- Zamamiri-Davis F, Lu Y, Thompson JT, Prabhu KS, Reddy PV, Sordillo LM, Reddy CC. (2002). Nuclear factor-kappaB mediates over-expression of cyclooxygenase-2 during activation of RAW 264.7 macrophages in selenium deficiency. *Free Radic Biol Med.* 32(9): 890-897.
- Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, Stone SV, Gustafson D, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC; Cache County Study Group. (2004). Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch Neurol.* 61(1):82-88.
- Zanni F, Vescovini R, Biasini C, Fagnoni F, Zanlari L, Telera A, Di Pede P, Passeri G, Pedrazzoni M, Passeri M, Franceschi C, Sansoni P. (2003). Marked increase with age of type 1 cytokines within memory and effector/cytotoxic CD8+ T cells in humans: a contribution to understand the relationship between inflammation and immunosenescence. *Exp Gerontol.* 38(9): 981-987.
- Zapata HJ, Quagliarello VJ. (2015). The microbiota and microbiome in aging: potential implications in health and age-related diseases. *J Am Geriatr Soc.* 63(4):776-81.
- Zaragoza A, Diez-Fernández C, Álvarez AM, Andrés D, Cascales M. (2000). Effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on endogenous antioxidants defenses system gene expression in a rat hepatocyte model of cocaine cytotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1496: 183-195.
- Zeng X, Zheng J, Fu C, Su H, Sun X, Zhang X, Hou Y, Zhu Y.(2013). A newly synthesized sinapic acid derivative inhibits endothelial activation in vitro and in vivo. *Mol Pharmacol.* 83(5):1099-108.
- Zhang H, Spapen H, Nguyen DN, Benlabeled M, Buurman WA, Vincent JL. (1994). Protective effects of N-acetyl-L-cysteine in endotoxemia. *Am J Physiol.* 266(5 Pt 2): H1746-H1754.
- Zhang P, Omaye S. (2000). Beta-carotene and protein oxidation: effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Toxicology.* 146: 37-47.
- Zheng J, Xiao X, Zhang Q, Yu M. (2014). DNA methylation: the pivotal interaction between early-life nutrition and glucose metabolism in later life. *Br J Nutr.* 112(11):1850-7.
- Zingg JM, Azzi A. (2004). Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr Med Chem.* 11: 1113-1133.
- Zunszain PA, Hepgul N, Pariante CM.(2013). Inflammation and depression. *Curr Top Behav Neurosci.* 14:135-51.



7. ANEXO

A. ARTÍCULOS PUBLICADOS

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”.
Mahatma Gandhi (1869-1948). Pensador y político de la India.

“Pensar sin aprender es esfuerzo perdido; aprender sin pensar, peligroso”. Confucio (551-479 a.C.). Pensador chino.

ARTICULO 1

IMPROVEMENT BY SEVERAL ANTIOXIDANTS OF MACROPHAGE FUNCTION IN VITRO

Del Rio, M., Ruedas, G., Medina, S., Victor, V.M., **De la Fuente, M**

Life Sciences.63: 871-881, 1998

Índice de Impacto en 1998: 1,937

Índice de impacto en 2013: 2,296

Índice de Impacto 5 años: 2,538

RESUMEN

Objetivo: Estudiar el efecto *in vitro* de una serie de antioxidantes a diferentes concentraciones en las funciones del proceso fagocítico de macrófagos peritoneales de ratones adultos.

Material y Métodos: Se utilizan células inmunitarias peritoneales de ratones BALB/c adultos (17±3 semanas de edad). Los antioxidantes estudiados y las concentraciones utilizadas son: el ácido ascórbico (AA) (0,005, 0,1 y 1 mM), la vitamina E (VE) (0,005 y 0,01 mM), el glutatión (GSH) (0,5, 2,5 y 5 mM), la N-acetilcisteína (NAC) (0,1, 0,5 y 1 mM) y la tioprolina o ácido tiazolidín carboxílico (TCA) (0,1, 0,5 y 1 mM). Las funciones analizadas son: adherencia a sustrato, migración espontánea y dirigida por un gradiente químico (quimiotaxis), fagocitosis de partículas inertes y niveles de anión superóxido en células no estimuladas y estimuladas con partículas inertes.

Resultados: La movilidad espontánea, la quimiotaxis, la fagocitosis y los niveles de anión superóxido en macrófagos aumentan tras incubar la suspensión peritoneal con todos los antioxidantes y, en general, a todas las concentraciones y especialmente con las más elevadas. La adherencia se aumenta únicamente con el AA y la VE a todas las concentraciones estudiadas, hecho que sucede a tiempos cortos de 10 y 20 minutos de incubación.

Conclusiones: Los antioxidantes estudiados producen una estimulación de los macrófagos peritoneales de ratón en la edad adulta, activando *in vitro* las diferentes etapas del proceso fagocítico que llevan a cabo estas células.

ARTÍCULO 2

SULFUR-CONTAINING ANTIOXIDANTS INCREASE IN VITRO SEVERAL FUNCTIONS OF LYMPHOCYTES FROM MICE

De la Fuente, M., Hernanz, A., Viniegra, S., Miquel J.

Internacional Immunopharmacology 11(6): 661-669. 2011.

Índice de Impacto en 2011: 2,376

Índice de Impacto en 2013: 2,711

Índice de Impacto (5 años): 2,409

RESUMEN

Objetivo: Estudiar el efecto *in vitro* de una serie de antioxidantes sulfurados (antioxidantes tiólicos y generadores de grupos tiólicos), a diferentes concentraciones, en las funciones de linfocitos de ratones de edad adulta.

Material y Métodos: Se utilizan leucocitos mononucleares de ganglios axilares, bazo y timo, así como linfocitos peritoneales de ratones BALB/c adultos (17±3 semanas de edad). Los antioxidantes estudiados y la concentración utilizada en cada uno de ellos han sido: el glutatión (GSH) (0,5, 2,5 y 5 mM), la tioprolina (TP) y la N-acetilcisteína (NAC) (0,1, 0,5 y 1 mM), y la taurina (4, 20 y 40 mM). Los efectos de todas estas concentraciones fueron analizados en la proliferación espontánea y en respuesta al mitógeno concanavalina A (ConA), de los linfocitos de ganglios axilares, bazo y timo. Las concentraciones mayores, de las antes indicadas, fueron utilizadas para estudiar su efecto sobre la viabilidad de esos linfocitos, a lo largo de 72 horas de cultivo, así como en la movilidad espontánea y la dirigida (quimiotaxis) de linfocitos de los tres órganos inmunitarios y del peritoneo. También se estudió el efecto de la mezcla de las concentraciones menores y mayores de NAC y TP en la quimiotaxis de linfocitos del peritoneo. El efecto de las concentraciones mayores de GSH, TP y NAC se analizaron en la adherencia de linfocitos peritoneales incubados de 10 a 60 minutos. Los niveles de GSH intracelulares en linfocitos de los órganos inmunitarios tras incubación durante 3 horas con 5mM de GSH fueron también analizados.

Resultados: Los antioxidantes estimulan la proliferación de los linfocitos de ganglios axilares, bazo y timo, tanto la espontánea como la mediada por Con A, siendo el efecto más significativo con las concentraciones mayores utilizadas, especialmente con las del GSH y apareciendo el bazo como el órgano inmunitario en donde se dan los mayores estímulos. Todos los antioxidantes aumentan significativamente la viabilidad de los linfocitos de los tres órganos inmunocompetentes estudiados, lo que se aprecia para algunos ya desde las 4 h de incubación. La movilidad espontánea y la quimiotaxis son estimuladas significativamente por las concentraciones mayores de todos los antioxidantes. En linfocitos del peritoneo la combinación de NAC y TP a la concentración menor (0,1 mM) y mayor (1 mM) de las estudiadas estimula la quimiotaxis, especialmente con esta última, no produciéndose ningún efecto con las concentraciones menores por separado. La adherencia de linfocitos peritoneales aumentó significativamente a los 10 min de incubación con los antioxidantes.

Conclusiones: Los antioxidantes estudiados estimulan *in vitro* la funcionalidad de los linfocitos de ratones adultos. Parte de ese efecto podría deberse a su capacidad de aumentar la viabilidad de estas células al aumentar los niveles de GSH intracelular.

ARTICULO 3

THE ANTIOXIDANT N-ACETYLCYSTEINE IN VITRO IMPROVES SEVERAL FUNCTIONS OF PERITONEAL LEUKOCYTES FROM OLD MICE APPROACHING THEIR VALUES TO THOSE OF ADULT ANIMALS

De la Fuente, M., Hernanz, A.

Journal of Applied Biomedicine. 10: 79-90.2012.

Índice de Impacto en 2012: 1,933

Índice de Impacto en 2013: 1,775

Índice de Impacto (5 años): 1,964

RESUMEN

Objetivo: Estudiar el efecto *in vitro* de un amplio rango de concentraciones del antioxidante N-acetilcisteína (NAC) en las funciones del proceso fagocítico de los macrófagos, así como en las funciones que comparten con los linfocitos, la adherencia y la quimiotaxis, en células peritoneales procedentes de ratones cronológicamente viejos, y comprobar si la presencia de NAC aproxima los valores de tales funciones a los obtenidos en células controles de ratones adultos.

Material y Métodos: Se utilizan células inmunitarias peritoneales de ratones BALB/c viejos (78±2 semanas de edad) y adultos (18±2 semanas) como controles de edad. Las concentraciones de NAC que se han estudiado *in vitro* han sido 0.001, 0,01, 0,1, 1 y 2,5 mM, y las funciones analizadas fueron la adherencia a sustrato y la movilidad dirigida por un gradiente químico (quimiotaxis) en macrófagos y linfocitos. En los macrófagos además se han completado las funciones del proceso fagocítico, esto es, la fagocitosis de partículas inertes (tanto el índice de fagocitosis como la eficacia fagocítica) y los niveles de anión superóxido (tanto en leucocitos no estimulados como estimulados con partículas inertes), indicadores de la capacidad digestiva.

Resultados: Las funciones estudiadas se encuentran deterioradas en las células inmunitarias peritoneales de los ratones viejos, con mayores capacidades de adherencia y menores de quimiotaxis y fagocitosis, en comparación con las mismas en los animales adultos. La presencia de NAC disminuye la adherencia en macrófagos y en linfocitos, con las concentraciones mayores estudiadas (0,1 mM a 2,5 mM) y a los tiempos cortos de incubación. Este antioxidante estimula la quimiotaxis en macrófagos con todas las concentraciones de NAC, a excepción de la menor estudiada, y la capacidad de fagocitosis en las células de los animales viejos con las concentraciones de 0,01 a 1 mM, especialmente con esta última. En todos los casos los valores se aproximan a los que muestran las células de animales adultos. NAC aumenta los niveles de anión superóxido a las concentraciones de 0,1 y 1 mM, pero no modifica los niveles de quimiotaxis en los linfocitos peritoneales.

Conclusiones: La NAC produce una mejoría de las diferentes etapas del proceso fagocítico de los macrófagos y de la adherencia de los linfocitos peritoneales de ratones viejos, asemejando, en general, los valores de las funciones estudiadas a los que presentan las células de animales adultos.

ARTICULO 4

AN UPDATE OF THE OXIDATION-INFLAMMATION THEORY OF AGING. THE INVOLVEMENT OF THE IMMUNE SYSTEM IN *OXI-INFLAMM-AGING*

De la Fuente, M., Miquel, J.

Current Pharmaceutical Design. 15: 3003-3026, 2009

Índice de impacto en 2009: 4,414

Índice de Impacto en 2013: 3,288

Índice de Impacto (5 años): 3,931

RESUMEN

Objetivo: Estudiar el efecto *in vitro* de dos antioxidantes sulfurados, el glutatión y la tioprolina, en funciones, como la movilidad y la respuesta proliferativa, de linfocitos de ratones viejos, y comprobar si la presencia de esos antioxidantes podría asemejar las funciones estudiadas, las cuales se deterioran al envejecer, a como se encuentran en células de animales adultos.

Material y Métodos: Se utilizan leucocitos de ganglios axilares, bazo y timo de ratones Swiss viejos (82±2 semanas de edad) y adultos (22±2 semanas). Las funciones analizadas han sido: la migración, tanto espontánea como dirigida por un gradiente químico (quimiotaxis), y la respuesta proliferativa de linfocitos al mitógeno concanavalina A (ConA), y los antioxidantes estudiados y las concentraciones utilizadas *in vitro* en las células de los animales viejos han sido: glutatión (GSH) (5 mM) y la tioprolina (TP) (1 mM). La viabilidad de los linfocitos de los tres órganos inmunocompetentes a lo largo de 72 horas de cultivo, en presencia de los antioxidantes fue también estudiada en las células de los ratones viejos.

Resultados: La movilidad espontánea, la quimiotaxis y la respuesta proliferativa al mitógeno ConA de los linfocitos de ganglios axilares, bazo y timo de ratones viejos se encuentra significativamente disminuida respecto a los valores obtenidos en esas funciones en los animales adultos. La presencia de GSH y de TP, a las concentraciones estudiadas de 5 y 1 mM, respectivamente, estimula todas las funciones estudiadas, aproximando sus valores a los obtenidos en adultos. Esos valores se igualan a los mismos en el caso de la movilidad espontánea de bazo y timo, así como en la respuesta proliferativa de bazo (en el caso del GSH) y de timo (con los dos antioxidantes), superando los valores de adultos en el caso de la TP en leucocitos de bazo. Tanto el GSH como la TP estimulan significativamente la viabilidad de los leucocitos de bazo y timo desde las 4 horas de cultivo y la de los de ganglios desde las 48 horas. El GSH lo hace prácticamente en todos los órganos desde la primera hora de cultivo.

Conclusiones: Los antioxidantes GSH y TP estimulan *in vitro* funciones relevantes (movilidad y proliferación) de los linfocitos de tres órganos inmunocompetentes como el timo, el bazo y los ganglios axilares, obtenidos de ratones cronológicamente viejos, funciones que se encuentran deterioradas respecto a las mismas en los animales adultos. La presencia de los antioxidantes asemeja los valores de dichas funciones a los propios de animales adultos. Una posible vía de actuación de los antioxidantes podría ser el mejor mantenimiento de la viabilidad de las células en cultivo.

ARTICULO 5

EFFECT IN VITRO OF SEVERAL ANTIOXIDANTS ON THE NATURAL KILLER FUNCTION OF AGING MICE

Fernández M.D., Correa, R., Del Rio, M., De la Fuente, M.

Experimental Gerontology.34: 675-685, 1999

Índice de Impacto en 1999: 1,762

Índice de Impacto en 2013: 3,529

Índice de Impacto (5 años): 3,797

RESUMEN

Objetivo: Estudiar el efecto *in vitro* de una serie de antioxidantes en una función tan relevante como lo es la actividad *natural killer* (NK) frente a células tumorales, de leucocitos de ratones de diferentes edades: jóvenes, adultos, maduros y viejos.

Material y Métodos: Se utilizan leucocitos mononucleares de ganglios axilares, bazo, timo y peritoneo de ratones BALB/c jóvenes (8 ± 2 semanas de edad), adultos (24 ± 2 semanas), maduros (48 ± 2 semanas) y viejos (72 ± 2 semanas). Los antioxidantes estudiados y la concentración utilizada en cada uno de ellos han sido: la vitamina E (VE) (0,005 mM), el ácido ascórbico (AA) (0,005 mM), la N-acetilcisteína (NAC) (1 mM) y la tioprolina (1 mM). La actividad citotóxica NK ha sido estudiada frente a una línea tumoral murina (YAC-1) mediante la valoración de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en el sobrenadante de los cultivos de las células mononucleares y las tumorales, tras 4 horas de incubación en presencia de los antioxidantes.

Resultados: La actividad NK de los leucocitos se encuentra más activada en células de ratones adultos, estando, en general, las de los animales mayores, pero también las de los jóvenes, con valores menores de esta actividad. Los antioxidantes estimulan la actividad NK en las células procedentes de las diferentes localizaciones, siendo el timo donde realizan más efecto y el peritoneo donde menos, y a todas las edades estudiadas, aunque no se alcanzan diferencias estadísticamente significativas en algunos casos.

Conclusiones: Los antioxidantes estudiados producen una estimulación de la actividad antitumoral NK, lo que es muy relevante, especialmente en la vejez, momento en el que esta capacidad se encuentra muy disminuida y en la que se presenta una mayor incidencia de neoplasias.

ARTICULO 6

CHANGES IN MACROPHAGE AND LYMPHOCYTE FUNCTIONS IN GUINEA-PIGS AFTER DIFFERENT AMOUNTS OF VITAMIN E INGESTION

De la Fuente, M., Carazo, M., Correa, R., Del Rio, M.

British Journal of Nutrition 84:25-29, 2000

Índice de Impacto en 2000: 2,415

Índice de impacto en 2013: 3,342

Índice de Impacto (5 años): 3,235

RESUMEN

Objetivo: Comprobar el efecto que la ingestión, durante 5 semanas, de una dieta con diferentes cantidades de vitamina E (bajas, medias, altas) produce en varias funciones de macrófagos y linfocitos de cobayas jóvenes.

Material y Métodos: Se utilizaron 21 cobayas jóvenes (de 8 semanas de edad) que fueron distribuidas en tres grupos. Uno recibió una dieta con 15 mg/kg de vitamina E (baja), otro de 150 mg/kg de vitamina E (media, usada como control) y otro 1500 mg/kg de vitamina E (alta) durante 5 semanas. En macrófagos obtenidos del peritoneo se estudiaron diversas funciones del proceso fagocítico (quimiotaxis, ingestión de partículas y niveles de anión superóxido). En linfocitos se analizaron la capacidad de quimiotaxis (en los peritoneales) y la proliferación, tanto espontánea como en respuesta a fitohemaglutinina (PHA), en los linfocitos de bazo.

Resultados: Con respecto a la dieta con 150 mg/kg de vitamina E (la media), utilizada como control, la dieta con dosis baja de vitamina E produjo una disminución de la quimiotaxis y de los niveles de anión superóxido y un aumento de la fagocitosis en macrófagos. Por su parte, con la dosis alta se obtuvo un aumento de la quimiotaxis de macrófagos y de la respuesta linfoproliferativa a la PHA. La dieta con alta cantidad de vitamina E, respecto a la de baja cantidad estimuló la quimiotaxis de macrófagos y linfocitos, los niveles de anión superóxido y la proliferación de los linfocitos.

Conclusiones: Una dieta suplementada con niveles mayores que los habituales de vitamina E parece ser beneficiosa para las funciones inmunológicas en animales jóvenes.

ARTICULO 7

CHANGES IN SEVERAL FUNCTIONS OF MURINE PERITONEAL MACROPHAGES BY N-ACETYLCYSTEINE AND THIOPROLINE INGESTION. COMPARATIVE EFFECT BETWEEN TWO STRAINS OF MICE

Blanco, B., Ferrández, M.D., Correa, R., Del Rio, M., Guaza, C., Hernanz, A., **De la Fuente, M**

BioFactors 10: 179-185, 1999.

Índice de Impacto en 1999 (1995): 2,611

Índice de Impacto en 2013: 3,00

Índice de Impacto (5 años): 3,03

RESUMEN

Objetivo: Estudiar el efecto de la ingestión de una dieta suplementada con dos antioxidantes como la N-acetilcisteína (NAC) y la tioprolina (TP), durante 5 semanas en diversas funciones de macrófagos de ratones adultos de dos cepas, una singénica como es la BALB/c y otra no singénica, la OF1-Swiss.

Material y Métodos: Se han utilizado ratones Swiss y BALB/c adultos (28 semanas de edad) que habían ingerido durante 5 semanas una dieta suplementada conjuntamente con N-acetilcisteína (NAC) y tioprolina (TP) al 0,1% p/p de cada uno de ellos. En la suspensión peritoneal de estos animales se han estudiado diferentes funciones del proceso fagocítico (adherencia a sustratos, movilidad dirigida por un gradiente químico o quimiotaxis, ingestión de partículas inertes y niveles de anión superóxido) así como la liberación de la citoquina IL-1 β .

Resultados: La dieta suplementada con NAC+TP aumenta todas las funciones estudiadas con excepción de los niveles de anión superóxido, los cuales disminuyeron. Estos efectos fueron más relevantes en los macrófagos de ratones Swiss que de BALB/c. En los macrófagos de esta cepa BALB/c no se encontraron diferencias en la adherencia y en los niveles de anión superóxido y los aumentos de la capacidad de fagocitosis y en la liberación de IL-1 β fueron menores que en la otra cepa.

Conclusiones: La capacidad funcional de los macrófagos peritoneales de ratones adultos puede estimularse con la ingestión de una dieta suplementada con antioxidantes como la NAC y TP a la dosis de 0,1%, especialmente en la cepa Swiss.

ARTICULO 8

THE AMOUNT OF THIOLIC ANTIOXIDANT INGESTION NEEDED TO IMPROVE THE IMMUNE FUNCTIONS IS HIGHER IN AGED THAN IN ADULT MICE

De la Fuente, M., Miquel, J., Catalán, M.P., Victor, V.M., Guayerbas, N.

Free Radical Research 36: 119-126. 2002

Índice de Impacto en 2002: 2,523

Índice de Impacto en 2013: 2,989

Índice de Impacto (5 años): 2,833

RESUMEN

Objetivo: Comprobar el efecto de la ingestión durante 4 semanas de una dieta suplementada con dos diferentes cantidades (0,1% p/p y 0,3% p/p) de dos antioxidantes como la tioprolina (TP) y la N-acetilcisteína (NAC), sobre diferentes funciones de macrófagos y linfocitos de ratones adultos y viejos.

Material y Métodos: Se han utilizado ratones hembras de la cepa Swiss adultas (33±1 semana de edad) y viejas (75±1 semana de edad). En ambas edades los animales se dividieron en dos grupos, uno recibió una dieta suplementada con TP + NAC (0,1% p/p de cada uno de los antioxidantes) durante 4 semanas previas a la obtención de los leucocitos. Otro grupo ingirió durante el mismo tiempo una dieta suplementada con 0,3 % p/p de TP+NAC. Las funciones estudiadas fueron, en macrófagos peritoneales la capacidad de adherencia, de quimiotaxis, de fagocitosis y de digestión (niveles de anión superóxido intracelulares), así como la liberación de radicales libres (superóxido extracelular). En linfocitos del peritoneo se estudió la capacidad de adherencia y de quimiotaxis, y en los de ganglios axilares, bazo y timo, la quimiotaxis y la respuesta proliferativa al mitógeno concanavalina A (Con A). En leucocitos de ganglios axilares, bazo y timo se analizó la actividad "natural killer" (NK).

Resultados: La ingestión de 0,1 % de los antioxidantes en los animales adultos estimuló una serie de funciones como la quimiotaxis de macrófagos y linfocitos, la fagocitosis y la capacidad digestiva de macrófagos, la respuesta linfoproliferativa al mitógeno Con A y la actividad NK. Además, no hubo cambios en la adherencia y el anión superóxido extracelular disminuyó. Por el contrario el suplemento de la dieta con esta cantidad de antioxidantes en los animales viejos no modificó las funciones inmunitarias estudiadas, con la excepción de la actividad NK que fue estimulada. La ingestión de 0,3 % de los antioxidantes en ratones adultos sólo aumentó funciones como la adherencia o los niveles de anión superóxido, las cuales son marcadores de oxidación, mientras que otras funciones como la quimiotaxis o la respuesta linfoproliferativa disminuyeron. No obstante, la ingestión de estas mayores cantidades de antioxidantes por los animales viejos aumentó la fagocitosis, la actividad NK y especialmente la respuesta proliferativa a Con A, funciones muy deprimidas en la vejez.

Conclusiones: Las cantidades de antioxidantes que se pueden ingerir con la dieta para mejorar la función inmunitaria son más elevadas en la vejez que en la edad adulta, posiblemente debido al mayor estrés oxidativo que hay en el envejecimiento y que subyace en la inmunosenescencia.

ARTICULO 9

ENHANCEMENT OF LEUKOCYTE FUNCTIONS IN AGED MICE SUPPLEMENTED WITH THE ANTIOXIDANT THIOPROLINE

De la Fuente, M., Ferrández, M.D., Del Rio, M., Burgos, M.S., Miquel, J.

Mechanisms of Ageing and Development 104: 213-225, 1998.

Índice de Impacto en 1998:1,583

Índice de impacto en 2013: 3,510

Índice de Impacto (5 años): 4,022

RESUMEN

Objetivo: Comprobar si suplementar la dieta con el antioxidante tioprolina durante 5 semanas puede mejorar una serie de funciones de los leucocitos en ratones viejos de la cepa Swiss, así como disminuir el estrés propio de la vejez. El planteamiento se hizo en base a que en un trabajo previo se había comprobado que la ingestión de una dieta suplementada con ese antioxidante durante 37 semanas estimulaba diversas funciones de linfocitos en ratones viejos.

Material y Métodos: Se han utilizado ratones hembras Swiss viejas (81 ± 2 semanas, 20 meses, de edad), los cuales ingirieron durante 5 semanas una dieta suplementada con el antioxidante tioprolina (0,07% p/p). En paralelo se han utilizado ratones del mismo sexo y cepa adultos (con 52 ± 1 semanas, 12 meses, de edad). En los leucocitos de bazo y timo, se ha estudiado la movilidad espontánea y la dirigida (quimiotaxis), la capacidad linfoproliferativa al mitógeno Concanavalina A, así como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la actividad NK. También se analizaron los niveles de corticosterona sérica en estos animales.

Resultados: Todas las funciones estudiadas se encontraban disminuidas en lo leucocitos de animales viejos en relación a los adultos. La ingestión de tioprolina durante 5 semanas estimuló significativamente todas esas funciones, acercando sus valores a los de las mismas en los ratones adultos, siendo similares a estos en el caso de la movilidad espontánea de timo y en la ADCC de bazo. La corticosterona sérica se encuentra elevada en los animales viejos en relación a los adultos y disminuye significativamente tras la ingestión de la dieta suplementada con tioprolina.

Conclusiones: La ingestión durante 5 semanas de una dieta suplementada con tioprolina estimula varias funciones de leucocitos que se encuentran deterioradas en ratones viejos, acercándolas a los valores de las mismas en adultos. Esta mejoría funcional a nivel inmunitario se relaciona con una disminución del grado de estrés emocional típico de la vejez, al presentar los animales suplementados niveles menores de corticosterona sérica.

ARTICULO 10

RELATION BETWEEN EXPLORATORY ACTIVITY AND IMMUNE FUNCTION IN AGED MICE. A PRELIMINARY STUDY

De la Fuente, M., Miñano, M., Victor, V.M., Del Rio, M., Ferrández, M.D., Díez, A., J. Miquel.

Mechanisms of Ageing and Development 102: 263-277, 1998.

Índice de Impacto en 1998: 1,583

Índice de impacto en 2013: 3,510

Índice de Impacto (5 años): 4,022

RESUMEN

Objetivo: Previos estudios habían mostrado que la rápida exploración de un laberinto en T por ratones maduros podía dar una idea de la longevidad que alcanzarán los mismos. En base a la comunicación que existe entre el sistema nervioso y el inmunitario, a la influencia que ambos tienen en el envejecimiento del organismo y al deterioro que experimentan al avanzar la edad, en el presente trabajo se planteó estudiar de forma comparativa la respuesta conductual de exploración del laberinto en T y diferentes funciones de las tres células inmunitarias más representativas, los macrófagos, los linfocitos y las *natural killer* (NK) en animales viejos.

Material y Métodos: Se han utilizado ratones hembras Swiss viejas (76±1 semana de edad). Los animales, a los 11 meses de edad y de forma individual, realizaron la prueba exploratoria del laberinto en T, una vez por semana y cada dos semanas, durante cuatro veces. Al finalizar ese periodo los animales se dividen en dos grupos, uno con un 100% de animales que han completado todas las veces el recorrido del brazo largo del laberinto en 20 segundos o menos, son los denominados “rápidos”. Otro grupo constituido por animales que en todas las pruebas han efectuado el recorrido de dicho brazo en más de 20 segundos, los cuales son denominados “lentos”. Una vez clasificados fueron sacrificados y se obtuvo la suspensión peritoneal, así como los ganglios axilares, el bazo y el timo. Las funciones inmunitarias estudiadas fueron, en macrófagos y linfocitos peritoneales la adherencia, la movilidad espontánea y dirigida (quimiotaxis), la ingestión de partículas por los macrófagos y los niveles de anión superóxido; en los leucocitos de los órganos se analizaron la movilidad, la respuesta linfoproliferativa al mitógeno concanavalina A y la actividad NK.

Resultados: Las funciones inmunitarias estudiadas estaban más estimuladas en los ratones “rápidos” que en los “lentos” de su misma edad, llegando en muchas de ellas a diferencias estadísticamente significativas.

Conclusiones: Ratones del mismo sexo y con la misma edad, que realizan de forma diferente la prueba exploratoria del laberinto en T, muestran un diferente estado inmunitario. Los ratones “lentos” se proponen como un modelo de inmunosenescencia prematura en ratones.

ARTICULO 11

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 A DIETARY SUPPLEMENTATION WITH SULPHUR-CONTAINING ANTIOXIDANTS

De la Fuente, M.

Proceedings of Nutrition Society 69: 651-659, 2010

Índice de impacto en 2010: 3,925

Índice de Impacto en 2013: 4,937

Índice de Impacto (5 años): 3,925

RESUMEN

Objetivo: En estudios previos se había observado que ratones adultos, pero prematuramente envejecidos, los cuales mostraban una inmunosenescencia, mejoraban varias funciones de los linfocitos tras la ingestión de una dieta enriquecida en dos antioxidantes que aumentan los niveles de glutatión, la tioprolina (TP) y la N-acetilcisteína (NAC). Esto tenía lugar tanto en ratones de la cepa Swiss como BALB/c, pero los efectos fueron mayores en la primera. En el presente trabajo se ha querido estudiar si esa misma dieta suplementada con TP+NAC podría mejorar la funcionalidad de linfocitos en ratones prematuramente envejecidos, pero cronológicamente viejos, de ambas cepas, y si se podrían recuperar los valores funcionales propios de la edad adulta.

Material y Métodos: Ratones hembras de la cepa Swiss y de la cepa BALB/c cronológicamente viejos (76±2 semanas de vida) fueron utilizados, habiendo sido previamente clasificados en prematuramente envejecidos (PAM) y no prematuramente envejecidos (NPAM). Los ratones viejos PAM y NPAM de ambas cepas ingirieron durante 5 semanas antes del sacrificio una dieta enriquecida con tioprolina (TP) y N-acetilcisteína (NAC) (0,1% p/p de cada antioxidante), son los PAMA y NPAMA, o bien una dieta estandar de mantenimiento, son los controles (PAMC y NPAMC). Un grupo de ratones de ambas cepas de edad adulta (24±2 semanas) fueron utilizados como controles de edad. Se estudiaron en linfocitos de ganglios axilares, bazo y timo las siguientes funciones: la capacidad de movilidad dirigida o quimiotaxis, la respuesta linfoproliferativa, tanto espontánea como frente al mitógeno concanavalina A, la actividad NK y la liberación de interleuquina-2 (IL-2).

Resultados: Los ratones viejos manifiestan una mayor inmunosenescencia que los adultos, y los PAM están aún más envejecidos inmunológicamente que los NPAM. La ingestión de la dieta suplementada con TP+NAC mejoró significativamente las funciones tanto en NPAM como especialmente en PAM, acercando los valores de las funciones estudiadas a los de los adultos. Estos efectos se apreciaron en las dos cepas, siendo más significativos para unas funciones en la Swiss y para otras en la BAB/c.

Conclusiones: La ingestión de una dieta durante 5 semanas suplementada con antioxidantes que son precursores del glutatión, como la NAC y la TP, restaura la deteriorada función linfoide de ratones cronológicamente viejos, tanto en los prematuramente envejecidos como los que no lo están y tanto en ratones de la cepa Swiss como de la BAB/c, acercándola a los valores de animales adultos.

ARTICULO 12

IMPROVEMENT OF LEUCOCYTE FUNCTIONS IN MATURE AND OLD MICE AFTER 15 AND 30 WEEKS OF DIET SUPPLEMENTATION WITH POLYPHENOLS-RICH BISCUITS

De la Fuente, M., Medina, S., Baeza, I., Jimenez, L

European Journal of Nutrition 50 (7): 563-573. 2011.

Índice de Impacto en 2011: 2,75

Índice de Impacto en 2013: 3,840

Índice de Impacto (5 años): 3,185

RESUMEN

Objetivo: Comprobar el efecto de una dieta suplementada con cuatro tipos de galletas elaboradas con cereales ricos en polifenoles e ingerida durante 15 y 30 semanas sobre la capacidad funcional de leucocitos peritoneales de ratones maduros y viejos, respectivamente.

Material y Métodos: Se han usado 5 grupos de ratones hembras ICR (CD-1), cuatro de ellos recibieron una dieta con un 20% de cuatro diferentes tipos de galletas hechas de fracciones de cereales ricos en polifenoles y denominadas CO49, CO50, CO52 y CO53. El quinto grupo recibió una dieta estándar (control). Tras 15 y 30 semanas de ingerir esas dietas, cuando los animales eran maduros (49 ± 2 semanas de edad) y viejos (64 ± 2 semanas), respectivamente, sin sacrificar a los animales, se obtuvo la suspensión peritoneal y en sus leucocitos se analizaron las siguientes funciones: adherencia y quimiotaxis de macrófagos y linfocitos, fagocitosis de partículas inertes por macrófagos, capacidad digestiva (niveles intracelulares de anión superóxido), respuesta linfoproliferativa en cultivo con los mitógenos concanavalina A (con A) y lipopolisacárido (LPS) bacteriano, así como la secreción de interleuquina 2 (IL-2) y de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), respectivamente en dichos cultivos. La actividad antitumoral natural killer (NK) también fue estudiada.

Resultados: Las dietas suplementadas con los cuatro tipos de galletas con cereales ricos en polifenoles, en general, aumentan las funciones que disminuyen con la edad como la quimiotaxis, la fagocitosis, los niveles de anión superóxido intracelular, la respuesta linfoproliferativa a mitógenos, la IL-2 y la actividad NK. Aquellas funciones que aumentan al envejecer fueron, sin embargo, disminuidas tras la ingestión de las dietas, como sucede con la adherencia y la liberación de TNF- α . Estos efectos se manifiestan tras 15 semanas de ingestión de las dietas, pero las 30 semanas fue, para algunas funciones, un periodo más efectivo.

Conclusiones: La ingestión de dietas enriquecidas en antioxidantes polifenólicos modulan la función inmunitaria en el envejecimiento, mejorándola significativamente. Como los parámetros analizados son marcadores de salud y longevidad, el ingerir cantidades apropiadas de polifenoles en la dieta podría ser un sistema apropiado para mantener una buena salud en la vejez.

ARTICULO 13

IMMUNE FUNCTION IN AGED WOMEN IS IMPROVED BY INGESTION OF VITAMINS C AND E

De la Fuente, M., Ferrández, M.D., Burgos, M.S. Soler, A., Prieto, A., Miquel, J.

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 76: 373-380, 1998

Índice de Impacto en 1998: 1,175

Índice de Impacto en 2013: 1,55

Índice de Impacto (5 años): 1,65

RESUMEN

Objetivo: Comprobar si en mujeres mayores, tanto sanas como con patologías relacionadas con la edad, la ingestión de un suplemento de vitamina C conjuntamente con vitamina E puede mejorar la funcionalidad de sus células inmunitarias, así como disminuir su estado oxidativo y el estrés emocional.

Material y Métodos: Se han estudiado 30 mujeres de 72 ± 6 años de edad, 10 sanas, 10 con depresión y 10 con un enfermedad coronaria, las cuales ingirieron durante 4 meses un suplemento de 1000 mg/día de vitamina C y 200 mg/día de vitamina E. Antes de iniciar ese suplemento y al finalizar el mismo se extrajo sangre periférica y se analizaron los siguientes parámetros: los niveles de peroxidación lipídica (malondialdehído) y cortisol en suero, la adherencia a endotelio, la quimiotaxis, la fagocitosis y los niveles de anión superóxido de neutrófilos, así como la capacidad de proliferación, tanto basal como al mitógeno fitohemaglutinina (PHA), de los linfocitos.

Resultados: La ingestión del suplemento de vitaminas durante esos cuatro meses produjo en los neutrófilos una estimulación de las funciones estudiadas y una disminución en sus niveles de anión superóxido, y en los linfocitos un aumento de su capacidad de proliferación. También, la toma de vitamina C y E se siguió de una disminución de los niveles de malondialdehído y de cortisol. Esto se dio tanto en las mujeres sanas como, especialmente, en las que presentaban una patología, las cuales parten de una peor función inmunitaria, mayor peroxidación y niveles de cortisol.

Conclusiones: La ingestión de antioxidantes como las vitaminas C y E por mujeres con una edad media de 72 años permite mejorar su función inmunitaria y disminuir su estrés oxidativo y emocional. Esos efectos son mayores en aquellas que se encuentran peor en los aspectos analizados por presentar alguna patología. Por ello la toma, al menos durante 4 meses, de estos antioxidantes puede mejorar la salud y servir de prevención para enfermedades muy frecuentes en la vejez.

ARTICULO 14

VITAMIN E INGESTION IMPROVES SEVERAL IMMUNE FUNCTIONS IN ELDERLY MEN AND WOMEN

De la Fuente, M., Guayerbas, N., Victor, VM., Hernanz, A., Arnalich F

Free Radical Research. 42: 272-280, 2008.

Índice de Impacto en 2008: 2,826

Índice de Impacto en 2013: 2,989

Índice de Impacto (5 años): 2,833

RESUMEN

Objetivo: Comprobar si en personas mayores, tanto hombres como mujeres, funciones relevantes de las células inmunitarias de sangre periférica como neutrófilos, linfocitos y células NK, se encuentran deterioradas respecto a personas adultas, y si tomar un suplemento de vitamina E durante 3 meses puede mejorar dichas funciones, asemejándolas a como se encuentran en personas adultas. También se quiso comprobar si 6 meses después de finalizar el periodo de la toma del suplemento se seguían manteniendo los efectos de la misma en las funciones estudiadas.

Material y Métodos: Se ha estudiado un grupo de 33 personas (15 hombres y 18 mujeres) de $70,4 \pm 5,1$ años de edad. Este grupo experimental ingirió un suplemento de vitamina E de 200 mg/día, durante 3 meses. Antes de iniciar la toma del suplemento, a los 3 meses (cuando finalizó la misma) y 6 meses después (sin ingerir suplemento vitamínico), se recogieron muestras de sangre periférica en las que se analizó la capacidad de adherencia de los polimorfonucleares neutrófilos y los mononucleares. Posteriormente se aislaron estas células inmunitarias estudiándose en las mismas la capacidad de quimiotaxis, fagocitosis de partículas inertes y los niveles de anión superóxido en los neutrófilos, y la quimiotaxis, la respuesta proliferativa al mitógeno fitohemaglutinina (PHA) y la producción de interleuquina 2 (IL-2) en los linfocitos. También se analizó en la fracción de células mononucleares la actividad citotóxica de las células NK frente a una línea de células tumorales humanas. En paralelo, a lo largo del estudio, se analizaron esos mismos parámetros en 30 adultos (15 hombres y 15 mujeres).

Resultados: En hombres y mujeres mayores las funciones inmunitarias estudiadas se encontraban deterioradas respecto a las mismas en personas adultas. La toma durante 3 meses de un suplemento de vitamina E (200 mg/día) mejoró significativamente todos los parámetros funcionales estudiados, tanto en hombres como en mujeres, asemejando los valores de las funciones a las de los adultos. Estos efectos no perduraron tras 6 meses sin la ingestión de suplemento con el antioxidante en algunas de las funciones, pero sí en otras.

Conclusiones: Tomar un suplemento de vitamina E, en una cantidad moderada como es 200 mg/día y durante un periodo de 3 meses, es capaz de mejorar el sistema inmunitario de las personas de setenta años, tanto hombres como mujeres, asemejándolo al que muestran las personas de treinta. Esta mejoría permanece para algunas funciones 6 meses tras la finalización de dicha toma, pero no en todas, por lo que sería recomendable no superar ese tiempo sin ingerir un nuevo suplemento.

ARTICULO 15

VITAMIN C AND VITAMIN C PLUS E IMPROVE THE IMMUNE FUNCTION IN THE ELDERLY

De la Fuente, M., Arnalich F. Hernanz, A.

The Journal of Nutrition, Health & Aging. Enviado.

Índice de Impacto en 2015: 2,996

RESUMEN

Objetivo: Comprobar si en personas mayores, tanto hombres como mujeres, funciones relevantes de las células inmunitarias de sangre periférica como neutrófilos, linfocitos y células NK, que se encuentran deterioradas con respecto a su estado en personas adultas, pueden mejorar tomando un suplemento de vitamina C durante 3 meses y así asemejarse a como se encuentran en adultos. También se quiso comprobar si los efectos en las funciones estudiadas se podrían mantener 6 meses después de finalizar el periodo de la toma del suplemento. Además, comprobar si la ingestión conjunta de vitamina C y de una cantidad de vitamina E, que en un trabajo previo resultó ser beneficiosa en este contexto, producía una mayor mejoría.

Material y Métodos: Se ha estudiado un grupo de 44 personas (24 mujeres y 20 hombres) septuagenarios. Este grupo experimental se dividió en dos, uno de los cuales ingirió un suplemento de vitamina C de 500 mg/día y el otro los 500 mg/día de C y 200 mg/día de vitamina E durante 3 meses. Antes de iniciar la toma de los suplementos, a los 3 meses (cuando finalizó la misma) y 6 meses después (sin ingerir suplemento vitamínico), se recogieron muestras de sangre periférica en las que se analizó la capacidad de adherencia de los polimorfonucleares neutrófilos y los mononucleares. Posteriormente se aislaron estas células inmunitarias estudiándose en las mismas la capacidad de quimiotaxis, fagocitosis de partículas inertes y los niveles de anión superóxido en los neutrófilos, y la quimiotaxis, la respuesta proliferativa al mitógeno fitohemaglutinina (PHA) y la producción de interleuquina 2 (IL-2) en los linfocitos. También se analizó en la fracción de células mononucleares la actividad citotóxica de las células NK frente a una línea de células tumorales humanas. En paralelo, a lo largo del estudio, se analizaron esos mismos parámetros en 30 personas (15 hombres y 15 mujeres) adultas, de treinta años.

Resultados: En hombres y mujeres mayores las funciones inmunitarias estudiadas, las cuales se encontraban deterioradas al comparar con las mismas en personas adultas, mejoraron significativamente, tanto en hombres como en mujeres, tras la ingestión de un suplemento de vitamina C de 500 mg/día durante 3 meses. Estos efectos perduraron tras 6 meses sin tomar el suplemento vitamínico en algunas de las funciones, pero no en otras. El efecto de un suplemento con esa misma cantidad de vitamina C y 200 mg/día de vitamina E durante esos mismos 3 meses supuso también una mejoría de las funciones estudiadas asemejándolas a los valores de las mismas en adultos, pero los efectos fueron similares a los encontrados con la ingestión sólo de vitamina C.

Conclusiones: Tomar un suplemento de vitamina C, o de esta vitamina conjuntamente con la E, en cantidades moderadas y durante un periodo de sólo 3 meses, es capaz de mejorar el sistema inmunitario de las personas mayores, tanto hombres como mujeres, asemejándolo al que muestran los adultos. Esta mejoría permanece para algunas funciones 6 meses tras la finalización de la toma del suplemento. Estos efectos sugieren la utilización de estas suplementaciones en personas mayores para conseguir una longevidad saludable.

B. TRABAJOS DE REVISIÓN

**“La ciencia consiste en sustituir el saber que parecía seguro por una teoría, o sea, por algo problemático”. José Ortega y Gasset (1883-1955).
Filósofo español.**

Los resultados obtenidos en la presente tesis, juntos con otros que forman parte de otras tesis doctorales y de licenciatura realizadas en nuestro grupo de investigación, han permitido llevar a cabo varias revisiones. Se adjuntan a continuación únicamente las publicadas en revistas internacionales con índice de impacto que no recogen datos concretos pertenecientes a otras tesis doctorales del grupo de investigación.

Dos de las revisiones que se incluyen ya han sido recogidas como Artículo 4 y Artículo 11, pero en los apartados correspondientes sólo se han comentado los datos originales que aparecen en el manuscrito. Aquí se indicará lo que aporta en sí cada una de las revisiones.

Las revisiones recogidas son las siguientes:

1. **De la Fuente, M.** “Effects of antioxidants on immune system ageing”. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56: S5-S8. 2002.
2. **De la Fuente, M.** “The immune system as a marker of health and longevity”. *Antiaging Medicine.* 1: 31-41. 2004.
3. Viveros, MP., Arranz, L., Hernanz, A., Miquel, J. and **De la Fuente, M.** “A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence”. *Neuroimmunomodulation.* 14: 157-162. 2007.
4. **De la Fuente, M.** “ Role of neuroimmunomodulation in aging“. *Neuroimmunomodulation.* 15: 213-223. 2008.
5. **De la Fuente, M** and Miquel, J. “An update of the oxidation-inflammation theory of aging. The involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging“. *Current Pharm Design.* 15 (26):3003-3026. 2009.
6. **De la Fuente, M** and Gimenez-Llort, L. “Models of Aging of Neuroimmunomodulation: Strategies for its Improvement”. *Neuroimmunomodulation.* 17 (3): 213-216. 2010.
7. **De la Fuente, M.** “Murine models of premature ageing for the study of diet-induced immune changes. Improvement of leukocyte functions in two strains of old prematurely ageing mice by dietary supplementation with sulphur-containing antioxidants “. *Proc. Nutr. Soc.* 69: 651-659. 2010.
8. **De la Fuente, M.** “The Immune System, a Marker and Modulator of the Rate of Aging”. In: “Immunology of Aging”. Massoud, A., Rezaei, N.(eds). Chapter 2. Pp: 3-23. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014. ISBN 978-3-642-39494-2. ISBN 978-3-642-39495-9 (eBook). DOI 10-1007/978-3-642-39495-9.

REVISIÓN 1

EFFECTS OF ANTIOXIDANTS ON IMMUNE SYSTEM AGEING

De la Fuente, M

European Journal of Clinical Nutrition 56: S5-S8. 2002.

Índice de Impacto en 2002: 1,943

Índice de Impacto en 2013: 2,95

Índice de Impacto (5 años): 2,76

RESUMEN

Se revisan las aportaciones científicas, incluidas las de nuestro grupo de investigación, que apoyan que las funciones inmunitarias, las cuales se deterioran al envejecer como consecuencia del estrés oxidativo (desequilibrio entre la producción de oxidantes y de defensas antioxidantes, a favor de los primeros) que tiene lugar al avanzar la edad, pueden ser preservadas de dicho deterioro por la ingestión de antioxidantes en la dieta. Así, dado que tales funciones inmunitarias son buenos marcadores de salud y esperanza de vida, su adecuado mantenimiento en la vejez mediante una nutrición apropiada en antioxidantes podría tener un papel importante para conseguir un envejecimiento saludable.

REVISIÓN 2

THE IMMUNE SYSTEM AS A MARKER OF HEALTH AND LONGEVITY

De la Fuente, M

Antiaging Medicine. 1: 31-41. 2004.

Índice de Impacto: No tiene

RESUMEN

Se perfila en mayor medida el papel del sistema inmunitario como marcador de salud y predictor de longevidad. Se proponen una serie de funciones de las células inmunitarias como marcadores de “edad biológica”, y se incide en la ingestión de antioxidantes como un sistema eficaz para mejorar la función inmunitaria. Además, en base a resultados obtenidos en ratones, ese “rejuvenecimiento” del sistema inmunitario por los antioxidantes, acompañado de una mayor longevidad, acredita la propuesta de la teoría de la oxidación-inflamación del envejecimiento y el uso de parámetros funcionales leucocitarios como marcadores de salud y esperanza de vida.

Miguel
Hernández

REVISIÓN 3

A MODEL OF PREMATURE AGING IN MICE BASED ON ALTERED STRESS-RELATED BEHAVIORAL RESPONSE AND IMMUNOSENESCENCE

Viveros MP., Arranz, L., Hernanz, A., Miquel J., **De la Fuente, M**

Neuroimmunomodulation 14:157-162. 2007.

Índice de Impacto en 2009: 2,034

Índice de Impacto en 2013: 1,779

Índice de Impacto (5 años): 2,135

RESUMEN

Se revisan la aportaciones hechas por nuestro grupo de investigación en los ratones que llevaban a cabo una prueba exploratoria del laberinto en T de forma “lenta” y que han demostrado que tales animales, ya en la edad joven y adulta, presentan una inmunosenescencia prematura, pero también una conducta y una neuroquímica cerebral típica de animales cronológicamente viejos. Dado el claro envejecimiento prematuro del sistema nervioso e inmunitario y la menor esperanza de vida de estos ratones en comparación con los de su misma edad y sexo que responden de forma “rápida” en el laberinto, se les da la denominación de “Prematurely Aging Mice” (PAM). Se establece así de forma clara un modelo de envejecimiento prematuro que se inició con el trabajo recogido en el artículo nº 10 de la presente tesis (publicado en 1998). En esta revisión también se recogen, en una tabla resumen, además de los parámetros de función inmunitaria que se encuentran envejecidos prematuramente en los PAM respecto a los NPAM (Non Prematurely Aging Mice), los de estrés oxidativo y daño oxidativo a lípidos y ADN. Los PAM muestran niveles de oxidantes y compuestos inflamatorios aumentados y de defensas antioxidantes disminuidos, en comparación con los NPAM, y un mayor daño en sus biomoléculas. Se aporta también en dicha tabla los efectos que dietas con antioxidantes ejerce en todos los parámetros analizados de los PAM, tanto de función inmunitaria como de estrés oxidativo, indicándose cómo tales suplementos en la dieta permiten recuperar la adecuada funcionalidad y homeostasis redox de tales animales, permitiendo un aumento significativo en la esperanza de vida de los mismos. También se aportan datos originales sobre los niveles del antioxidante glutatión (GSH) y del marcador de daño oxidativo a lípidos, el malondialdehído (MDA), en cerebro y bazo de PAM y NPAM machos y hembras, comentándose el mayor estrés oxidativo que presentan los primeros.

REVISIÓN 4

ROLE OF NEUROIMMUNOMODULATION IN AGING

De la Fuente, M

Neuroimmunomodulation. 15: 213-223. 2008.

Índice de Impacto en 2009: 2,034

Índice de Impacto en 2013: 1,779

Índice de Impacto (5 años): 2,135

RESUMEN

Se recoge en esta revisión como el deterioro al envejecer en los sistemas homeostáticos, el sistema nervioso, el endocrino y el inmunitario, y en la comunicación entre ellos (comunicación neuroinmunoendocrina), hace que se vaya perdiendo la capacidad de mantenimiento de la homeostasis, lo que explica el mayor riesgo de morbilidad y mortalidad que tiene lugar con el envejecimiento. Además, se plantea una idea original: la participación del sistema inmunitario en el proceso de envejecimiento. Esto se basa en el aumento de estrés oxidativo que experimentan las células inmunitarias al avanzar la edad, especialmente las fagocíticas (células que se encuentran en todos los animales). Ese aumento de oxidantes puede acelerar el estrés oxidativo de todo el organismo y por tanto el envejecimiento general del mismo. La administración de antioxidantes, al disminuir dicho estrés oxidativo, permite mejorar el funcionamiento del sistema nervioso y del inmunitario y consecuentemente aumentar la esperanza de vida de un individuo.

REVISIÓN 5 = ARTÍCULO 4

AN UPDATE OF THE OXIDATION-INFLAMMATION THEORY OF AGING. INVOLVEMENT OF THE IMMUNE SYSTEM IN THE *OXI-INFLAMM-AGING*

De la Fuente, M., Miquel J

Current Pharmaceutical Design 15 (26):3003-3026. 2009.

Índice de impacto en 2009: 4,414

Índice de Impacto en 2013: 3,288

Índice de Impacto (5 años): 3,931

RESUMEN

En esta revisión se plantea ya perfilada la teoría de la “oxidación–inflamación” del envejecimiento. Según esta teoría el envejecimiento es consecuencia del estrés oxidativo e inflamatorio crónicos (mayores niveles de oxidantes y compuestos inflamatorios que de antioxidantes y antiinflamatorios, siendo la oxidación e inflamación procesos íntimamente relacionados) que tiene lugar en el organismo al envejecer. Este estrés oxidativo e inflamatorio afectará a todas las células, pero de manera especial a las de los sistemas reguladores, el sistema nervioso, el endocrino y el inmunitario y a su comunicación. Por ello, con el paso del tiempo hay un peor mantenimiento de la homeostasis, esto es, de la salud y aparece mayor posibilidades de enfermar y morir. Además, en esta teoría se sugiere que el sistema inmunitario, al tener que producir oxidantes e inflamación para llevar a cabo su trabajo de defensa de lo extraño, puede, si no está bien regulado, a través de la sobre-activación de factores como el factor nuclear de transcripción kappa B (NFkB) (que media la expresión de oxidantes y compuestos inflamatorios) entrar en un círculo vicioso, o mejor espiral viciosa, que aumente el estrés oxidativo e inflamatorio del organismo. Se propone en esta revisión, por primera vez, el término “oxi-inflam-aging” para describir lo que sucede al envejecer, y se explica como la participación del sistema inmunitario en la velocidad de envejecimiento de cada individuo puede ser de aplicación universal. Esto se hace en base a que las células inmunitarias que se activan al envejecer en lo referente a la producción de oxidantes son los fagocitos, los cuales, con diferentes características y denominaciones, se encuentran en todos los animales. Así, se sugiere que el sistema inmunitario pueda ser un instrumento utilizado por la naturaleza para acelerar el envejecimiento y la muerte de todos los individuos de una especie que ya no son útiles al mantenimiento de la misma y están envejecidos. La administración de antioxidantes se plantea como una estrategia que permite regular el estado redox e inflamatorio de las células inmunitarias y de ese modo cortar el círculo vicioso antes mencionado, permitiendo una menor velocidad de envejecimiento y una mayor longevidad saludable.

REVISIÓN 6

MODELS OF AGING OF NEUROIMMUNOMODULATION: STRATEGIES FOR ITS IMPROVEMENT

De la Fuente, M. and Gimenez-Llort, L.

Neuroimmunomodulation. 17 (3): 213-216. 2010

Índice de Impacto en 2010: 2,642

Índice de Impacto en 2013: 1,779

Índice de Impacto (5 años): 2,135

RESUMEN

Se revisan una serie de modelos de envejecimiento prematuro propuestos por nuestro grupo de investigación (individuos con ansiedad, soledad, pérdida de estrógenos,..), y estudiados en población humana y en animales de experimentación, en los que se demuestra la prematura alteración del sistema nervioso (en los animales valorado mediante pruebas de conducta) y del inmunitario y, consecuentemente de su comunicación, así como la presencia de un estrés oxidativo e inflamatorio, lo cual es seguido, en el caso de los ratones, de una temprana mortalidad. Además, se recoge cómo una serie de estrategias de estilo de vida como la ingestión de adecuadas cantidades de antioxidantes, la realización de ejercicio físico moderado y el enriquecimiento ambiental, las cuales mejoran la función y estado redox de las células inmunitarias en esos individuos con envejecimiento prematuro, así como la conducta de los animales de experimentación. Así, se sugiere que tales estrategias pueden hacer más lento el envejecimiento y aumentar su longevidad.

REVISIÓN 7 = ARTÍCULO 11

MURINE MODELS OF PREMATURE AGING FOR THE STUDY OF DIET-INDUCED IMMUNE CHANGES. IMPROVEMENT OF LEUKOCYTE FUNCTIONS IN TWO STRAINS OF OLD PREMATURELY AGEING MICE BY A DIETARY SUPPLEMENTATION WITH SULPHUR-CONTAINING ANTIOXIDANTS.

De la Fuente, M.

Proceedings of Nutrition Society 69: 651-659, 2010

Índice de impacto en 2010: 3,925

Índice de Impacto en 2013: 4,937

Índice de Impacto (5 años): 3,925

RESUMEN

En esta revisión se profundiza y amplía la idea de que una serie de funciones del sistema inmunitario son marcadores de salud, edad biológica y predicen la longevidad de cada individuo. También en que el estrés oxidativo e inflamatorio crónicos son la principal causa del envejecimiento y que el sistema inmunitario participa en la velocidad de envejecimiento. Para demostrarlo están toda una serie de resultados del grupo de investigación en modelos animales de envejecimiento prematuro como: ratas y ratones ovariectomizados (para mimetizar el estado de menopausia por la pérdida de estrógenos), ratas obesas y ratones con ansiedad. Estos últimos, que constituyen el modelo más estudiado, son los PAM ya descritos en otros artículos y revisiones. Los PAM tienen una función inmunitaria, un estado redox y menor esperanza de vida que los NPAM del mismo sexo y edad cronológica. La administración de dietas con suplementadas con antioxidantes mejora el estado redox y la función inmunitaria de los PAM, así como su longevidad.

REVISIÓN 8 = CAPITULO DE LIBRO

THE IMMUNE SYSTEM, A MARKER AND MODULATOR OF THE RATE OF AGING

De la Fuente, M

“Immunology of Aging”. Massoud, A., Rezaei, N.(eds). Chapter 2. Pp: 3-23. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014.

RESUMEN

Se recogen muchas de las ideas y propuestas antes expresadas en otras revisiones, ampliándolas y actualizándolas. Este capítulo podría suponer una síntesis de lo avanzado en nuestro grupo de investigación en los últimos veinte años. Se puede destacar la utilidad de una serie de parámetros inmunitarios como marcadores de edad biológica y la participación del sistema inmunitario en la velocidad de envejecimiento. También la teoría de envejecimiento propuesta, la de oxidación-inflamación y el término “oxi-inflamm-aging” para describir lo que sucede en el organismo al envejecer. En las estrategias de estilo de vida que pueden ser utilizadas para mejorar el sistema inmunitario al envejecer y consecuentemente conseguir un rejuvenecimiento de la edad biológica y una mayor longevidad saludable, se cita a la ingestión de antioxidantes. Esta estrategia, al igual que otras que se indican como la realización de actividad física y el enriquecimiento ambiental, se sugiere que tiene el efecto beneficioso mencionado en base a su capacidad de generar “hormesis”.

IMPROVEMENT BY SEVERAL ANTIOXIDANTS OF MACROPHAGE FUNCTION *IN VITRO*

M. Del Rio, G. Ruedas, S. Medina, V.M. Victor and M. De la Fuente

Department of Animal Physiology, Biology Faculty, Complutense University of Madrid.

(Received in final form June 26, 1998)

Summary

The toxic effects of oxygen radicals produced by immune cells can be controlled to certain degree by endogenous antioxidants, because of their scavenger action. This control is specially important in a type of immune cell, i.e.: the phagocyte, which needs oxygen free radicals and uses antioxidants in order to support its functions. Previous studies have shown an stimulation of the immune system with an antioxidant enriched diet. In the present work, we have studied the effects *in vitro* of several antioxidants: α -tocopherol or vitamin E (VE), ascorbic acid (AA), glutathione (GSH), N-acetylcysteine (NAC) and thioproline or thiazolidine-4-carboxylic acid (TCA), at different concentrations, on the various steps of the phagocytic process of murine peritoneal macrophages, i.e.: adherence to substrate, migration (random migration and directed migration or chemotaxis), ingestion and superoxide anion production. The results show an antioxidant-induced stimulation of the phagocytic process of macrophages. Thus, the adherence to substrate was raised, after short incubation times, by α -tocopherol and ascorbic acid. Random migration, chemotaxis, ingestion and superoxide anion production were increased by all the antioxidants used.

Key Words: macrophage, vitamin antioxidants, thiolic antioxidants, immune response

Immune function is specially linked to the release of oxygen radicals that simultaneously must be eliminated to prevent their harmful effects on DNA, intracellular proteins and membrane lipids. Therefore, immunocompetent cells must have available antioxidant defenses to maintain the oxidant-antioxidant balance. The antioxidant systems are enzymatic (e.g. superoxide dismutases, catalases) and non enzymatic, including tocopherols, thiolic antioxidants and ascorbic acid.

An optimal immune response requires proper levels of reduced-glutathione (GSH), which plays an essential role in biological processes as important as DNA synthesis, enzymatic reactions, neurotransmitter release and carcinogen detoxification (1,2). Moreover, since GSH plays an important role in the protection of proteins and lipoproteins against the attack by oxygen free radicals, a deficit of this thiolic antioxidant or of other thiol group donors, can lead to increased lipid peroxidation reactions, with concomitant changes in membrane permeability and cellular injury (3).

Correspondence to: Prof. M. De la Fuente, PhD. Dept. Biología Animal II (Fisiología Animal). Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense. Av. Complutense s/n, E-28040 Madrid, Spain. FAX 34.1.394.4935. Tel 34.1.3944986.

Regarding the action of GSH on the immune system, the studies reviewed by Meydani (4) show the positive effect of this compound on activation of T cells. Another thiolic antioxidant namely, N-acetylcysteine (NAC) has been studied for its possible protective effects due not only to its antioxidant properties (5) and its role as precursor of intracellular GSH (6), but also to its capacity to prevent cellular death by apoptosis (7) through the inhibition of the transcription factor NF- κ B (8). Moreover, NAC enhances the cytotoxic ability of neutrophils and mononuclear cells (9). Further, the thiolic antioxidant thioproline (thiazolidine-4-carboxylic acid:TCA), can act as intracellular sulfhydryl antioxidant and free radical scavenger (10) protecting cellular membranes from damage due to oxygen-derived reactions. This antioxidant, when administered to old mice, has a favorable effect on lymphocyte functions (11).

On the other hand, the antioxidant vitamins, ascorbic acid (AA) and α -tocopherol (vitamin E, VE), play an important role in the defense against oxidative damage especially in leukocytes, as the immune system has been shown to be more sensitive than others to vitamin deficiencies in the diet (12,4,13,14). The main role of ascorbic acid in the organism is linked to its function as reductor (15) but it also participates in the modulation of complex biochemical pathways which are an essential part of the normal metabolism of immune cells (16,17). The distribution and function of ascorbic acid was investigated in human neutrophils (18). It apparently protects the phagocytes from the oxygen radicals that enter the cytoplasm from the phagosome. Further, secreted ascorbic acid can protect against extracellular free radicals at inflammation sites (19).

Considerable amount of research on the antioxidant properties of vitamin E (see 20 for a review) and its protective effects against oxidative stress has been published in recent years. Vitamin E is an important lipid-soluble, chain-breaking free radical scavenger (21). Its unique location in cellular membranes enhances its efficiency to quench free radicals originating from the mitochondrial inner membrane (22). As first proposed by Tappel (23) and more recently discussed by Bendich (24), AA is probably involved in the regeneration of reduced tocopherol from the tocopheroxyl free radical, which supports the idea that both antioxidants act synergistically protecting membranes against lipid autoxidation and playing a key role in protecting phagocytes from damage by self-generated radicals. Although the immune response is impaired when those antioxidant vitamins are not present in the diet (24), little is known about their effects on immune function apart from the stimulation of the lymphoproliferative response by AA (25,14) and VE (26), and the increased phagocytic activity after VE intake (27).

The *in vitro* studies to determine the direct effects of the antioxidants on immune cells and their possible role as immunomodulators are scarce and narrowly focused. Therefore, the aim of the present work was to study the *in vitro* response to several antioxidants of one important type of immune cell, namely the macrophage. This cell constitutes the first line of immunological defense of the organism against pathogenic agents, and as the most important phagocytic cell in the tissues, it carries out several functions in its phagocytic process, i.e.: adherence to the tissular substrate, migration through the infection focus, ingestion and destruction of foreign agents via different mechanisms such as the oxidative burst associated with the production of superoxide anion. We have studied the effect *in vitro* of several concentration of GSH, NAC, TCA, AA and VE on the above mentioned functions.

Subjects and Methods

Male and female BALB/c mice (*Mus musculus*) 14 to 20 weeks old (IFFA CREDO) were maintained at a constant temperature of $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ on a 12 hour light/dark cycle and fed Sander Mus (PANLAB) and water *ad libitum*. The animals used did not show any sign of malignancy or other pathological processes.

The antioxidants glutathione (GSH), thioproline or thiazolidin carboxylic acid (TCA), N-acetylcysteine (NAC) and α -tocopherol (vitamin E, VE) were purchased from SIGMA, and ascorbic acid (AA) from MERCK. The antioxidants were dissolved in Hank's medium with the exception of VE which was dissolved in phosphate buffer saline (PBS) solution and acetone (1:1). The following products were also obtained from SIGMA, nitroblue tetrazolium (NBT), formylated peptide (fMet-Leu-Phe, FMLP), 1,4-dithioerythritol and latex beads. MIF (migratory inhibitory factor) plates were obtained from STERILING (Teddington, UK). Trypan blue was from MERCK and Diff-quick pack for plate staining from DADE-GRIFOLS. 1,4-dithioerythritol was from BOEHRINGER MANHEIM, sodium acetate from FLUKA and tetrabutylammonium (PIC A reagent) from WATERS. The other chemicals used were from MERCK. Hank's medium was prepared as follows: 5.5 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.8 mM MgH₂PO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 0.4 mM Na₂HPO₄ and 4 mM NaHCO₃, adjusted to pH 7.4.

Mice were sacrificed by cervical dislocation according to the guidelines of the European Community Council Directives 86/6091 EEC. The abdomen was cleansed with 70% ethanol, the abdominal skin carefully dissected without opening the peritoneum, and 4 ml of Hank's medium, injected intraperitoneally. Then, the abdomen was massaged and peritoneal resident cells, containing 40% macrophages and 60% lymphocytes, were removed, allowing the recovery of 90-95% of the injected volume. The macrophages, identified by their morphology and non-specific esterase staining, were counted in Neubauer chambers and their concentration was adjusted in the same medium to 5×10^5 cells/ml. Cellular viability, routinely measured before and after each experiment by the trypan-blue exclusion test, was higher than 95% in all experiments. All incubations were performed at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

For quantification of substrate adherence capacity we determined the adherence to a smooth plastic surface because it resembles adherence to animal tissues (28). The method was carried out as previously described by De la Fuente et al., (29). Aliquots of 200 μ l of peritoneal suspension were placed in eppendorf tubes and 20 μ l of the antioxidants or 20 μ l of Hank's medium (controls) were added. At 10, 20, 30 or 60 min of incubation, aliquots of 10 μ l from each sample were removed after gently shaking to resuspend the sedimented cells, and the number of non-adhered macrophages was determined using Neubauer chambers and optical microscopy. The adherence index was calculated according to the following equation: AI = $(1 - \text{macrophages/ml supernatant} / \text{macrophages/ml original sample}) \times 100$.

Migration was evaluated according to a modification (29) of Boyden's technique (30), which basically consists in the use of chambers with two compartments separated by a filter of 3 μ m of pore diameter. Aliquots of 300 μ l of the peritoneal suspension were deposited in the upper compartment with 30 μ l of the antioxidants or Hank's medium for the controls. In the lower compartment, aliquots of 400 μ l of Hank's medium or the chemoattractant fMet-Leu-Phe at the concentration of 10^{-8} M, were deposited for determination of random migration or chemotaxis, respectively. The chambers were incubated for 3 hours, the filters fixed and stained and the number of macrophages in the lower face of the filter were counted using optical microscopy (immersion objective).

Phagocytosis of inert particles (latex beads 1.09 μ m diluted to 1% in PBS) was carried out, following the method previously described (29), incubating aliquots of 200 μ l of the peritoneal suspension in MIF (migratory inhibitory factor) plates for 30 min. The adhered monolayer was washed with phosphate-buffer saline (PBS) at 37°C, resuspended in 200 μ l of Hank's medium and incubated with latex (1%), as well as with antioxidants. After 30 min of incubation, the plates were washed with PBS, fixed and stained, and the number of latex beads ingested per 100 macrophages was counted by optical microscopy.

The nitroblue tetrazolium (NBT) reduction test, based on an equimolecular reaction between NBT and superoxide anion (31), was carried out for determination of superoxide production according to a method previously described (29). Briefly, aliquots of 250 μ l of peritoneal suspension were mixed with 250 μ l of NBT solution (1mg/ml) and the different concentrations of antioxidants, and aliquots of 50 μ l of latex beads were added to one sample set (stimulated samples) and 50 μ l of Hank's medium to the other set (non-stimulated samples). After 60 min of incubation in a bath at 37°C, the reaction was stopped, and following centrifugation, the supernatants were discarded and the reduced NBT was extracted with dioxan. The absorbance of supernatants was determined in a spectrophotometer at 525 nm. The data obtained were expressed as nmoles of NBT reduced per 10⁶ macrophages by extrapolating from a standard curve of NBT reduced with 1,4-dithioerythritol.

All values are expressed as the mean \pm S.D. of the number of experiments, performed in duplicate, which are indicated in the corresponding tables and figures. The data were statistically evaluated by the Student's t-test for paired parametric data, with a minimum significance level of $p \leq 0.05$.

Results

With regard to the effect of the antioxidants on adherence, which is the first step of the phagocytic process, ascorbic acid (AA) and α -tocopherol (VE) (table I) stimulated this capacity of macrophages at 10 and 20 min of incubation at all concentrations used. With ascorbic acid the results obtained with the highest concentration (1 mM) were significantly different from those with the smallest (0.005 mM) at 10 min ($p < 0.01$) and at 20 min ($p < 0.05$). At 30 min of incubation only the highest concentration stimulated adherence being the results different ($p < 0.01$), from those obtained at other concentrations or on control samples. The two concentrations of α -tocopherol, that only stimulated ($p < 0.01$) early adherence (at 10 and 20 min) with respect to controls, did not show differences between them.

TABLE I
Adherence indexes of murine peritoneal macrophages incubated in presence of ascorbic acid (AA) and α -tocopherol (VE).

Antioxidant (mM)	Incubation time (min)			
	10	20	30	60
0	30 \pm 8	49 \pm 10	61 \pm 8	74 \pm 8
AA (0.005)	41 \pm 9**	61 \pm 9*	62 \pm 6	70 \pm 6
AA (0.1)	45 \pm 8***	64 \pm 7**	63 \pm 8	67 \pm 8
AA (1)	50 \pm 6***	67 \pm 8**	75 \pm 6**	72 \pm 6
VE (0.005)	39 \pm 8**	71 \pm 7**	60 \pm 6	75 \pm 8
VE(0.01)	45 \pm 10**	72 \pm 6**	64 \pm 7	75 \pm 7

Each value is the mean \pm SD of 8 values (AI) corresponding to 8 animals, with each value being the mean of duplicate assays. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ with respect to the corresponding control.

The thiolic antioxidants: GSH, NAC and TCA had no effect on adherence (data not shown). In order to rule out the possibility that the antioxidants attach to the tube surface and attract the macrophages, a group of control tubes was pretreated with the highest concentration of each antioxidant. There were no significant differences between the pretreated and the control tubes.

Random migration and chemotaxis were stimulated by all the antioxidants at every concentration assayed (figs. 1a,b). With regard to the effects of ascorbic acid (AA) (fig. 1a) on random migration the highest concentration used (1 mM) showed significant differences with respect to control ($p < 0.001$) and with respect to the other concentrations used, 0.1 mM ($p < 0.01$) and 0.005 mM ($p < 0.001$). The differences between the results obtained at 0.1 mM with respect to those at 0.005 mM were also highly significant ($p < 0.001$). These two concentrations showed values higher than the control ($p < 0.01$ for 0.1 mM and $p < 0.05$ for 0.005 mM). With regard to chemotaxis, the highest concentrations used, i.e: 1 and 0.1 mM, showed differences both with respect to control ($p < 0.001$), and to the 0.005 mM concentration ($p < 0.001$). This last concentration also showed higher values than the control ($p < 0.05$). Regarding the effects of VE (fig. 1ba), both concentrations (0.005 and 0.01 mM) showed higher values than controls ($p < 0.01$ for random migration and $p < 0.05$ for chemotaxis). For random migration, the 0.005 mM concentration showed higher values than that of 0.01 mM ($p < 0.01$). No differences between concentrations were observed for chemotaxis. At the concentration of 0.005 mM the values for VE were higher than those for AA on random migration ($p < 0.05$) while they did not differ in their effects on chemotaxis.

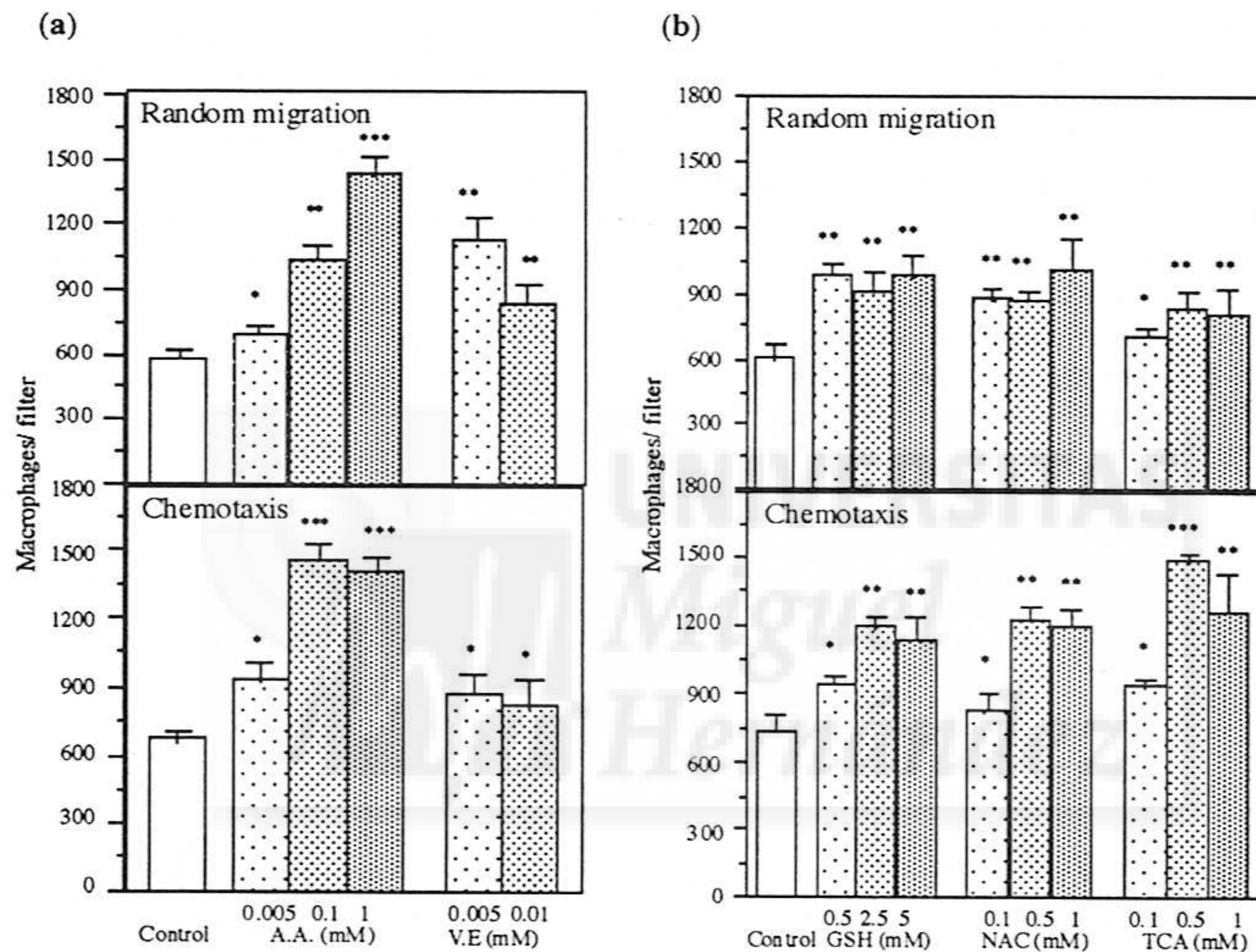


Fig 1

Random migration and chemotaxis indexes of peritoneal macrophages incubated with (a) ascorbic acid (AA) (0.005, 0.1 and 1 mM) and α -tocopherol (VE) (0.005 and 0.01 mM) (b) glutathione (GSH) (0.5, 2.5 and 5 mM), N-acetylcysteine (NAC) (0.1, 0.5 and 1 mM) and thiazolidine-4-carboxylic acid (TCA) (0.1, 0.5 and 1 mM) and with . Each column represents the mean \pm SD of 8 values (macrophages/filter) corresponding to 8 animals, with each value being the mean of duplicate assays. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ with respect to control.

Thiolic antioxidants (fig. 1b) showed significant differences depending on the concentration. With

regard to random migration, all concentration studied of GSH, NAC and TCA showed higher values than the control ($p < 0.01$ for all concentration with exception of the smallest for TCA, with a $p < 0.05$). The effects of the highest concentrations of TCA (0.5 and 1 mM) were different from those of the 0.1 mM concentration ($p < 0.05$). With regard to chemotaxis, the antioxidant values were also significantly higher than those for the control (differences of $p < 0.001$ for 0.5 mM of TCA, of $p < 0.05$ for the smallest concentration of the three antioxidants and of $p < 0.01$ for the rest). The highest concentrations of the three antioxidants showed significant differences with respect to the smallest, which were more evident for NAC and TCA ($p < 0.001$) and less significant ($p < 0.01$) for GSH. At the 0.5 mM concentration the effect of TCA was higher than that for the other thiolic antioxidants ($p < 0.05$ with respect to NAC and $p < 0.001$ with respect to GSH).

The phagocytosis of inert particles (latex beads) was also stimulated by all the antioxidants (figs 2a, b). With regard to the results with AA and VE (fig. 2a), the differences with control values were significant at all concentrations ($p < 0.001$ for 1 mM of AA and $p < 0.01$ for all other concentrations). The highest concentration of AA (1 mM) showed differences ($p < 0.001$) with respect to the other concentrations of this antioxidant. There were no differences between the effects of the two concentrations of VE. At the concentration of 0.005 mM the effect of VE was not different from that of AA. Regarding the response to the thiolic antioxidants (fig. 2b), the highest concentration of TCA, showed significant effects respect to the control ($p < 0.001$), and to the lowest concentrations ($p < 0.001$). The values obtained at the concentrations of 0.5 and 1 mM of NAC, were different with respect to control data ($p < 0.001$), and to the results obtained at the 0.1 mM concentration ($p < 0.001$). The mean concentration of GSH studied i.e.: 2.5 mM, was the most effective, with significant differences with respect to controls ($p < 0.001$), and to the other concentrations, which showed values that were significantly higher ($p < 0.01$ for 5 mM and 0.05 for 0.5 mM) than controls. The concentration of 0.5 mM was less effective than that of 5 mM, with differences ($p < 0.05$) between them. At the 0.5 mM concentration the effect of NAC was significantly ($p < 0.001$) higher than that of the other antioxidants.

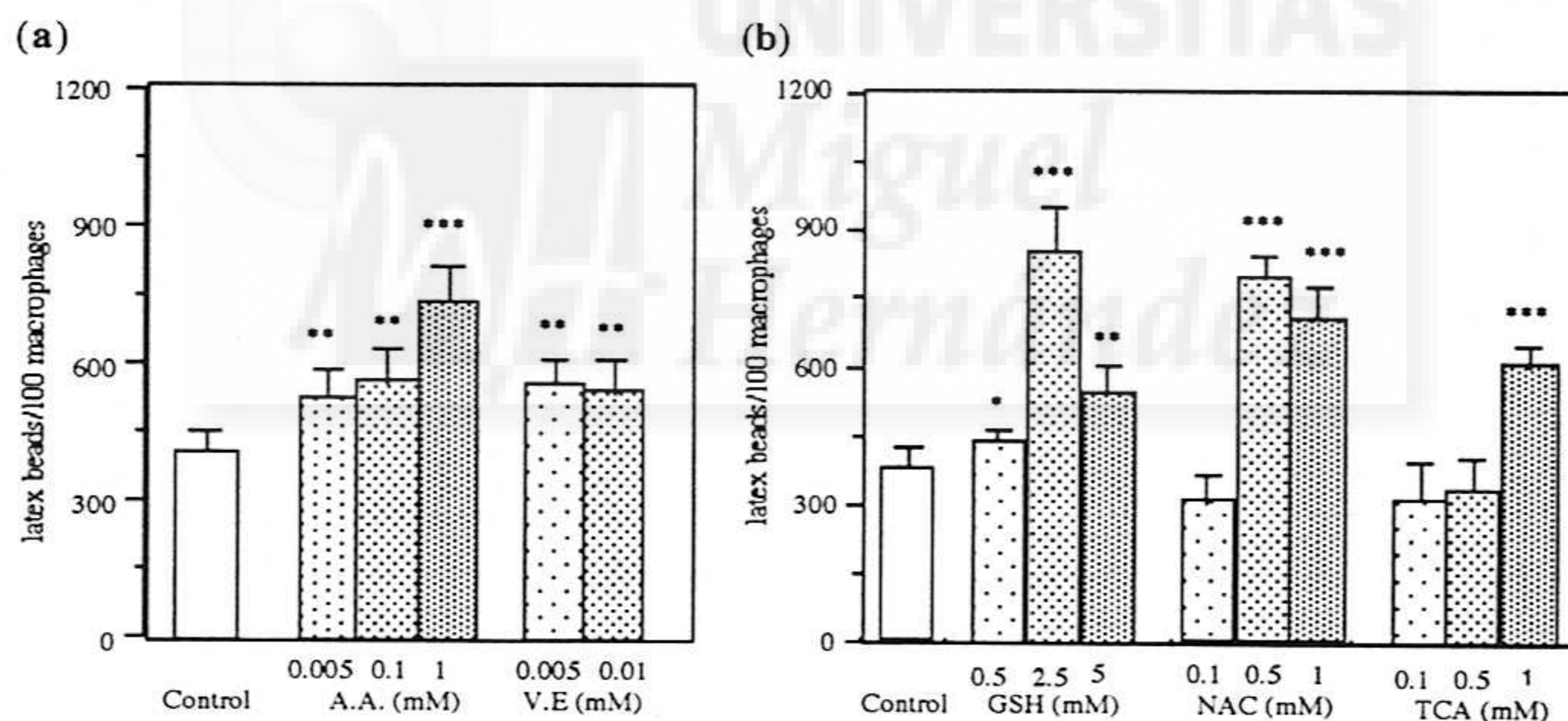


Fig. 2

Phagocytosis of latex beads by peritoneal macrophages incubated with (a) ascorbic acid (AA) (0.005, 0.1 and 1 mM) and α -tocopherol (VE) (0.005 and 0.01 mM) and with (b) glutathione (GSH) (0.5, 2.5 and 5 mM), N-acetylcysteine (NAC) (0.1, 0.5 and 1 mM) and thiazolidine-4-carboxylic acid (TCA) (0.1, 0.5 and 1 mM). Each column represents the mean \pm SD of 8 values (latex beads/100 macrophages) corresponding to 8 animals, with each value being the mean of duplicate assays. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ with respect to control.

The superoxide anion production expressed as nmoles of reduced NBT/ 10^6 cells was increased with respect to controls in non-stimulated (without the presence of phagocytic stimulus) (Table II) and stimulated samples (in the presence of latex as phagocytic stimulus) (Table III) by GSH, TCA, NAC and AA. This represents an increment on the production of oxygen radicals during the basal oxidative metabolism as well as during the process of foreign material digestion by the macrophages.

TABLE II

Superoxide anion production expressed as nmoles of reduced NBT/ 10^6 cells in non-stimulated samples, in the presence of different concentrations (mM) of antioxidants.

Control	Glutathione			N-acetylcysteine			thiazolidine-4-carboxylic acid		
	0.5	2.5	5	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
1.5 ±0.4	42.5*** ±6.4	15.6*** ±2.9	1.0 ±0.2	1.5 ±0.3	32.9*** ±5.4	14.2*** ±2.6	1.6 ±0.2	1.1 ±0.3	3.3** ±0.5
		Ascorbic acid			α-Tocopherol				
		0.005	0.1	1	0.005			0.01	
		2.4* ±0.9	36.6*** ±7.3	780.8*** ±126	1.18 ±0.4			2.0 ±0.5	

Each value is the mean ± SD of 8 values corresponding to 8 animals, with each value being the mean of duplicate assays. ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05 with respect to the corresponding control.

TABLE III

Superoxide anion production expressed as nmoles of reduced NBT/ 10^6 cells in stimulated samples, in the presence of different concentrations (mM) of antioxidants.

Control	Glutathione			N-acetylcysteine			thiazolidine-4-carboxylic acid		
	0.5	2.5	5	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
20.7 ±6.7	56.9*** ±9.3	70.7*** ±8.1	44.5*** ±4.3	34.8* ±10.4	35.7** ±10.3	38.0*** ±9.0	56.4*** ±8.6	33.4** ±8.6	36.4** 8.5
		Ascorbic acid			α-Tocopherol				
		0.005	0.1	1	0.005			0.01	
		24.7 ±6.0	60.8*** ±11.0	976*** ±195	32.6*** ±4.7			29.8** ±4.6	

Each value is the mean ± SD of 8 values corresponding to 8 animals, with each value being the mean of duplicate assays. ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05 with respect to the corresponding control.

There was also a significant effect of VE on stimulated samples. In non-stimulated samples, the more effective concentrations were the smallest for GSH and the highest for TCA and AA. The differences with the control were more significant in the stimulated samples. Highly significant differences ($p < 0.001$) were found among the various AA concentrations in stimulated and non-stimulated samples. There were also differences between the GSH concentrations: $p < 0.05$ in the stimulated and $p < 0.001$ in the non-stimulated samples. TCA at 1 mM concentration showed a higher effect than at 0.1 and 0.5 mM ($p < 0.01$) in non-stimulated samples. In stimulated samples the maximal effect was observed at 0.1 mM concentration of TCA with significant differences ($p < 0.01$) with respect to the other concentrations used. There were only significant differences ($p < 0.001$) among the various NAC concentrations in non-stimulated samples. Comparing the effects of the three thiolic antioxidants at the same concentration of 0.5 mM, there were highly significant differences ($p < 0.001$) between the effects of GSH and NAC with respect to TCA (without a significant difference with respect to control) in non-stimulated samples. In stimulated samples, GSH showed the highest effect of the three antioxidants ($p < 0.01$). To rule out the possibility that antioxidants react with NBT, a group of control tubes were incubated with NBT and with each of the antioxidants, without cells. There were no significant differences between the absorbances of these tubes and that shown with NBT and Hank's medium.

Discussion

The stimulating effect of the above antioxidants on the phagocytic process, *in vitro*, suggests that the increase in this immune function caused by diet supplementation with these compounds (27) is due to a direct action on phagocytes. During the phagocytic process an activation of the oxidative metabolism occurs with free radical production (32). Thus, in macrophages, a diminution in the intracellular levels of ascorbic acid takes place during phagocytosis (33). This vitamin is consumed very rapidly when the phagocytes are activated (17). Moreover, the high intracellular levels of AA in phagocytes decrease significantly during disease, revealing the importance of this antioxidant in phagocytic function (34), also confirmed by this study. The highest concentration of ascorbic acid used in the present study, namely 1 mM, showed the maximum effects on all macrophage functions studied. Other authors reported similar effects *in vitro* with millimolar concentrations of AA (35,36). Among the thiolic antioxidants, the response at the 1 mM concentration was most significant for NAC and TCA. A higher concentration of GSH (2.5 mM) was needed to observe the maximum effect on phagocytosis and chemotaxis. The concentrations of VE studied showed significant effects without differences between them. It is worth noting that, because of the liposoluble characteristic of this compound, the highest concentration that could be properly dissolved without conferring to the solvent some undesirable effect on the assay was 10 μ M.

The first step in phagocytosis involves the adherence of phagocytic cells to tissue substrate before migration of these cells to the site of inflammation. To our knowledge, very few workers have studied this first step of the phagocytic process, and there are conflicting reports. For instance, AA has been shown to increase (37) or to decrease (38) this capacity of phagocytes. In the present study, AA and VE were the only antioxidants that influenced adherence. An stimulation of adherence should be interpreted with caution since it does not necessarily means a favorable action on immune function, unless stimulation of the consequent steps of the phagocytic process also occurs. Thus, some inhibitors of immune responses like cholecystokinin, stimulate the adherence of immune cells (39).

Chemotactic response, as well as random migration of macrophages have been stimulated by all antioxidants assayed in this work, which agrees with previous reports showing that, usually, supplementation or deficiency of antioxidants are associated with enhancement or impairment of chemotaxis, respectively (40,16,24). An adequate chemotaxis capacity that allows the phagocyte to

reach the inflammation sites is essential for ensuing phagocytosis of foreign or damaged material. Thus, it was expected that the antioxidants would stimulate the ingestion capacity of macrophages, as it actually happened. In the presence of a phagocytic stimulus, macrophages initiate what is known as the respiratory burst, in which a membrane-associated enzyme that is dormant in resting phagocytes, NADPH oxidase, is activated and catalyzes a reaction that produces superoxide anion (O_2^-) a precursor of the active microbicidal oxidants (41). From the results obtained, it seems that the neutralizing capacity of the above antioxidants does not interfere with the generation of superoxide anion. Thus, it has been shown that ascorbate can efficiently neutralize extracellular phagocyte-derived oxidants without affecting the bactericidal oxygen radicals inside the intracellular phagosomes (42,14). Moreover the antioxidants assayed seem to stimulate the generation of superoxide anion. Ascorbic acid has been shown to increase the activity of the hexose monophosphate shunt in neutrophils leading to the synthesis of NADPH (43), which is needed for reduction of molecular oxygen to superoxide anion. This fact would explain the increments obtained in non-stimulated samples. Under appropriate conditions, superoxide anion can be generated as a consequence of radical scavenging by thiol antioxidants like GSH. Such conditions are millimolar GSH concentrations and the pH and pO_2 usually found intracellularly. Then, superoxide would act as a radical sink (44,45) being removed enzymatically by SOD.

Possibly, other mechanisms apart from their properties as free radical scavengers are implicated in the modulation of immune functions by the investigated antioxidants, since GSH and NAC appear to influence transmembrane signal transduction and may activate nuclear transcription factors (8,4).

A better understanding of the effects and mechanisms of action of antioxidants on the immunological system could help in the design of appropriate therapies for many diseases associated with free radical damage (46).

Acknowledgments

We thank Dr. J. Miquel for the critical reading of the manuscript. This work was supported by Grants from FISs (No 95/1623 and 97/2078). The work of Dr. M. Del Rio was supported by a fellowship from Instituto DANONE.

References

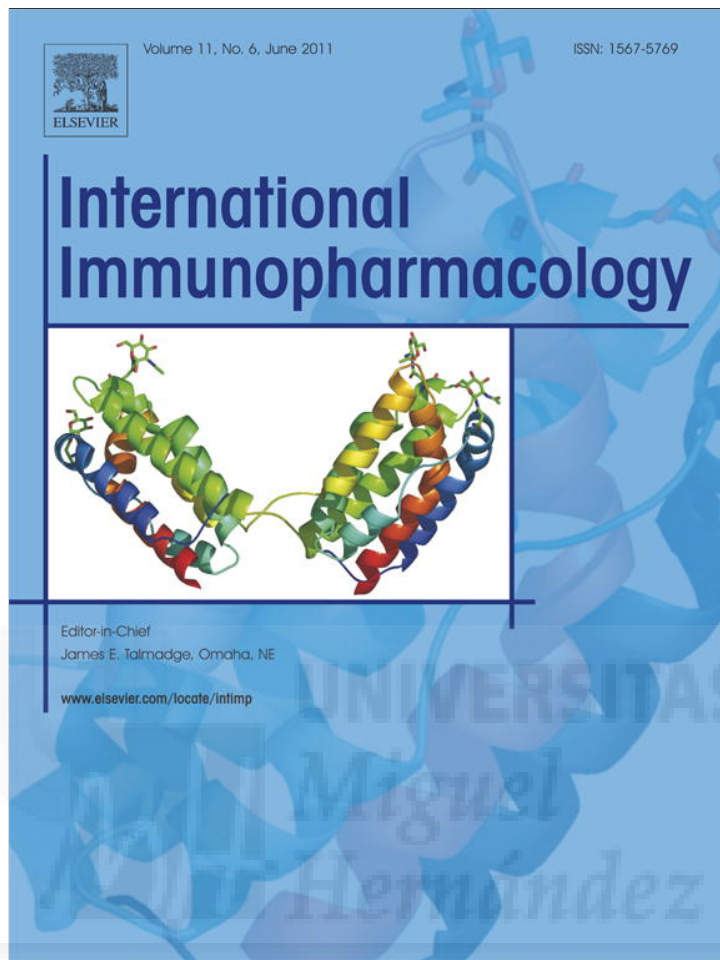
- 1 J.R. VIÑA, G.T. SAEZ and J. VIÑA, *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, J. Miquel, A. Quintanilha and H. Weber (eds.), pp. 121-132, CRC Press, Boca Raton, Florida (1989).
- 2 J. MIQUEL and H. WEBER, *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*, J. Viña (eds.), pp. 187-192, CRC Press, Boca Raton, Florida (1990).
- 3 Y.A. VLADIMIROV, *Free Radicals, Ageing and Degenerative Diseases*, J.E. Johnson, J.R. Walford, D. Harman and J. Miquel (eds.), pp. 141-195, Alan R Liss, New York (1986).
- 4 S.N. MEYDANI, D. WU, M.S. SANTOS AND M.G. HAYEK, *Am. J. Clin. Nutrition* **62** (suppl) 1462S-76S (1995).
- 5 S. DE FLORA, C.F. CESARONE, R.M. BALANSKY, A. ALBINI, F. D'AGOSTINI, C. BENNICELLI, M. BAGNASCO, A. CAMOIRANO, L. SCATOLINI, A. ROVIDA and A. IZZOTTI, *J. Cell. Biochem. (suppl)* **22** 33-41 (1995).
- 6 N. VAN ZANDWIJK, *J. Cell. Biochem. (suppl)* **22** 24-32 (1995).
- 7 C.Y. YAN, G. FERRARI and L.A. GREENE, *J. Biol. Chem.* **10** 26827-26832 (1995).
- 8 U. SIEBENLIST, G. FRANZOSO and K. BROWN, *Ann. Rev. Cell Biol.* **10** 405-455 (1994).
- 9 R.L. ROBERTS, V.R. ARODA and B.J. ANK, *J. Infectious diseases* **172** 1492-1502 (1995).
- 10 H.U. WEBER, J.F. FLEMING and J. MIQUEL, *Arch. Gerontol. Geriatrics* **1** 299-310 (1982).
- 11 M. DE LA FUENTE, M.D. FERRANDEZ, F. MUÑOZ, E. DE JUAN and J. MIQUEL, *Mech.*

- Ageing Develop. **68** 27-36 (1993).
- 12 A. BENDICH, J. Nutrition **122** 601-603 (1992).
 - 13 B.P. CHEW, J. Nutrition **125** 1804S-1808S (1995).
 - 14 R.J. JARIWALLA and S. HARAKEH, *Ascorbic acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology*, J. Robin Harris (ed.), pp 215-231, Plenum Press, New York (1996).
 - 15 G. BARJA, *Ascorbic acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology*, J. Robin Harris (ed.), pp 157-187, Plenum Press, New York (1996).
 - 16 S.S. BALL, R. WEINDRUCH and R.L. WALFORD, *Free radicals, Ageing and Degenerative Diseases*, Johnson Jr J.E., Walford R., Harman D. and Miquel J.(eds.), pp 427-456, Liss, New York (1996).
 - 17 B. FREI, Am. J. Clin. Nutrition **54** 1113S-18S (1991).
 - 18 P. WASHKO, D. ROSTROSEN and M. LEVINE, Am. J. Clin. Nutrition **54** 1221S-1229S (1991).
 - 19 H. HERMILLÄ, British J. Nutrition **67** 3-16 (1992).
 - 20 A. KAMAL-ELDIN and L.A APPELQVIST, Lipids **31**(7) 671-701 (1996).
 - 21 H. SIES and M.E. MURPHY, J. Photochem. Photobiol. B: Biology **8** 211-224 (1991).
 - 22 LI LI JI, Free Radical Biology & Medicine **18** (6) 1079-1086 (1995).
 - 23 A.L. TAPPEL, Vitamins and Hormones **20** 493-510 (1962).
 - 24 A BENDICH, Hanbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine II, J. Miquel, A.T. Quintanilla and H. Weber (eds.), pp 153-160, CRC Press, Florida (1989).
 - 25 B. KENNES, I. DUMONT, D. BROHEE, C. HUBERT and P. NEVE, Gerontol. **29** 305-310 (1983).
 - 26 M.JENSEN, C. FOSSUM, M. EDEROTH and RVJ HAKKARAINEN, J. Veterinarian Med. B **35** 549-555 (1988).
 - 27 S. MORIGUCHI, N. KOBAYASHI and Y. KISHINO, J. Nutrition **120** 1096-1102 (1990).
 - 28 S.J. NOGA, S.J. NORMAN and R.S. WEINER, Lab. Invest **51** 244-249 (1984).
 - 29 M. DE LA FUENTE, M. DEL RIO, M.D. FERRANDEZ and A. HERNANZ, Immunology **73** 205-211 (1991).
 - 30 S.V. BOYDEN, J.Exp.Med **115** 453-456 (1962).
 - 31 O. BAGASRA A. HOWEEDY, A. KAJDACSZY-BALLA, Immunology **65** 405-409 (1988).
 - 32 F. LAURENT, A.M. BENOLIEL, C.CAPO and P. BONGRAND, J.Leukocyte Biol **49** 217-226 (1991).
 - 33 A. HERNANZ, M.E. COLLAZOS and M. DE LA FUENTE, Internat. Arch. Allergy Appl. Immunology **91** 166-170 (1990).
 - 34 R. MUGGLI, *Nutrient Modulation of the Immune Response*, S. Cunningham-Rundles (eds), pp. 75-90, Marcel Dekker Inc., New York (1993).
 - 35 L.A. BOXER, B. VANDERBILT, S. BONSBIB, R. JERSILD, H.H. YANG and R.L. BAEHNER, J. Cell. Physiol. **100** 119-126 (1979).
 - 36 F. DALLEGRI, G. LANZI and F. PATARONE, Arch. Allergy and Appl. Immunology **61** 40-45 (1980).
 - 37 R.E. THORNER, C.F. BARKER and R.R. MACGREGOR, Transplantation **34** 432-436 (1983).
 - 38 E. JONAS, A. DWENGER and A. HATER, J. Bioluminescence Chemiluminiscence **8** 15-20 (1993).
 - 39 M. DE LA FUENTE, M. CAMPOS, M. DEL RIO and A. HERNANZ, Regulatory Peptides **55** 47-56 (1995).
 - 40 C.S. JOHNSTON, L.J. MARTIN and X. CAI, J. Am. Coll. Nutrition **121** 126-130 (1992).
 - 41 A.W. SEGAL and A. ABO, Trends Biochem Sci **18** 43-47 (1993).
 - 42 R ANDERSON and P.T. LUCKEY, Ann. N. Y. Academy Sci. **498** 229-247 (1987).
 - 43 L.R DE CHATELET, M.R. COOPER, C.E. MC CALL, Antimicrobial Agents Chemotherapy **1** 12-16 (1972).

- 44 C.C. WINTERBOURN, *Free Radical Biology & Medicine* **14** 85-90 (1993).
- 45 C.C. WINTERBOURN, *Biothiols in health and disease*, L.Packer and E. Cadenas (eds.), pp.117-133, Marcel Dekker inc. New York (1995).
- 46 C.A. RICE-EVANS and A.T. DIPLOCK, *Free Radical Biology & Medicine* **15** 77-96 (1993).



Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimpSulfur-containing antioxidants increase *in vitro* several functions of lymphocytes from miceMónica De la Fuente^{a,*}, Angel Hernanz^b, Salvador Viniegra^c, Jaime Miquel^d^a Animal Physiology Department, Faculty of Biological Science, Complutense University of Madrid, Spain^b Biochemistry Department, Hospital La Paz, Madrid, Spain^c Biochemistry and Molecular Biology Department, Miguel Hernandez University, Elche, Spain^d Department of Biotechnology, Alicante University, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2010

Received in revised form 9 January 2011

Accepted 10 January 2011

Available online 19 January 2011

Keywords:

Lymphocyte functions

Sulfur-containing antioxidants

Mice

ABSTRACT

The *in vitro* effects of several sulfur-containing antioxidants, such as glutathione (GSH), N-acetylcysteine (NAC), thioproline (TP) and taurine (TAU), at different concentrations, on key functions of lymphocytes from axillary nodes, spleen, thymus and peritoneum from young-adult BALB/c mice have been investigated. The functions studied have been proliferation, both spontaneous and in response to the mitogen Concanavalin A, mobility both spontaneous and directed to a chemical attractant (chemotaxis) and adherence to substrate. The effect of these antioxidants on the viability of leukocytes was also investigated. The results show an antioxidant-induced stimulation of all the functions studied. The highest concentrations used of each antioxidant were the most effective in proliferation (5 mM for GSH, 1 mM for TP and NAC and 40 mM for TAU). These concentrations increase mobility significantly. The presence of TP + NAC enhances the chemotaxis of peritoneal lymphocytes more than each antioxidant separately. The adherence capacity of peritoneal lymphocytes also increased at 10 min of incubation with GSH, TP and NAC. All these antioxidants increase the viability of leukocytes in culture, especially in cells from spleen. In conclusion, the sulfur-containing antioxidants studied *in vitro* improve the functional capacity of lymphocytes from young-adult mice and these results showing that the improvement of the immune response, and specifically of the lymphocyte functions, found after ingesting diet supplemented with the antioxidants studied, are due to a direct action of these compounds in the immune cells.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The immune function is specially linked to the release of reactive oxygen species (ROS), the excess of which must be eliminated by endogenous antioxidant defenses to prevent their harmful effects on biomolecules [1,2]. In fact, the immune cells need to produce adequate levels of ROS to carry out their defensive function, but an excess of ROS can cause damage to immune cells. This is more evident due to the membrane characteristics of these cells, which are very vulnerable to oxidative damage [1]. For this reason, leukocytes use endogenous antioxidants to perform their functions [3]. Any cell needs to maintain a balance between the production of oxidants and the antioxidant defenses, a redox balance, in order to prevent an excess of the first and the resulting oxidative stress. This balance is even more essential to preserve the functional capacity of immune cells and, therefore, the health of the organism [1]. From the antioxidant compounds, we may highlight those with sulfur-containing groups, both with a thiol group

in their molecules such as glutathione (GSH) and N-acetylcysteine (NAC), or donors of this thiol group such as thioproline (TP) and taurine (TAU).

Glutathione (GSH) is the most abundant non-protein thiol in mammalian cells and it is considered essential for their survival. It plays an important role in biological processes such as DNA synthesis, enzymatic reactions, neurotransmitter release and detoxification [4]. Moreover, since GSH has relevant effects in the protection of proteins and lipoproteins against the attack by oxygen free radicals, a deficit of this thiolic antioxidant, or of thiol group donors, can lead to increased lipid peroxidation with concomitant changes in membrane and cellular functions [5]. On the contrary, an increase in the levels of this compound reinforces the antioxidant protection and the cellular function. Thus, GSH plays a major role in the preservation of the intracellular redox state [6]. Therefore, an optimal immune response will require adequate levels of GSH [7]. Moreover, a variety of leukocyte functions, such as T-cell proliferation, among others, depend on the levels of GSH [8], and its administration increases neutrophil oxidative burst activity [9]. In previous studies we have observed that GSH stimulates *in vitro* the different steps of the phagocytic process of peritoneal macrophages from adult mice [10]. In addition, GSH

* Corresponding author. Dept. Fisiología (Fisiología Animal II). Facultad de Biología. Universidad Complutense. 28040 Madrid, Spain. Fax: +34 1 394 4935.

E-mail address: mondelaf@bio.ucm.es (M. De la Fuente).

stimulated the activity of several antioxidant enzymes such as catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in peritoneal leukocytes from mice [11]. The role of GSH on apoptosis of immune cells has been widely studied. In fact, human monocytic cells submitted to apoptosis decreased their levels of GSH [12]. Similar results have been obtained in lymphoid cells [13–15]. Moreover, T lymphocytes are protected against apoptosis when they increase their GSH levels [16] and the presence *in vitro* of GSH decreases the incidence of programmed cell death of peritoneal leukocytes [11].

Thioprolone (TP) (thiazolidine-4-carboxylic acid) is an antioxidant, a product of the reaction of cysteine with formaldehyde, that is present in mitochondria and can be a source of free L-cysteine in the cell [17,18]. Although it is known that cysteine and other thiol compounds are able to modulate the immune response and that the extracellular concentration of cysteine determines the intracellular levels of GSH and thus affects the immune cell functions [18], the effect of TP on the immune function has scarcely been studied. Other thiazolidin derivatives such as 2-methyl-thiazolidine-2,4,-dicarboxylic acid, the product of condensation of L-cysteine and pyruvate, increases the proliferation of a IL-2-dependent T cell line, the CTLL-2 cells [18]. In previous studies we have shown that the supplementation of a diet with TP improves the macrophage functions of prematurely aging mice [19] as well as some leukocyte functions in old mice [20,21]. TP *in vitro* also improves, in leukocytes from mice, several functions, as well as increasing the activity of antioxidant enzymes and decreasing the programmed cell death [1,10,11,22,23].

N-acetylcysteine (NAC) is an antioxidant that acts as a GSH precursor [24], but also neutralizes free radicals in a direct manner [25]. The antioxidant action of NAC has been observed on immune cells. Thus, the ingestion of a diet supplemented with NAC improves several immune functions in prematurely ageing mice [26,27] and in elderly women [28]. In addition, NAC modulates the functions of immune cells from mice with endotoxic shock, a situation of high oxidative stress, by inhibiting the activation of NFkB [29,30]. This antioxidant increases *in vitro* several functions of peritoneal macrophages from adult mice in a similar way to GSH [10], and improves lymphocyte functions of prematurely aging mice [26], as well as increasing the activity of antioxidant enzymes in peritoneal leukocytes of mice [11].

Taurine (TAU), a semi-essential amino acid that is not incorporated into proteins, is ubiquitous in most mammalian cells, in which it is the most abundant free amino acid in the heart, retina, skeletal muscle and leukocytes. It is produced by synthesis from cysteine, especially in the liver, or by intake in the diet, and it has been proposed as an antioxidant [31,32]. Because of this, TAU is present in high concentrations in cells with oxidative stress such as leukocytes. TAU and its chloramines seem to be relevant modulators of immunity, showing down-regulation of the production of pro-inflammatory mediators, in both rodent and human leukocytes, by inhibiting the activation of NFkB [33]. In the immune cells, TAU is abundant in phagocytic cells such as neutrophils, in which it provides protection against cytotoxicity caused by overproduction of ROS [34], being relevant in these leukocytes during septic processes [35]. Thus, it has been suggested that the changes in intragranulocyte TAU levels are determinants of the magnitude and quality of the immune response of these cells [36]. In fact, TAU improves the phagocytic capacity of neutrophils *in vitro* [37]. The effects of TAU on lymphocytes have been scarcely studied. TAU added in culture of lymphocytes from healthy infants protects against DNA damage [38], and it can attenuate CD3/interleukin-2-induced T cell apoptosis [39].

The results obtained in previous studies with diets supplemented with TP and NAC, showing positive effects on activation of immune cells from old and prematurely aging mice, were to be expected since with aging there is oxidative stress and the ingestion of antioxidants, in an appropriate amount, help to normalize the redox balance [1]. Although, in young animals the ingestion of antioxidants does not

seem necessary, we have observed that there is also an oxidative stress situation in chronologically young mice since they can be biologically older, and a diet supplemented with antioxidants can be useful to their immune systems [1]. We have observed that antioxidants such as GSH, TP and NAC increase *in vitro* several macrophage functions and NK activity in cells from adult mice [10,11,23]. Nevertheless, in lymphocytes the effects of these antioxidants have been seldom studied. Therefore, the aim of the present work was to investigate the effect *in vitro* of a range of GSH, TP, NAC and TAU concentrations on relevant functions of lymphocytes from mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female BALB/c mice (Harlan Ibérica, Spain), which were 8 weeks old on arrival to our laboratory, were used. The mice were specific pathogen free, as tested by Harlan according to FELASA recommendations. The animals were randomly divided into groups of 5, each group being housed in a polyurethane box, at a constant temperature (22 ± 2 °C) under sterile conditions inside an aseptic air negative-pressure environmental cabinet (Flufrance, Cachan France) with a 12/12 h reversed light/dark cycle. All animals were fed Sander Mus (A04 diet from Panlab LS Barcelona, Spain) pellets and water *ad libitum*. The diet was in accordance with the recommendations of the American Institute of Nutrition for laboratory animals. Mice were treated according to the guidelines of the European Community Council Directives 86/6091 EEC.

2.2. Antioxidants

The following antioxidants: glutathione (GSH), thioprolone (TP) N-acetylcysteine (NAC) and taurine (TAU), all purchased from Sigma (St.Louis, MO, USA), were used. The GSH, NAC and TAU were BioXtra cell culture tested and the TP $\geq 99.0\%$ pure by HPLC. The concentrations used were 0.5, 2.5 and 5 mM in the case of GSH; 0.1, 0.5 and 1 mM for TP and NAC; and 4, 20 and 40 mM for TAU. The concentrations of GSH, TP and NAC were based on those used in previous studies *in vitro* on leukocyte functions [10,11,22,23]. In the case of TAU, since it reaches a high concentration in leukocytes (up to 50 mM) [33], higher concentrations of this antioxidant were used in the present study.

2.3. Experimental procedure

At 17 ± 3 weeks of age, the mice were sacrificed by cervical dislocation and peritoneal suspensions were obtained following the methods described previously [26]. The suspension leukocytes, mainly lymphocytes, macrophages and NK cells, were identified by their morphology and quantified in Neubauer chambers using optical microscopy ($\times 40$). Additionally, leukocyte counts were confirmed by immunostaining and flow cytometry, with cells stained for expression of CD11b (CALTAG Laboratories, Burlingame, USA), CD3, CD4, CD8, CD14, CD19 and CD56 (BD Pharmingen, San Diego, CA). Briefly, aliquots of the cellular suspensions were washed at 400 g for 10 min, and adjusted to 3×10^5 leukocytes/ml in PBS with BSA 1% (Sigma, St Louis, USA), which was used to reduce unspecific binding. Then, they were centrifuged at 560 g for 10 min, the supernatants were discarded, and 30 μ l of single antibodies or 30 μ l of mixture of antibodies conjugated to different fluorochromes were added to each tube. Isotype control antibodies were also analyzed. 30 μ l of PBS-BSA were added to blank tubes. Cells were incubated in the presence of the antibodies for 30 min at 4 °C in the dark. Tubes were washed twice at 560 g for 5 min in PBS-BSA to remove the excess of free antibody. Fluorescence was measured using a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin lakes, USA) immediately after staining.

Results were analyzed with Cell Quest Pro software (BD Biosciences, San Jose, CA) and expressed as percentage of CD11b (macrophages), CD19 (B lymphocytes), CD3CD4 (T helper), CD3CD8 (T cytotoxic) and 56 CD (NK) cells with regard to the total number of cells present in the samples. The lymphocytes were counted and then adjusted to 5×10^5 lymphocytes/ml Hank's medium (Sigma) for studies of the spontaneous and directed mobility (chemotaxis), as well as for the adherence capacity of peritoneal lymphocytes. Then, axillary nodes, spleen and thymus were removed aseptically and pressed gently through a mesh screen (Sigma), obtaining a cell suspension that was centrifuged to isolate the leukocytes of these organs. Samples of the leukocyte suspensions from spleen were used to carry out the count of subpopulations using flow cytometry following the same above method. All the samples were then adjusted to 1×10^6 leukocytes/ml medium. A Hank's medium was used for studies of the adherence, spontaneous and directed mobility (chemotaxis), and for the levels of intracellular GSH. A RPMI 1640 medium (Gibco, Paisley, Scotland, UK) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco), previously inactivated by heat (30 min at 56 °C), and with gentamycin (10 mg/ml; Gibco), was used for the proliferation assay and viability. In the spleen, due to its high concentration of erythrocytes, a centrifugation in a gradient of Urograph-Ficoll with a density of 1.070 was necessary to isolate leukocytes. Cell viability, was analyzed by the trypan blue exclusion test, being higher than 95% in all experiments. All the culture media were free of endotoxin. The incubations were performed at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. All the methods were performed using total leukocyte suspensions from peritoneum, spleen, axillary nodes and thymus in order to better reproduce the in vivo conditions.

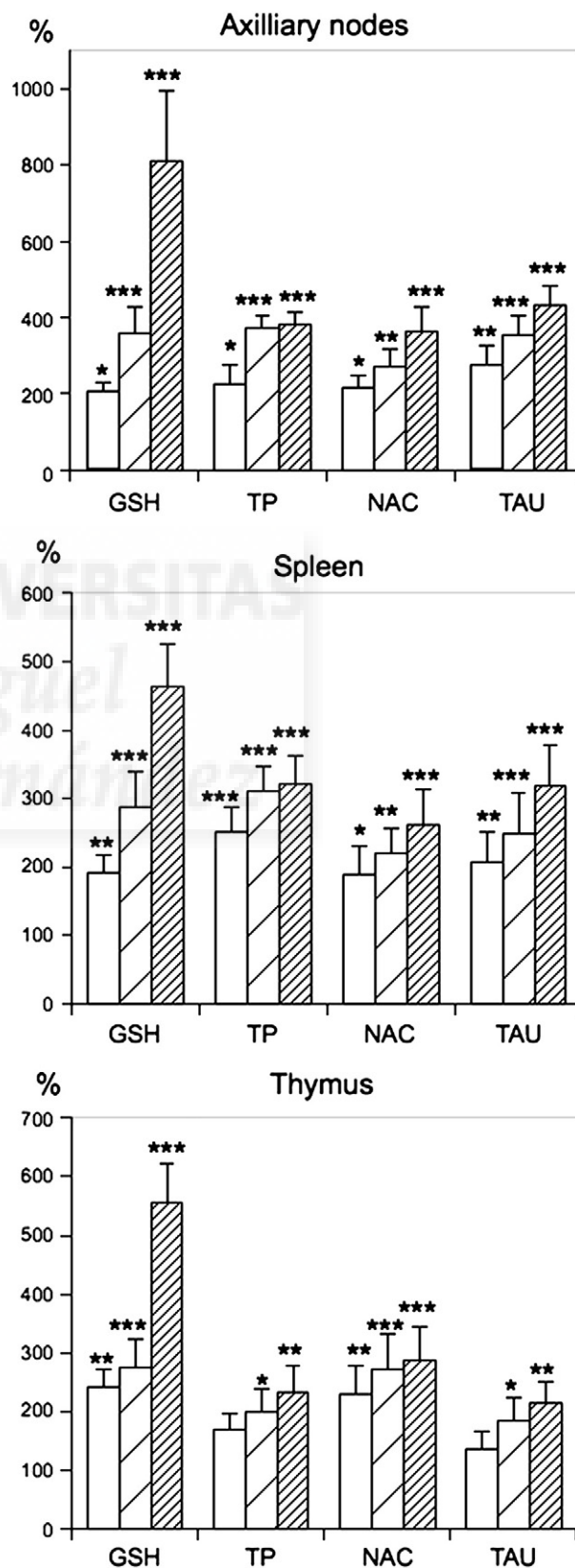
2.4. Lymphocyte proliferation

The proliferation of lymphocytes was studied using suspensions adjusted to 1×10^6 leukocytes/ml supplemented medium from axillary nodes, spleen and thymus following a method previously described [40]. Aliquots of 200 µl of these suspensions were seeded in 96-well flat-bottomed microtitre plates (Costar, Cambridge MA) and incubated in the presence of GSH (0.5, 2.5 and 5 mM), TP (0.1, 0.5 and 1 mM), NAC (0.1, 0.5 and 1 mM) and TAU (4, 20 and 40 mM), in presence of concanavalin A (Con A) mitogen (1 µg/ml; Sigma) for the analysis of mitogen-proliferative response or without mitogen for the spontaneous proliferation. After 48 h of incubation at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, in order to measure proliferation a commercially available 5-bromo-2-deoxy-uridine (BrdU) ELISA labelling and detection kit was used. The BrdU ELISA was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were pulsed with 20 µl of 110 µmol/l BrdU solution during the last 24 h of culture and, thus, BrdU was incorporated into freshly synthesized DNA. Then, following fixation of cells, cellular DNA was digested partially by nuclease treatment. Next, a peroxidase-labelled antibody to BrdU that binds to BrdU was added. As a final step, the peroxidase substrate was added, yielding a coloured reaction product as a result of peroxidase enzyme activity. The absorbance of the sample (measured at 405 nm, with a reference wavelength at 490 nm) is directly correlated with the level of BrdU incorporated into cellular DNA. The results were expressed as percentage of absorbance (Optical Density, OD), giving the 100% value to the OD obtained in the corresponding control samples (without antioxidants).

Fig. 1. Spontaneous proliferation (%) of lymphocytes of axillary nodes, spleen and thymus from BALB/c mice in the presence of different concentrations of the antioxidants glutathion (GSH: 0.5 mM, 2.5 mM and 5 mM), tioprolone (TP: 0.1 mM, 0.5 mM and 1 mM), N-acetylcysteine (NAC: 0.1 mM, 0.5 mM and 1 mM) and taurine (TAU: 4 mM, 20 mM and 40 mM). Each value is the mean ± SD of ten experiments performed in triplicate, with the value 100 being the optic density (OD) obtained in control samples without antioxidants (0.096 ± 0.019 , 0.104 ± 0.018 and 0.165 ± 0.035 OD for axillary nodes, spleen and thymus, respectively). *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001 with respect to the corresponding control values.

2.5. Lymphocyte mobility

The spontaneous mobility and the mobility directed to a chemoattractant gradient (chemotaxis) were evaluated according to the method previously described [26,40]. This consisted basically of the use of chambers with two compartments separated by a filter with



a pore diameter of 3 μm (Millipore, Madrid, Spain). Aliquots (300 μl) of the different suspensions (adjusted to 1×10^6 leukocytes/ml in the case of axillary nodes, spleen and thymus, and to 5×10^5 lymphocytes/ml Hank's medium in peritoneum) were deposited in the upper compartment. Aliquots (400 μl) of the chemoattractant f-met-leu-phe (10^{-8} mol/l) (chemotaxis) or of the corresponding medium only (spontaneous mobility) were put into the lower compartment. The antioxidants were added in the upper compartment at the following concentrations: 5 mM of GSH, 1 mM of TP, 1 mM of NAC and 40 mM of TAU. With the peritoneal suspension a parallel experiment was carried out analyzing the effect on chemotaxis of 0.1 mM of TP and 0.1 mM of NAC, together and separately. The chambers were incubated for 3 h and then the filters were fixed and stained. The spontaneous mobility index (SMI) and the chemotaxis index (CI) was determined by counting the number of lymphocytes in four scans of 5 mm each on the lower face of the filter using an optical microscope (100 \times magnification lens).

2.6. Adherence capacity of peritoneal lymphocytes

For adherence capacity analysis we followed a method previously described [26]. Briefly, aliquots of 200 ml of peritoneal leukocyte suspension, adjusted to 5×10^5 lymphocytes/ml Hank's medium, were placed in Eppendorf tubes and 20 ml of GSH (5 mM), TP (1 mM), NAC (1 mM) or Hank's medium (controls) were added. At 10, 20, 30 and 60 min of incubation, aliquots of 10 ml from each sample were removed after gently shaking to resuspend the sedimented cells, and the number of nonadhered lymphocytes was determined in an optical microscope using Neubauer chambers. The adherence index (A.I.) was calculated according to the following equation:

$$\text{A.I.} = \frac{[(\text{initial cells / ml} - \text{nonadherent cells / ml}) / (\text{initial cells / ml})] \times 100.$$

2.7. Viability of lymphocytes

The cellular viability was determined using the trypan-blue exclusion test. Aliquots of 200 μl of these suspensions adjusted to 1×10^6 leukocytes/ml supplemented medium, from axillary nodes, spleen and thymus were seeded in 96-well flat-bottomed microtitre plates (Costar, Cambridge MA) and incubated in the presence of GSH (5 mM), TP (1 mM), NAC (1 mM) and TAU (40 mM) at 37 $^\circ\text{C}$ in an atmosphere of 5% CO_2 . After 1, 4, 6, 24, 48 and 72 h of incubation the viability of the cells in each well was determined. Aliquots of 10 ml were obtained from each well after slight agitation, and put in another plate, adding quickly 10 ml of trypan blue and mixing. In a Neubauer chamber the number of dead cells (blue cells) and living cells (not stained of blue) were counted and the results were expressed as the percentage of living cells.

2.8. Total GSH levels

Total GSH levels were analyzed by the method of Tietze [41] with some modifications [28]. Briefly, 1 ml aliquots of lymphocyte suspensions (10^6 cells/ml Hank's medium) from axillary nodes, spleen and thymus were centrifuged at 1200 g for 10 min at 4 $^\circ\text{C}$ three times, after being incubated in the presence of 5 mM of GSH or medium only (controls) for 3 h. Pelleted cells were resuspended in a medium containing 5% trichloroacetic acid (TCA, Panreac, Spain) in 0.01 N HCl (Panreac). Then, samples were sonicated and centrifuged at 3200 g for 5 min at 4 $^\circ\text{C}$. Aliquots of the supernatants were measured using the following reaction mixture: 5,5 -dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB, 6 mM, Sigma), b-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (b-NADPH, 0.3 mM, Sigma), and glutathione reductase

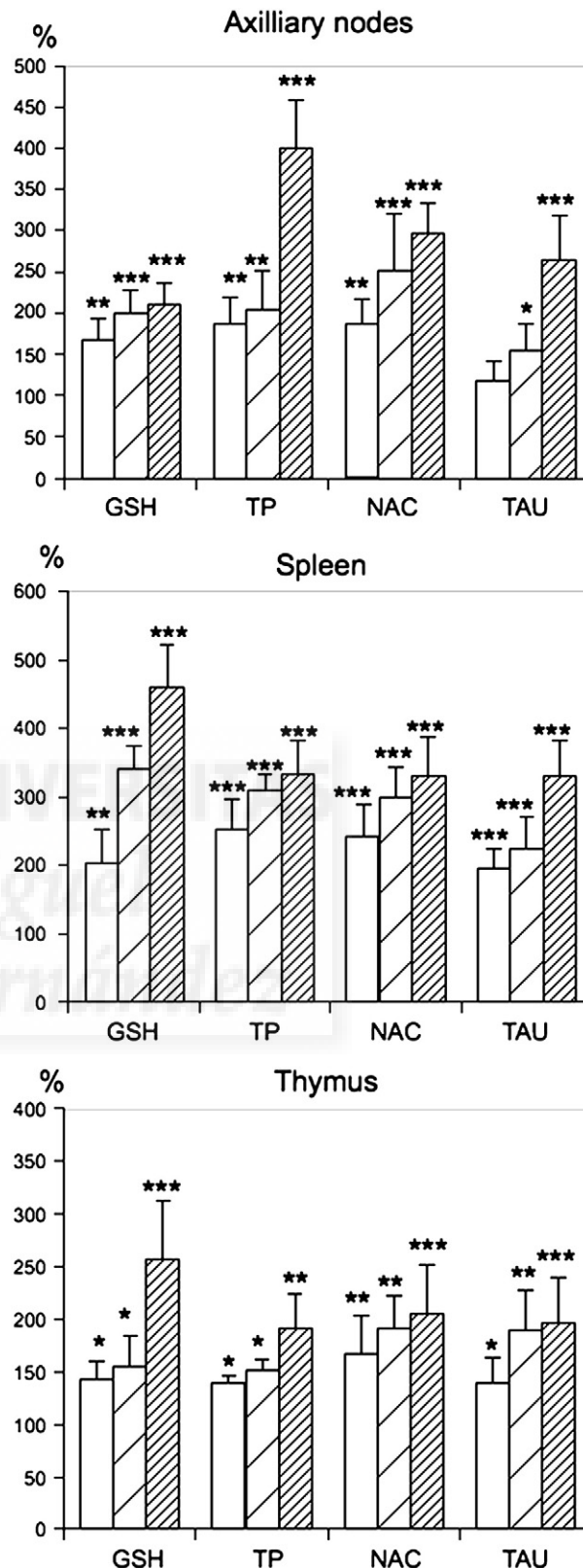


Fig. 2. Proliferation response to the mitogen concanavalin A (%) of axillary nodes, spleen and thymus lymphocytes from BALB/c mice in the presence of different concentrations of the antioxidants glutathion (GSH: 0.5 mM, 2.5 mM and 5 mM), tioprolone (TP: 0.1 mM, 0.5 mM and 1 mM), N-acetylcysteine (NAC: 0.1 mM, 0.5 mM and 1 mM) and taurine (TAU: 4 mM, 20 mM and 40 mM). Each value is the mean \pm SD of ten experiments performed in triplicate, giving the value 100 to the optic density (OD) obtained in control samples without antioxidants (0.558 \pm 0.084, 0.592 \pm 0.075 and 0.179 \pm 0.056 OD for axillary nodes, spleen and thymus, respectively). *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001 with respect to the corresponding control values.

(10 U/ml, Sigma). The change in absorbance was monitored at 412 nm for 240 s, and the results were expressed as nanomoles per 10^6 cells.

2.9. Expression of the results and statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.) of the values from the number of experiments mentioned in the figures and in the tables. Each value is the mean of the data from assays performed in duplicate. The normality of the samples was confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test and the homogeneity of variances by the Levene test. In the statistical study, the Student's t-test for paired parametric data was used, being $p < 0.05$ the minimum significant level.

3. Results

3.1. Peritoneal and spleen leukocyte populations

Regarding peritoneal leukocyte populations, the percentages of subpopulations were: 17 ± 3 of macrophages (CD14), 10 ± 2 of NK cells (CD56) and 73 ± 8 of lymphocytes (4 ± 1 CD3CD4; 2.0 ± 0.5 CD3CD8 and 67 ± 9 CD19). In spleen leukocytes the percentages were: 1.5 ± 0.4 of macrophages (CD14), 6.5 ± 1.5 of NK cells (CD56) and 92 ± 15 of lymphocytes (19 ± 4 CD3CD4; 2.0 ± 0.8 CD3CD8 and 71 ± 11 CD19).

3.2. Lymphoproliferation

The results of the effects of antioxidants on spontaneous proliferation of lymphocytes from axillary nodes, spleen and thymus are shown in the Fig. 1. In axillary nodes and spleen all the concentrations of the antioxidants increased this lymphocyte function significantly. In thymus, with the lowest concentrations of TP and TAU there were no significant effects. In general, the highest concentrations of each antioxidant were the most effective. Thus, 5 mM and 2.5 mM GSH produced a significant increase ($p < 0.001$) in the three immune organs. In the case of TP, 1 mM of this antioxidant was the most effective concentration ($p < 0.001$ in axillary nodes and spleen and $p < 0.01$ in thymus). The same occurred with NAC, 1 mM being the concentration with the highest effect ($p < 0.001$ in all the organs. With TAU 40 mM was also the most effective concentration ($p < 0.001$ in axillary nodes and spleen and $p < 0.01$ in thymus). The spleen is the immune organ in which the highest significant effects were observed.

The results of the proliferation of lymphocytes from axillary nodes, spleen and thymus in response to ConA are shown in Fig. 2. All the antioxidant concentrations studied increased this proliferation with the exception of the lowest concentration of TAU (4 mM) in cells from axillary nodes. In the three organs 5 mM GSH ($p < 0.001$), 1 mM NAC ($p < 0.001$), 1 mM TP ($p < 0.001$ in axillary nodes and spleen, and $p < 0.01$ in thymus) and 40 mM TAU ($p < 0.001$), were the concentrations showing the highest statistical differences. The spleen is the organ in which we observed the highest effects of antioxidants.

3.3. Mobility

The highest concentrations of each antioxidant were used in the study of spontaneous and directed mobility (chemotaxis) of lymphocytes from axillary nodes, spleen, thymus and peritoneum. The results of the spontaneous mobility index (SMI) are shown in Fig. 3. The SMI increased significantly with all the antioxidants studied. In axillary

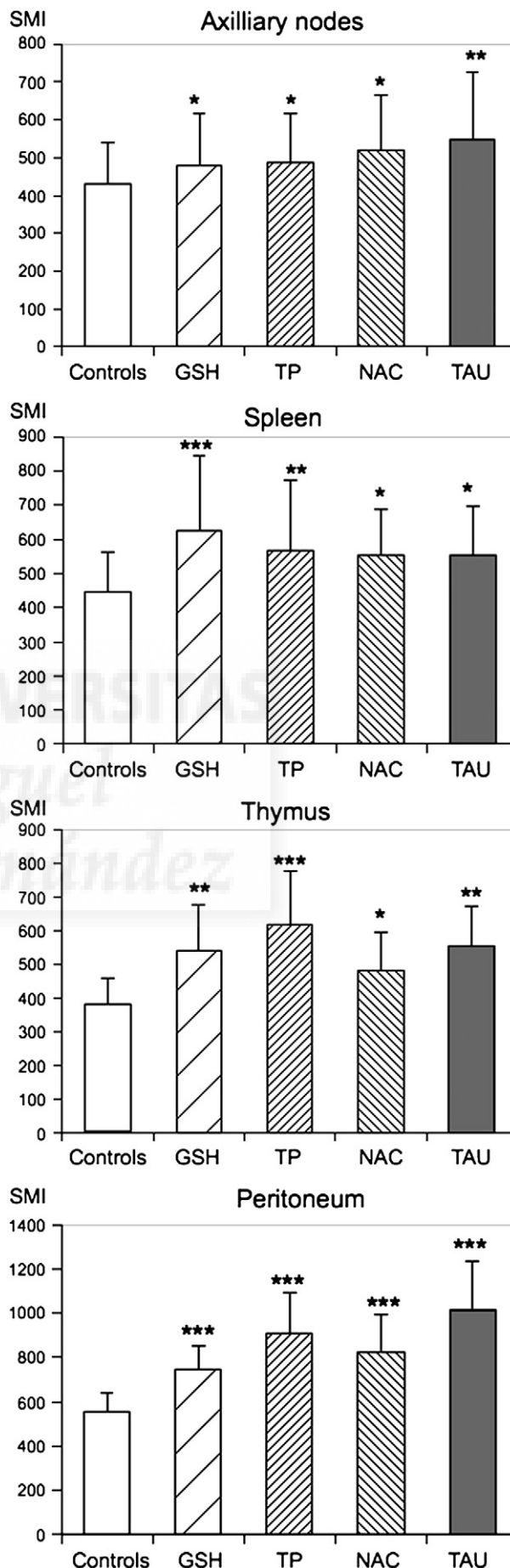


Fig. 3. Spontaneous mobility indexes (SMI) of axillary nodes, spleen, thymus and peritoneum lymphocytes from BALB/c mice in the presence of 5 mM glutathion (GSH), 1 mM tioprolin (TP), 1 mM N-acetylcysteine (NAC) and 40 mM taurine (TAU). Each value is the mean \pm SD of ten experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ with respect to the corresponding control values.

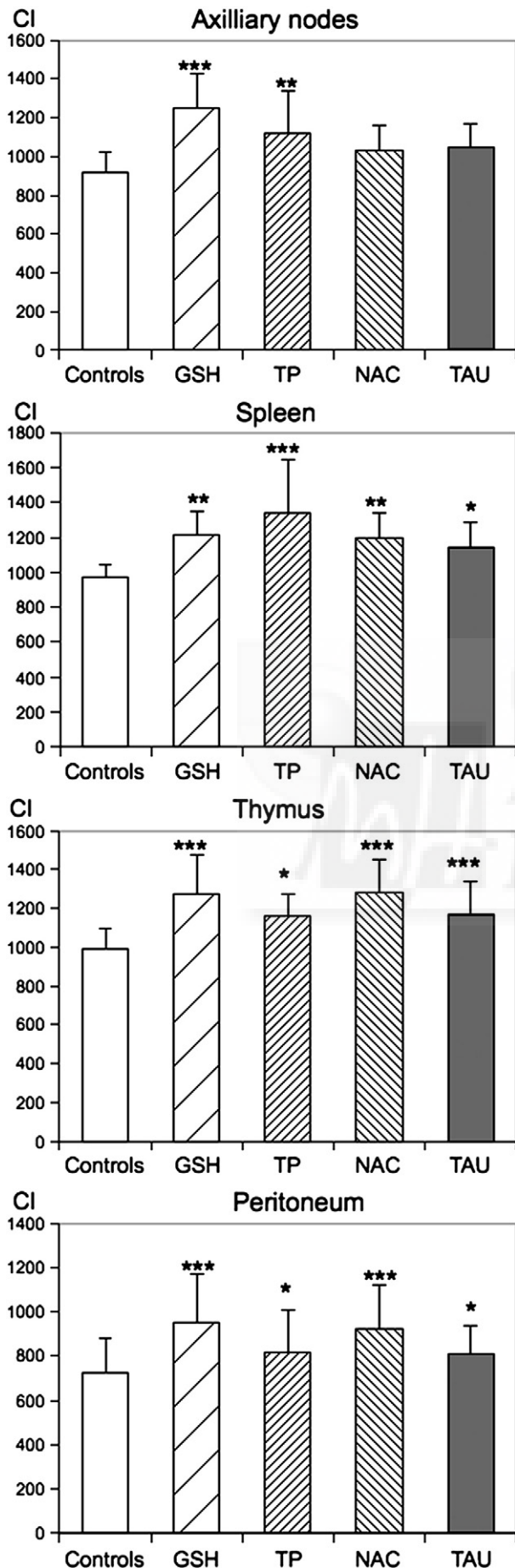


Table 1

Effect *in vitro* of TP and NAC (0.1 and 1 mM) on the chemotaxis index of peritoneal lymphocytes from BALB/c mice.

Concentrations	Controls	TP	NAC	TP + NAC
0.0 mM	781 ± 111			
0.1 mM		814 ± 114	793 ± 117	840 ± 128*
1.0 mM		851 ± 116**	963 ± 114**	1095 ± 210***

Each value is the mean ± SD of 8 experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ with respect to the control values.

nodes TAU showed the highest significant difference with respect to controls ($p < 0.01$), the differences in the case of the other antioxidants being $p < 0.05$. In spleen GSH ($p < 0.001$) and TP ($p < 0.01$) increase SMI more than NAC and TAU ($p < 0.05$). In thymus TP ($p < 0.001$), GSH and TAU ($p < 0.01$) showed higher differences with respect to the controls than NAC ($p < 0.05$). In peritoneum the four antioxidants showed statistical differences ($p < 0.001$) with the controls, being the immune location in which the antioxidants are most effective.

The chemotaxis indexes (CI) are shown in Fig. 4. GSH was the most effective antioxidant in general ($p < 0.001$ in axillary nodes, thymus and peritoneum, and $p < 0.01$ in spleen). The thymus is the immune location in which, in general, antioxidants were more effective. Table 1 shows the results of CI using the lowest and the highest concentrations of TP and NAC studied in the present work (0.1 mM and 1 mM, respectively), separated and in combination. The results showed that no effect was found with the smallest concentrations of TP and NAC when they were alone, but in combination (TP + NAC) a significant increase ($p < 0.05$) of chemotaxis was observed. The increase of chemotaxis with a combination of 1 mM of TP and NAC was higher ($p < 0.001$) than that with this concentration of the TP ($p < 0.05$) or NAC ($p < 0.01$) alone.

3.4. Adherence

The peritoneal lymphocyte adherence indexes are shown in Table 2. After 10 min of incubation the three antioxidants increased the adherence ($p < 0.01$ for GSH and NAC and $p < 0.001$ for TP). There were no differences with the controls at the other times studied. In order to rule out the possibility that the antioxidants attach themselves to the tube surface and attract the lymphocytes, a group of control tubes was pre-treated with the concentration of each antioxidant. There were no significant differences between the pre-treated and the control tubes.

3.5. Viability

With regard to the viability of lymphocytes from axillary nodes, spleen and thymus incubated with 5 mM of GSH, 1 mM of TP and of NAC and 40 mM of TAU, the results (Table 3) show an increase of the percentage of viability with respect to controls. This enhanced viability is significant statistically for all antioxidants in cells from the three organs at 72 h of incubation ($p < 0.001$ in all organs and with all antioxidants, with the exception of NAC and TAU in spleen, $p < 0.05$). At 48 h of incubation in axillary nodes all the antioxidants showed statistical differences with the control ($p < 0.001$), as well as in spleen ($p < 0.001$ for GSH and TP, $p < 0.01$ for NAC and TAU), whereas in thymus only GSH, TP and TAU ($p < 0.05$) showed statistical differences. At 4, 6 and 24 h of incubation the differences were also statistically significant depending of incubation time, antioxidant and immune organ studied.

Fig. 4. Chemotaxis indexes (CI) of axillary nodes, spleen, thymus and peritoneum lymphocytes from BALB/c mice in the presence of 5 mM glutathion (GSH), 1 mM tioprolin (TP), 1 mM N-acetylcysteine (NAC) and 40 mM taurine (TAU). Each value is the mean ± SD of ten experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ with respect to the corresponding control values.

Table 2

Effect *in vitro* of GSH (5 mM), TP (1 mM) and NAC (1 mM) on the adherence index of peritoneal lymphocytes from BALB/c mice.

Time of Incubation (min)	Controls	GSH	TP	NAC
10	23 ± 4	37 ± 11**	35 ± 8***	41 ± 13**
20	38 ± 7	44 ± 13	44 ± 14	42 ± 11
30	51 ± 12	53 ± 15	54 ± 12	49 ± 15
60	66 ± 13	63 ± 13	68 ± 12	70 ± 12

Each value is the mean ± SD of 8 experiments performed in duplicate. **p < 0.01, ***p < 0.001 with respect to the corresponding control.

3.6. Intracellular glutathione levels

The levels of intracellular total glutathione in leukocytes from axillary nodes, spleen and thymus incubated for 3 h with 5 mM of GSH are shown in Fig. 5. The levels of GSH are higher in control lymphocytes from spleen (p < 0.05) than in those from the other organs. After 3 h of incubation with 5 mM GSH the intracellular levels of this antioxidant increased in the cells from the three organs, but the levels were higher in axillary nodes and thymus (p < 0.001) than in spleen (p < 0.01).

4. Discussion

This work demonstrates the favorable effects *in vitro* of several sulfur-containing antioxidants on relevant functions of lymphocytes from young-adult mice, such as proliferation, mobility and adherence.

Proliferation is one of the most relevant functions of lymphocytes. All the antioxidants studied in the present work increased the proliferation of mouse lymphocytes, especially with the highest concentration used. In a classical study Oberley et al. [42] observed that oxidative stimuli, such as superoxide and hydrogen peroxide, could activate signaling pathways that lead to proliferation. Nevertheless, other work showed clearly that this effect depends on the amount of oxidants [43]. Thus, low levels of hydrogen peroxide induced mitogenic responses and growth stimulation, whereas a considerable increase in the oxidant concentrations caused growth arrest [43]. In fact, although the proliferation of lymphocytes needs

Table 3

Effect *in vitro* of GSH (5 mM), TP (1 mM), NAC (1 mM) and TAU (40 mM) on the viability (%) of lymphocytes from axillary nodes, spleen and thymus from BALB/c mice at different culture times.

	Time					
	1 h	4 h	6 h	24 h	48 h	72 h
Axillary nodes						
Controls	87 ± 5	84 ± 6	81 ± 3	67 ± 10	38 ± 9	29 ± 8
GSH	91 ± 8	88 ± 6	87 ± 5*	79 ± 10*	73 ± 8***	69 ± 13***
TP	88 ± 5	86 ± 5	83 ± 4	69 ± 8	65 ± 13***	56 ± 9***
NAC	90 ± 4	88 ± 4	85 ± 5	79 ± 4*	62 ± 12***	55 ± 8***
TAU	90 ± 4	88 ± 5	83 ± 3	75 ± 8	53 ± 8***	43 ± 9***
Spleen						
Controls	99 ± 4	87 ± 5	80 ± 8	75 ± 6	54 ± 4	50 ± 8
GSH	97 ± 4	94 ± 4**	87 ± 7*	85 ± 4**	75 ± 8***	72 ± 7***
TP	98 ± 5	96 ± 6**	89 ± 7*	82 ± 7*	70 ± 6***	67 ± 6***
NAC	99 ± 2	94 ± 2**	84 ± 6	74 ± 6	60 ± 3**	59 ± 9*
TAU	97 ± 2	92 ± 3**	90 ± 3**	76 ± 7	67 ± 9**	57 ± 6*
Thymus						
Controls	95 ± 7	94 ± 5	90 ± 7	73 ± 8	60 ± 9	30 ± 8
GSH	97 ± 4	99 ± 3*	93 ± 8	79 ± 9	70 ± 8*	60 ± 15***
TP	98 ± 3	98 ± 3*	91 ± 7	75 ± 7	69 ± 8*	44 ± 8***
NAC	95 ± 6	95 ± 3*	94 ± 4*	74 ± 7	60 ± 8	42 ± 7***
TAU	97 ± 4	95 ± 3*	96 ± 4**	79 ± 4*	64 ± 8*	52 ± 8***

Each value is the mean ± SD of 8 experiments performed in duplicate. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 with respect to the corresponding control.

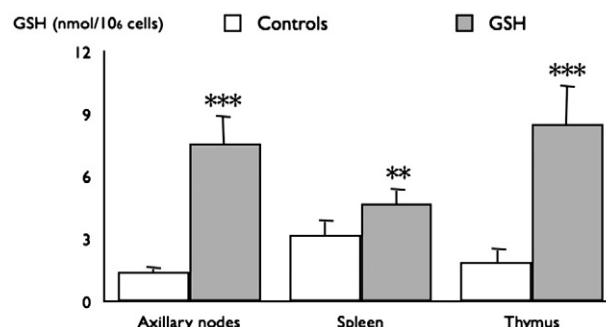


Fig. 5. Intracellular levels of glutathione (GSH) (nmol/10⁶ lymphocytes) in cells of axillary nodes, spleen and thymus of BALB/c mice incubated 3 h with 5 mM of GSH. **p < 0.01, ***p < 0.001 with respect to the corresponding control values. The levels in control cells from spleen are higher than those in axillary nodes (p < 0.05) and thymus (p < 0.01).

certain levels of ROS [44], when there are high ROS concentrations apoptosis occurs [43,45]. Moreover, it has been shown that low levels of ROS in the environment of proliferating cells were not only stimulant, but also needed for correct mitogenic signaling [46]. These studies led to the development of the model of the “redox cycle within a cell cycle”, according to which transient changes in ROS could modify the redox state of cell cycle regulatory proteins and thus lead to progression or arrest of the proliferation [47]. Thus, antioxidants could by scavenging ROS allow oxidant levels that improve the proliferation of lymphocytes. In fact, previous studies have shown that GSH increases proliferation of lymphocytes from human peripheral blood [48] and from rat spleen [49]. NAC, a GSH precursor that also restores its levels [24], increased the intracellular concentrations of GSH and the proliferation of blood lymphocytes from postmenopausal women [28]. Moreover, NAC induced *in vitro* a significant up-regulation of proliferative response of human lymphocytes to mitogens [50]. TP *in vitro* also increased the proliferation of lymphocytes from mice [22]. A diet supplemented with TP or with both antioxidants, NAC and TP, in old mice or prematurely ageing mice, respectively, stimulated the proliferation of their lymphocytes [21,40]. Thus, the present results suggest the idea that the effect on proliferation of lymphocytes observed *in vivo* with these diets is consequence of the direct action of the antioxidants on the immune cells.

Other possible explanation of the effects of the antioxidants studied increasing proliferation of lymphocytes is their role in the viability of these cells. In the present work we have observed that all these antioxidants increase the viability of leukocytes from the three immune organs after different times of incubation, and they already had this effect in cells from spleen and thymus at 4 h. Previous studies showed that GSH decreases apoptosis [16] and that GSH, TP and NAC, in a range of concentrations from 0.5 mM to 5.0 mM, decreased *in vitro* the basal and induced programmed cell death of peritoneal leucocytes [11]. Taurine also inhibits apoptosis of phagocytic [34] and T [39] cells.

Lymphocyte mobility both spontaneous and chemotaxis are increased by the antioxidants studied. Since it is known that deficient levels of endogenous antioxidants are related to a lower chemotaxis [51], this could explain the increase of that function when the sulfur-containing antioxidant studied are administrated *in vitro*. These results agree with those of previous work in which exogenous incorporation of GSH, TP and NAC improved the chemotaxis of peritoneal macrophages from mice [10]. TP and NAC have the same effect in peritoneal lymphocytes [22,26]. It is relevant to mention that in these two studies 0.1 mM of TP and 0.1 mM of NAC showed significant increases of chemotaxis of peritoneal lymphocytes. However, in the present study this concentration was not enough to do it, but we found a significant increase of chemotaxis with 0.1 mM of the two antioxidants together. A possible explanation of these differences is the strain and age of mice. In

the present work young-adult BALB/c mice (17 ± 3 weeks of age) were used, whereas in the previous studies adult (22 weeks of age) Swiss mice (for NAC) and adult (27 weeks of age) BALB/c mice (for TP) were used. Although the different results obtained with the two strains seem understandable, a difference of 12 weeks of age is determinant to obtain a different effect with an antioxidant. A small amount of an antioxidant *in vitro*, such as NAC, has more effect on the lymphocytes of older mice than in those from younger animals [26]. Since the ingestion of a diet supplemented with NAC [26] and with TP+NAC [52] increased chemotaxis in lymphocytes from mice, the present results suggest that this is a direct effect of these antioxidants on the immune cells.

It is possible that the stimulating effect on lymphocyte mobility shown by the antioxidants is carried out through the inhibition of the MIF (migratory inhibiting factor) levels. The expression of this cytokine is related with the increase in the levels of other cytokine, namely TNF- α [53], which is decreased by NAC and possibly by the other antioxidants via an inhibition of the NF- κ B factor [30]. In fact, TAU decreases NF- κ B activation [39].

Adherence of lymphocytes is a function previous to their mobility. Although thiolic antioxidants such as GSH, TP and NAC *in vitro* did not modify this function in peritoneal macrophages [10], in the present work all the antioxidants studied increased adherence of peritoneal lymphocytes at least at a short time of incubation (10 min). An increase in adherence is shown in oxidative stress situations such as endotoxic shock or aging, but in these cases the cells show a decrease in the chemotaxis activity [1,29]. However, a higher adherence can also reveal an activation of cells, even more if these cells have an increased chemotaxis, such as it would be in the case of the lymphocytes in presence of antioxidants investigated in the present work.

Although the positive effects of antioxidants in oxidative stress situations such as endotoxic shock and aging [1,30] can be expected, the activation of the lymphocyte functions studied in the present work in a situation apparently without an oxidative stress as it happens in the immune cells from young-adult mice, could be more difficult to understand. However, there is also an oxidative stress situation in chronologically young mice since they can be biologically older, and the ingestion of a diet supplemented with antioxidants is useful for their immune cells [1,54]. Moreover, several functions of macrophages (cells that use their endogenous antioxidants to perform the phagocytic activity [3]) from adult mice improve after *in vitro* administration of antioxidants [10]. It has been suggested that cells in culture produce more ROS than cells *in vivo* and this is the cause of their lack of antioxidants [55]. Nevertheless, macrophages in culture only consume their endogenous antioxidants when they are working [3]. Thus, the direct effect of the antioxidants on leukocytes observed in the present work could be also explained considering the ROS production of the immune cells in the development of their functions [1,2]. Thus, we can suggest that an appropriate balance between ROS generation and antioxidant defenses is needed to maintain a good leukocyte function. The present results *in vitro* suggest that the improvement of the immune response, and specifically of the lymphocyte functions, found after ingesting diet supplemented with some of the antioxidants studied [1,19–21,26–28,40,52], are due to a direct action of these compounds in the immune cells. In addition, although we have studied the effects of antioxidants *in vitro* on several functions of lymphocytes, these cells, the most abundant in the samples obtained from peritoneum, axillary nodes, spleen and thymus, are present with all the other leukocytes. This simulates, as far as possible, the *in vivo* conditions, where all these cells are together. Moreover, we have observed that when leukocytes are isolated, the functional capacity of each kind of cell changes [56]. The *in vitro* effect found in the present study could be due to the incorporation of the antioxidants into leukocytes. This has been observed for NAC, which is a GSH precursor [24], and also for TP [17]. As regard GSH, although there are some research questioning if its direct administration is a suitable procedure for increasing cell thiol levels since this antioxidant does not enter the

cells easily [57], several studies show the presence of GSH transporter in immune cells as well as that most cell types can metabolize extracellular GSH. Thereafter they internalize the cysteine, which controls the rate of GSH synthesis [58]. Thus, although presently the possible transport of GSH into leukocytes is not generally accepted, in the present work the incubation of leukocytes from axillary nodes, spleen and thymus with 5 mM of GSH increases the intracellular levels of this antioxidant.

Since the immune functions are considered good markers of the health of each individual, of her/his biological age and predictors of longevity, to find out how to maintain an appropriate immune response since the young-adult age is currently one of the more interesting challenges of research. Nevertheless, much more investigation should be carried out in this field, especially to understand the denominated “antioxidant paradox” [55].

Acknowledgements

The authors wish to thank the technical help of Ms Gema Ruedas and Ms Marina Gavin for carrying out the experiment of the study. This work was supported by MICINN (BFU2008-04336); UCM Research Group (910379ENEROINN) grants and RETICEF (RD06/0013/0003) (ISCIII) of Spain.

References

- [1] De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging. The involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* 2009;15:3003–26.
- [2] Knight JA. Review: Free Radicals, Antioxidants, and Immune System. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:145–58.
- [3] Hernanz A, Collazos ME, De la Fuente M. Effect of age, culture medium and lymphocyte presence on ascorbate content of peritoneal macrophages from mice and guinea pigs during phagocytosis. *Int Arch Aller Appl Immunol* 1990;91:166–70.
- [4] Viña JR. Glutathione: Metabolism and Physiological Function. CRC Press Boston; 1990.
- [5] Garcia de la Asuncion J, Pla R, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J, Viña J. Mitochondrial GSH oxidation is correlated with age-related oxidative damage in mitochondrial DNA. *FASEB J* 1996;10:1–6.
- [6] Dröge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol* 2002;37:1333–45.
- [7] Dröge W, Breikreuz R. Glutathione and immune function. *Proc Nutr Soc* 2000;59:595–600.
- [8] Dröge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, et al. Function of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J* 1994;8:1131–8.
- [9] Atalay M, Marnila P, Lilius EM, Hanninen O, Sen CK. Glutathione-dependent modulation of exhausting exercise-induced changes in neutrophil function of rats. *Eur J Appl Physiol* 1996;74:342–7.
- [10] Del Rio M, Ruedas G, Medina S, Victor VM, De la Fuente M. Improvement by several antioxidants of macrophage function *in vitro*. *Life Sci* 1998;63:871–81.
- [11] Pomaki M, Mota MJ, De la Fuente M, Berger J. Effect of thiolic antioxidants on *in vitro* mouse peritoneal macrophage functions. *Comp Clin Path* 2005;13:176–81.
- [12] Ghibelli L, Coppola S, Rotilio G, Lafavia E, Maresca V, Ciriolo MR. Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;216:313–20.
- [13] Franco R, Panayiotidis MI, Cidlowski JA. Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation. *J Biol Chem* 2007;282:30452–65.
- [14] Franco R, DeHaven WI, Sifre MI, Bortner CD, Cidlowski JA. Glutathione depletion and disruption of intracellular ionic homeostasis regulate lymphoid cell apoptosis. *J Biol Chem* 2008;283:36071–87.
- [15] Koval TV, Nazarova OO, Matyshevs'ka OP. Changes in glutathione content in rat thymocytes under apoptosis induced by H₂O₂ or radiation. *Ukr Biokhim Zh* 2008;80:114–9.
- [16] Hammond CL, Madejczyk MS, Ballatori N. Activation of plasma membrane reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;195:12–22.
- [17] Wlodek L, Rommelspacher H, Susilo R, Radomski J, Höfle G. Thiazolidine derivatives as source of free L-cysteine in rat tissue. *Biochem Pharmacol* 1993;46:1917–28.
- [18] Wlodek L, Grabowska A, Marcinkiewicz J. The modulation of IL-2 dependent proliferation of CTL-2 cells by 2-methyl-thiazolidine-2, 4-dicarboxylic acid. *Immunopharmacol* 1995;30:51–8.
- [19] Correa R, Blanco B, Del Rio M, Victor V, Guayerbas N, Medina S, et al. Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. *Biofactors* 1999;10:195–200.
- [20] De la Fuente M, Ferrández MD, Muñoz F, De Juan E, Miquel J. Stimulation by the antioxidant thioproline of the lymphocyte functions of old mice. *Mech Ageing Develop* 1993;68:27–36.

- [21] De la Fuente M, Ferrández MD, Del Rio M, Burgos MS, Miquel J. Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline. *Mech Ageing Develop* 1998;104:213–25.
- [22] Correa R, Del Rio M, De la Fuente M. Improvement of murine immune functions in vitro by thioproline. *Immunopharmacology* 1999;44:281–91.
- [23] Ferrandez MD, Correa R, Del Rio M, De la Fuente M. Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 1999;34:675–85.
- [24] De Flora S, Izzoti A, D'Agostini F, Cesarone CF. Antioxidant activity and other mechanisms of thiol involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am J Med* 1991;91:122–30.
- [25] Gressier B, Cabanis A, Lebegue S, Brunet C, Dine T, Luyckx M, et al. Cazin J.C. Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: comparisons in vitro of some thiol-containing drugs. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1994;16:9–13.
- [26] Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, De la Fuente M. "Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behavior* 2002;73:797–804.
- [27] Guayerbas N, Puerto M, Alvarado C, De la Fuente M. Effect of diet supplementation with N-acetylcysteine on leukocyte functions in prematurely ageing mice. *J Appl Biomed* 2005;3:199–205.
- [28] Arranz L, Fernandez C, Rodriguez A, Ribera JM, De la Fuente M. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Rad Biol Med* 2008;45:1252–62.
- [29] De la Fuente M, Victor VM. Ascorbic acid and N-acetylcysteine improve in vitro the function of lymphocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Rad Res* 2001;35:73–84.
- [30] Victor VM, Rocha M, Esplugues JV, De la Fuente M. Role of free radicals in sepsis: Antioxidant therapy. *Curr Pharm Des* 2005;11:3141–58.
- [31] Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 1992;72:101–63.
- [32] Stipanuk MH, Ueki I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inher Metab Dis* 2010;34:17–32.
- [33] Schuller-Levis GB, Park E. Taurine and its chloramines: modulators of immunity. *Neurochem Res* 2004;29:117–26.
- [34] Kim C, Cha YN. Production of reactive oxygen and nitrogen species in phagocytes is regulated by taurine chloramines. *Adv Exp Med Biol* 2009;643:463–72.
- [35] Ekremoglu M, Türközkan N, Erdamar H, Kurt Y, Yaman H. Protective effect of taurine on respiratory burst activity of polymorphonuclear leukocytes in endotoxemia. *Amino Acids* 2007;32:413–7.
- [36] Mühling J, Nickolaus KA, Matejee R, Langefeld TW, Harbach H, Engel J, et al. Which mechanisms are involved in taurine-dependent granulocytic immune response or amino- and alpha-keto acid homeostasis. *Amino Acids* 2008;34:257–70.
- [37] Farriol M, Venereo Y, Rosselló J, Gomez P, Palao R, Orta X, et al. Effects of taurine on polymorphonuclear phagocytosis activity in burned patients. *Amino Acids* 2002;23:441–5.
- [38] Ergun MA, Soysal Y, Kismet E, Akay C, Dundaroz R, Ilhan M, et al. Investigating the in vitro effect of taurine on the infant lymphocytes by sister chromatid exchange. *Pediatr Int* 2006;48:284–6.
- [39] Maher SG, Condron CE, Bouchier-Hayes DJ, Toomey DM. Taurine attenuates CD3/interleukin-2-induced T cell apoptosis in an in vitro model of activation-induced cell death (AICD). *Clin Exp Immunol* 2005;139:279–86.
- [40] Guayerbas N, Puerto M, Ferrandez MD, De la Fuente M. A diet supplemented with thiolic antioxidants improves leukocyte function in two strains of prematurely ageing mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:1009–14.
- [41] Tietze F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* 1969;27:502–22.
- [42] Oberley LW, Oberley TD, Buettner GR. Cell division in normal and transformed cells: the possible role of superoxide and hydrogen peroxide. *Med Hypotheses* 1981;7:21–42.
- [43] Davies KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB life* 1999;48:41–7.
- [44] Pani G, Colavitti R, Borrello S, Galeotti T. Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes. *Biochem J* 2000;347:173–81.
- [45] Hildeman DA. Regulation of T-cell apoptosis by reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1496–504.
- [46] Pani G, Colavitti R, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Galeotti T. A redox signalling mechanism for density-dependent inhibition of cell growth. *J Biol Chem* 2000;275:38891–9.
- [47] Menon SG, Goswami PC. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* 2007;26:1101–9.
- [48] Smyth M. Glutathione modulates activation-dependent proliferation of human peripheral blood lymphocytes populations without regulating their activated function. *J Immunol* 1991;146:1921–7.
- [49] Pieri C, Moroni F, Recchioni R. Glutathione influences the proliferation as well as the extent of mitochondria activation in rat splenocytes. *Cell Immunol* 1992;145:210–7.
- [50] Viora M, Quaranta MG, Straface E, Vari R, Masella R, Malorni W. Redox imbalance and immune functions: opposite effects of oxidized low-density lipoproteins and N-acetylcysteine. *Immunolo* 2001;104:431–8.
- [51] Ball SS, Weindruch R, Walford RL, Walford R, Harman D, Miquel J. Free radicals. Ageing and degenerative diseases. In: Johnson Jr JE, editor. *Alan R Lis New York*; 1996. p. 427–56.
- [52] De la Fuente M, Guayerbas N, Catalán MP, Victor VM, and Miquel, J. "The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve the immune functions is higher in aged than in adult mice". *Free. Rad Res* 2002;36:119–26.
- [53] Hirokawa J, Sakaue S, Furuya Y, Ishii J, Hasegawa A, Tagami S, et al. Tumor necrosis factor- α regulates the gene expression of macrophage migration inhibitory factor through tyrosine kinase-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Biochem* 1998;123:733–9.
- [54] Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L, De la Fuente M. Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. *Antioxid Redox Signals* 2005;7:1203–10.
- [55] Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 2009;46:531–42.
- [56] De la Fuente M, Medina S. NPY and phagocytic cell functions. In: Zukowska Z, Feuerstein GZ, editors. *Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland*; 2005. p. 107–22.
- [57] Puri RN, Meister A. Transport of glutathione, as glutamylcysteinylglycyl ester, into liver and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:5228–60.
- [58] Seres T, Knickelbein RG, Warshaw JB, RB Jr Johnston. The phagocytosis-associated respiratory burst in human monocytes is associated with increased uptake of glutathione. *J Immunol* 2000;165:3333–40.

ORIGINAL ARTICLE

The antioxidant N-acetylcysteine *in vitro* improves several functions of peritoneal leucocytes from old mice approaching their values to those of adult animals

Mónica De la Fuente¹, Angel Hernanz²

¹Department of Physiology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Spain

²Department of Biochemistry, La Paz Hospital, Madrid, Spain

Received 6th September 2011.

Revised 6th November 2011.

Published online 9th November 2011.

Summary

The age-related deterioration of the function of immune cells, or immunosenescence, is based on oxidative stress (an imbalance between the levels of oxidants and antioxidant defences with an increase of the former). Accordingly, the ingestion of a diet supplemented with thiolic antioxidants such as N-acetylcysteine (NAC), a glutathione precursor, by aged subjects improved their leucocyte functions. The aim of the present study was to show if NAC improves *in vitro* several functions of leucocytes from chronologically old mice and if this antioxidant is able to bring the values of these functions to the levels of those of adult animals. Six concentrations of NAC (in a range from 0.001 mM to 2.5 mM) were investigated on several functions of peritoneal leucocytes from old (78±2 weeks of age) BALB/c mice. These functions were those of the phagocytic process in macrophages, namely: adherence to substrate, directed migration or chemotaxis, phagocytosis of inert particles and superoxide anion levels as a measure of digestion capacity, as well as of the adherence and chemotaxis of lymphocytes. These functions were also studied in peritoneal leucocytes from adult (18±2 weeks of age) mice. The results showed that NAC *in vitro* improves all the functions studied, especially at the highest concentrations, which had shown impaired values in old mice, approaching those of adult animals. Since the immune functions studied are markers of health and predictors of longevity, the administration to aged subjects of NAC, which shows a direct action in leucocytes, seems to be a good strategy to improve their immune system and, therefore, to reach a healthy longevity.

Key words: N-acetylcysteine; immunosenescence; macrophages; lymphocytes; mice

INTRODUCTION

Ageing is accompanied by an impairment of the physiological systems including the immune system.

In fact, it is well known that with the passage of time there is a decrease in resistance to infections and an increase in the autoimmune processes and cancer. This indicates the presence of a less competent immune system, which exerts a great influence on the increasing morbidity and mortality observed in ageing human subjects (Wayne et al. 1990). Moreover, the high death rate found in aged populations is due in great proportion to infectious processes (High 2004). Thus, it is presently accepted that almost every component of the immune system undergoes striking age-associated re-structuring, leading to changes that may include enhanced as well as diminished

✉ Mónica De la Fuente. Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain
mondelaf@bio.ucm.es
34 91 3944935

functions; this fact being denominated immunosenescence (Aw et al. 2007, De la Fuente and Miquel 2009). We have studied the changes in several immune cell functions through age of experimental animals, such as rats and specially mice, and of human beings, and we have observed a similar age-related evolution of many of these functions in immune cells from the peripheral blood of humans and from the peritoneum of mice (De la Fuente 2002, De la Fuente et al. 2004a, b, 2005, 2011a, De la Fuente and Miquel 2009, Arranz et al. 2010). In agreement with the oxidation theory of ageing (Harman 1956, Miquel et al. 1980, Miquel 1998), we have observed that those age-related changes of immune cell functions have as their basis an oxidative and inflammatory stress situation, which has among its intracellular mechanisms the activation of the NF- κ B in the immune cells (De la Fuente et al. 2005, De la Fuente and Miquel 2009, Arranz et al. 2010). Moreover, we have proposed a key involvement of the immune system in the rate of ageing of each organism, since there is a relation between the redox state and functional capacity of the immune cells and the longevity of individuals (De la Fuente and Miquel 2009, Alonso-Fernández and De la Fuente 2011). A confirmation of this role of the immune system in the oxi-inflamm-ageing is that the administration of adequate amounts of antioxidants in the diet, which improves the immune cell functions, decreasing their oxidative stress, in experimental animals and humans, increases the longevity of mice (Arranz et al. 2008, De la Fuente et al. 2008, 2011a, b, De la Fuente and Miquel 2009, De la Fuente 2010).

In this context, we have especially studied the effects of diet supplemented with thiol antioxidants such as N-acetylcysteine (NAC). This antioxidant neutralizes free radicals in a direct manner (Gressier et al. 1994) and is a glutathione precursor (De Flora et al. 1991). Glutathione (GSH) is the principal nonenzymatic antioxidant of the cells and plays a major role in the preservation of an adequate intracellular redox state (Dröge 2002). Moreover, an optimal immune response will require adequate levels of GSH (Dröge and Breikreuz 2000). With ageing, there is a decrease in this GSH content, which has been observed in a variety of cells and tissues, including those of the immune system (Hernanz et al. 2000, Dröge 2005, Arranz et al. 2008). NAC has been studied by many authors because of the wide range of its effects at all cellular levels and with multiple clinical applications (Dodd et al. 2008, Millea 2009). In previous studies we have observed that the ingestion of a diet supplemented with NAC improves many leucocyte functions in adult prematurely ageing mice (Puerto et al. 2002, Guayerbas et al. 2005). In

addition, in postmenopausal women NAC showed similar effects (Arranz et al. 2008). The ingestion of a diet supplemented with NAC and other thiolic precursors namely thioproline, also improved many leucocyte functions in adult, prematurely ageing mice and old animals (Blanco et al. 1999, De la Fuente et al. 2002, Guayerbas et al. 2002b, 2004, De la Fuente 2010). NAC *in vitro* stimulated several functions of lymphocytes and macrophages from adult mice (Del Rio et al. 1998, Pomaki et al. 2005, De la Fuente et al. 2011b) and human subjects (Karlsson et al. 2011). However, the effects *in vitro* of NAC on functions of peritoneal leucocytes from old mice have not yet been studied. Moreover, since the amount of thiol antioxidants in the diet that improve immune function depends on the age of the animals (De la Fuente et al. 2002), the aim of the present work based on the above was to test the effects of a wide range of concentrations of NAC *in vitro* on several functions of peritoneal macrophages and lymphocytes from old mice, and to check if the NAC administration approaches the values obtained in adult mice.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Old (78 \pm 2 weeks of age) and adult (18 \pm 2 weeks of age) female BALB/c mice (*Mus musculus*) (Iffa Credo, France) were used. The mice were specific pathogen free, as tested by Harlan according to FELASA recommendations. Twelve mice of each age were used. They were randomly divided in groups of 6, and each group was housed in a polyurethane box, at a constant temperature (22 \pm 2 °C) in sterile conditions inside an aseptic air negative-pressure environmental cabinet (Flufrance, Cachan, France), on a 12/12 h reversed light/dark cycle. All animals were fed water and standard Sander Mus (A.04 diet from Panlab L.S. Barcelona, Spain) pellets *ad libitum*. The diet was in accordance with the recommendations of the American Institute of Nutrition for laboratory animals. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Complutense University of Madrid (Spain).

Collection of peritoneal leucocytes

After being housed for 2 weeks, mice were sacrificed by cervical dislocation according to the guidelines of the European Community Council Directive 86/6091 EEC, between 8:00 and 10:00 h. The abdomen was cleansed with 70% of ethanol, the abdominal skin was carefully dissected without opening the peritoneum and 4 ml of sterile Hank's solution was

injected intraperitoneally. Then, the abdomen was gently massaged and peritoneal resident cells were removed, allowing the recovery of 85–90% of the injected volume. Macrophages, identified by morphology and non-specific esterase staining, were counted in Neubauer chambers and then adjusted by dilution with Hank's solution to 5×10^5 macrophages/ml. Lymphocytes were also identified by morphology and adjusted to 5×10^5 lymphocytes/ml Hank's medium. The cellular viability, determined in each experiment using the trypan-blue exclusion test, was in all cases higher than 95%.

Antioxidant

N-acetylcysteine (NAC) was purchased from Sigma (St. Louis, USA) and the following concentrations were used: 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM and 2.5 mM dissolved in Hank's solution.

Assays of phagocytic function in peritoneal macrophages

In the peritoneal suspension, with macrophages adjusted to 5×10^5 cells/ml Hank's solution, we carried out a study of the different steps of the phagocytic process, i.e., adherence to tissues, mobility to infectious focus (chemotaxis), phagocytosis of foreign inert material and digestion capacity of this material through the production of intracellular free radicals, namely the superoxide anion, which is the first response in the respiratory burst.

For the quantification of the adherence capacity to the substrate, we observed the adherence to a smooth plastic surface, because it resembles adherence to animal tissue. The method was carried out as previously described (Puerto et al. 2002). Briefly, aliquots of 0.2 ml of the peritoneal suspensions were placed in eppendorf tubes and incubated 10, 20 and 30 min at 37 °C, and after gentle shaking, the number of non-adhered macrophages was determined in Neubauer chambers. The adherence index, AI, was calculated according to the following equation:

$AI = (Mi - Mf / Mi) \times 100$, where Mi is the initial concentration of macrophages (5×10^5 cells/ml) and Mf the final concentration of macrophages in the supernatant (non-adherent cells) after each incubation time.

The chemotaxis assays were performed according to a modification of Puerto et al. (2002) of the original technique described by Boyden (1962), which consists basically in the use of chambers with two compartments separated by a filter (Millipore, Bedford, MA) with a pore diameter of 3 μ m. Aliquots of 0.3 ml of the peritoneal suspension were deposited in the upper compartment of the Boyden chambers.

F-met-leu-phe (Sigma, St. Louis, USA) (a positive chemotactic peptide *in vitro*), at 10^{-8} M, was placed in the lower compartment in order to determine chemotaxis. The chambers were incubated for 3 h at 37 °C and 5% CO₂, and after this time the filters were fixed, stained and the chemotaxis index (C.I.) was determined by counting in an optical microscope (immersion objective) the total number of macrophages in one third of the lower face of the filters.

The latex phagocytosis assay was carried out following a method previously described (Puerto et al. 2002). Aliquots of 0.2 ml of peritoneal suspensions were incubated in culture plates (Sterilin, Teddington, England) for 30 min. To the adherent monolayer, after being washed with PBS (phosphate buffer saline), 0.02 ml latex beads (1.09 μ m diluted to 1% PBS, Sigma, St. Louis, MO) were added. After 30 min of incubation, the plates were washed, fixed and stained and the number of particles ingested by 100 macrophages was counted, being expressed as a phagocytic index (P.I.). The percentage of macrophages with phagocytic capacity (ingesting at least one particle) was also counted and expressed as the phagocytic efficiency (P.E.).

Superoxide anion production was evaluated assessing the capacity of this anion, produced by macrophages, to reduce nitroblue tetrazolium (NBT). This was carried out following the method described by De la Fuente (1985) slightly modified as follows. Aliquots of 0.25 ml of peritoneal suspension were mixed with 250 μ l of NBT (1 mg/ml in PBS, Sigma), 0.05 ml of a latex bead suspension were added to the stimulated samples and 0.05 ml of PBS to the non-stimulated samples. After 60 min of incubation, the reaction was stopped, the samples were centrifuged, and the intracellular reduced NBT was extracted with dioxan (Sigma) and, after centrifugation, the supernatant absorbance at 525 nm was determined. The results were expressed as nmol/10⁶ cells using a pattern curve.

Assays of peritoneal lymphocyte functions

The two functions studied in macrophages that are also carried out by lymphocytes, namely adherence and chemotaxis, were studied in these cells of peritoneal suspension adjusted to 5×10^5 lymphocytes/ml Hank's medium, following similar methods to those described for macrophages.

Statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm S.D of 10 values corresponding to the same number of experiments. Each value is the mean of the data from an assay performed in duplicate. The data were examined

statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) for paired observations (NAC effects in the aged mice), followed by the Scheffer's F post hoc procedure. The ANOVA test for unpaired observations was used for comparing adult and aged mice, followed by the Scheffe's F test. The normality of the samples was confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test. We used the significance level $2\alpha=0.05$.

RESULTS

The percentages of macrophages and lymphocytes obtained in the peritoneal suspensions from adult and old mice were 39 ± 11 and 30 ± 13 for macrophages and 61 ± 11 and 70 ± 13 for lymphocytes, respectively.

The adherence and chemotaxis capacities of macrophages are shown in Fig. 1. The adherence indexes (Fig. 1A) at 10, 20 and 30 minutes of incubation in macrophages from old mice were higher (statistically significant) than those in cells from adult animals. The presence of NAC decreased the adherence indexes, the differences being statistically significant at 10 and 20 minutes of incubation with 0.1 mM, 1 mM and 2.5 mM. Thus, the adherence indexes with 2.5 mM (at 10 min of incubation) and with 1 mM (at 10 and 20 min of incubation) were similar to those in adult mice. The chemotaxis indexes (Fig. 1B) in macrophages from old mice, which in the controls were lower (statistically significant) than those in adult animals, increased in the presence of NAC. This antioxidant from 0.01 to 2.5 mM stimulated the chemotaxis, showing statistically significant differences with respect to the values of old controls. However, this increase did not reach indexes similar to those in adult mice, since in all cases the values were significantly lower than in adult animals.

The results of the phagocytosis capacity, both phagocytic index (P.I.) and phagocytic efficiency (P.E.) (Fig. 2), show decreased values (statistically significant) in macrophages from old mice in comparison to those from adult animals. NAC increased the P.I. (Fig. 2A) in macrophages from old mice (with the exception of the concentration of 2.5 mM), showing statistically significant differences with the concentrations of 0.01, 0.1 and 1 mM. The levels of P.I. with the highest concentration of 2.5 mM were significantly lower than those with 1 and 0.1 and 0.01 mM of NAC. The values of P.I. with all concentrations of NAC were significantly lower than those in adult mice. With respect to the P.E. (Fig. 2B) the concentration of 1 mM of NAC

was the only one that significantly increased this index, however these values did not reach those of macrophages from adult animals.

The levels of superoxide anion, both basal and stimulated (Fig. 3) were significantly increased in cells from old mice in comparison to those from adult animals. However, the concentrations of 0.1 and 1 mM of NAC significantly increased these levels in both basal and stimulated samples.

The adherence and chemotaxis capacities of lymphocytes are shown in Fig. 4. The adherence indexes (Fig. 4A) were higher (statistically significant) in lymphocytes from old mice than in those from adult animals at 10 min of incubation. NAC significantly decreased the adherence indexes at this time of incubation with 0.1 mM, 1 mM and 2.5 mM. With 1 mM of NAC the values at 10 min of incubation were similar to those in lymphocytes from adult mice. The chemotaxis of lymphocytes (Fig. 4B) was significantly decreased in cells from old mice in comparison with those from adult animals. No statistically significant differences were found in the presence of NAC.

DISCUSSION

NAC *in vitro* improved several functions of peritoneal macrophages and lymphocytes from old mice, which showed values quite similar to those in adult animals. This fact suggests that the positive effects on these immune functions caused by diet supplementation with this antioxidant in adult prematurely ageing mice (Guayerbas et al. 2005) are, at least in part, due to a direct action on the immune cells. The results obtained in the present study corroborate that the deterioration of immune cells with ageing is linked to oxygen stress and that the administration of adequate amounts of the antioxidant NAC preserves an appropriate function of the immune cells in the ageing process (De la Fuente et al. 2005, 2011a, De la Fuente and Miquel 2009).

The functions of macrophages studied in the present work are the consecutive steps of the phagocytic process, which is carried out by phagocytic cells in their defensive activity against infections. In this process the first step involves the adherence of cells to tissue substrate, which is followed by the migration of these cells to the focus of the infection through a chemical gradient (chemotaxis). With ageing, peritoneal macrophages increase adherence capacity and decrease chemotaxis (De la Fuente et al. 2004b, De la Fuente and Miquel 2009, Arranz et al. 2010). These changes have also

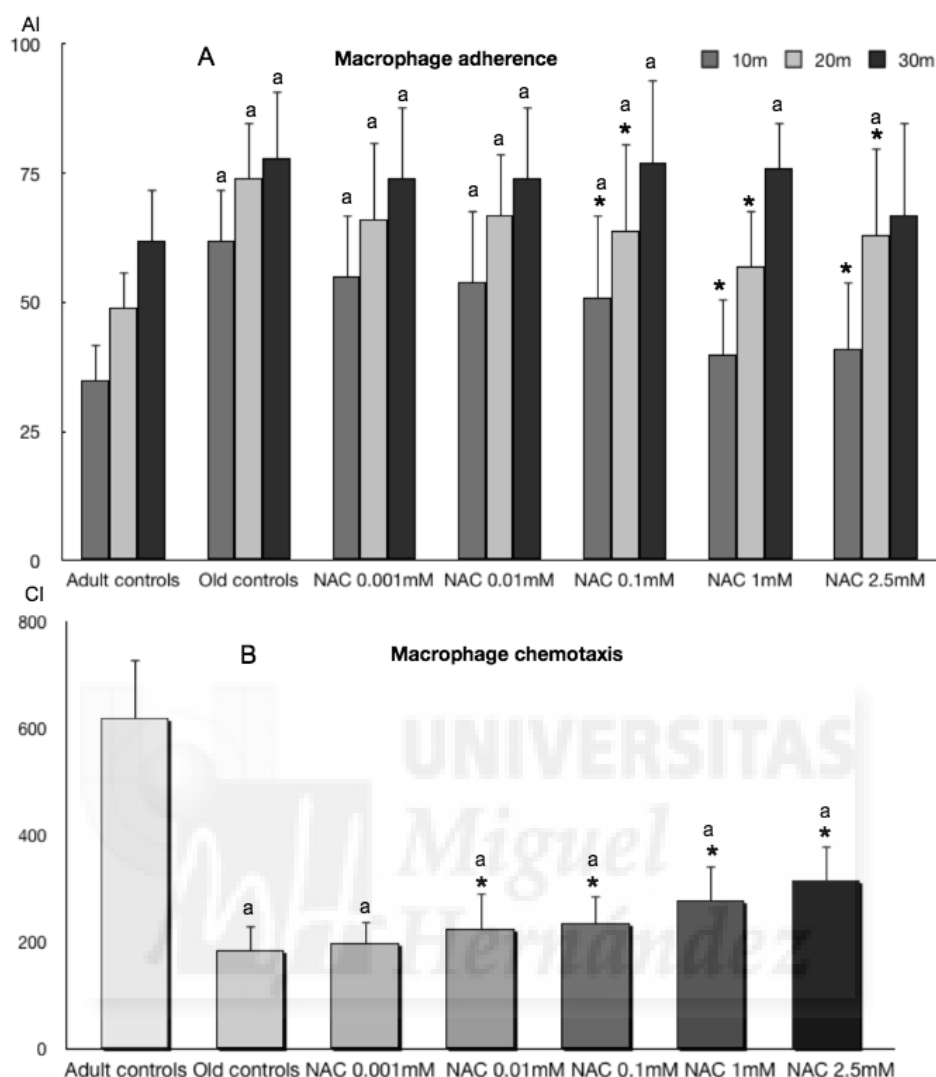


Fig. 1. **Adherence of macrophages (A)** and chemotaxis of macrophages (B) in peritoneal leukocytes from old BALB/c mice incubated with 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 2.5 mM of N-acetylcysteine (NAC), as well as those indexes in cells from adult mice. Each column represents the mean \pm SD of 12 values corresponding to 12 animals, with each value being the mean of duplicate assays. AI, adherence index following 10, 20 and 30 min of incubation; CI, chemotaxis index; * statistically significant as compared with the corresponding old control values; ^a statistically significant versus the corresponding values in adult controls.

been observed in the present study and show the oxidative stress that old mice suffer. This is related to the increase of adhesion molecules involving activation of NF- κ B (Lavie et al. 2005, Victor et al. 2005, Arranz et al. 2010). An oxidative stress situation is also linked to a release of the migration inhibitor factor (MIF) (Hirokawa et al. 1998, Victor et al. 2005), which could explain the decrease of chemotaxis in leucocytes from old mice.

NAC decreases the adherence capacity in macrophages from old mice at 0.1 mM, 1 mM and 2.5 mM, especially at 10 and 20 min of incubation, with

the values of this function being more similar to those in adults. When we studied the effects of NAC (0.1 to 5 mM) *in vitro* on the adherence of macrophages from adult mice, no change (Del Rio et al. 1998, Puerto et al. 2002, Pomaki et al. 2005) or increase (Victor and De la Fuente 2002) were found. Thus, NAC modulates adherence of macrophages, not affecting or increasing this function when cells are from adult animals, but decreasing it in macrophages from old mice, in which the oxidative stress situation of the animals is shown with an increased adherence (De la Fuente et al. 2005, De la Fuente and Miquel 2009).

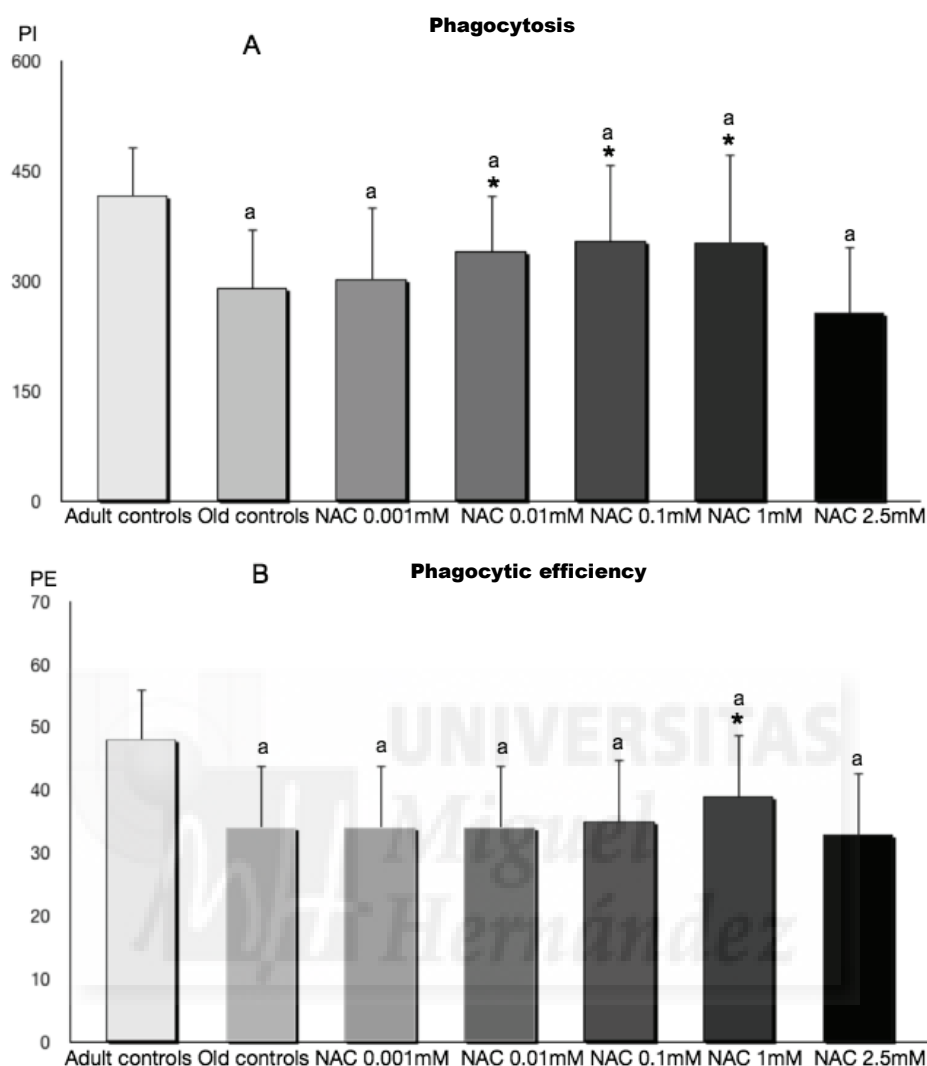


Fig. 2. **Phagocytosis of latex particles (A) and phagocytic efficiency (B)** in peritoneal leukocytes from old BALB/c mice incubated with 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 2.5 mM of N-acetylcysteine (NAC), as well as those indexes in cells from adult mice. Each column represents the mean \pm SD of 12 values corresponding to 12 animals, with each value being the mean of duplicate assays. PI, phagocytosis index, number of particles ingested by 100 macrophages; PE, number of macrophages ingesting at least one particle per 100 macrophages; symbols as in Fig. 1.

Similar results, namely a decrease of the peritoneal macrophage adherence capacity in the presence of NAC, were obtained in cells from adult mice with lethal endotoxic shock, a situation with an acute oxidative stress that increases the adherence of these phagocytes (Victor and De la Fuente 2002).

Chemotaxis was stimulated by NAC, especially in the highest concentrations. Similar results were obtained in the macrophages from adult mice (Del Rio et al. 1998, Puerto et al. 2002, Victor and De la

Fuente 2002). Several studies have found a relation between the supplementation and deficiency of antioxidants, and the increase or decrease of chemotaxis, respectively (Bendich 1989, De la Fuente et al. 2000). In addition, NAC administration to postmenopausal women, which showed a decreased chemotaxis of peripheral blood neutrophils, increased this function (Arranz et al. 2008). Moreover, in prematurely ageing mice, with a decreased chemotaxis in the peritoneal macrophages, the

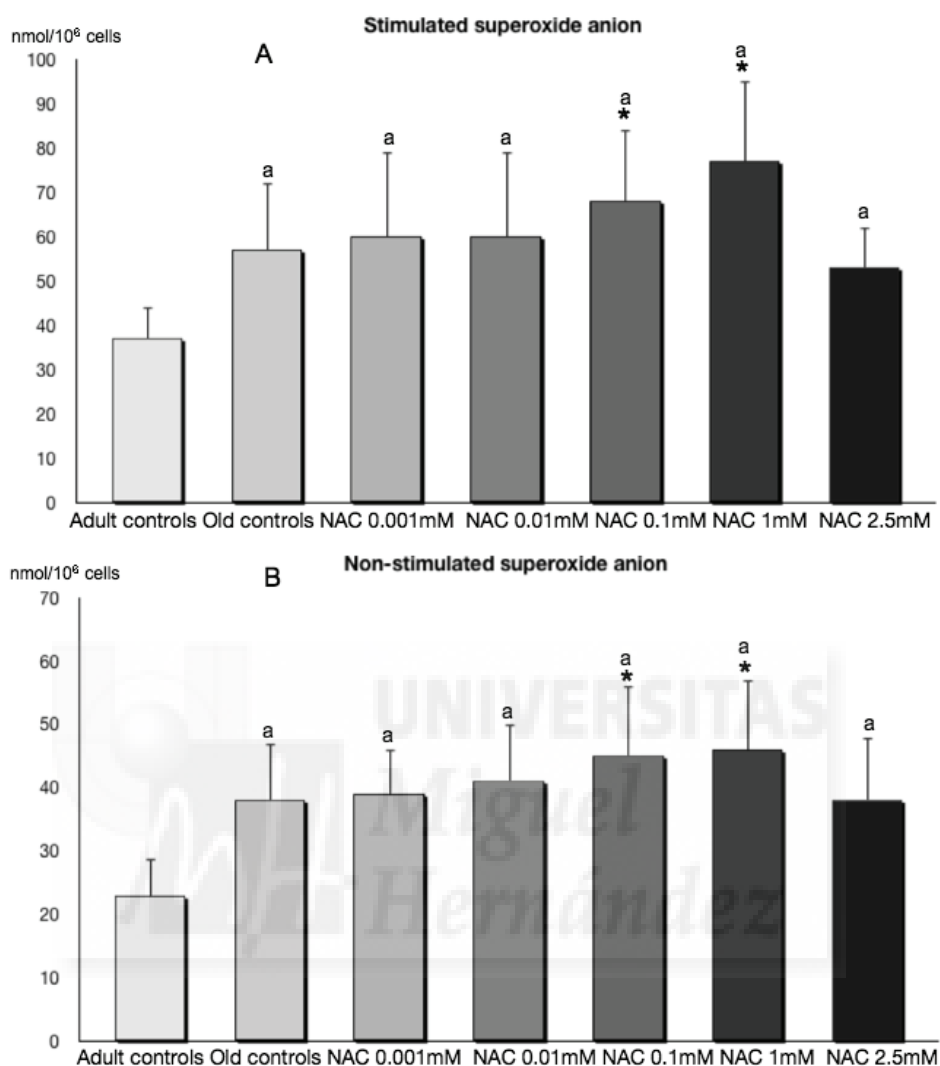


Fig. 3. **Superoxide anion levels of samples stimulated with latex particles** (stimulated superoxide anion) (A) **and without latex particles** (non-stimulated superoxide anion) (B) in peritoneal leukocytes from old BALB/c mice incubated with 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 2.5 mM of N-acetylcysteine (NAC), as well as those indexes in cells from adult mice. Each column represents the mean \pm SD of 12 values corresponding to 12 animals, with each value being the mean of duplicate assays. Symbols as in Fig. 1.

administration of diet with NAC increases this function (Puerto et al. 2002, Guayerbas et al. 2005). These effects could be due to the direct action of NAC on phagocytic cells from old subjects, since in the present study we have observed an increase of chemotaxis in the presence of NAC *in vitro*. This stimulation of chemotaxis in macrophages from animals with an oxidative stress situation and a decreased chemotaxis was also found in cells from adult mice with a lethal endotoxic shock, in which

NAC acted decreasing the high activation of NF- κ B caused by endotoxin in the immune cells (Victor and De la Fuente 2002, 2003, Victor et al. 2005).

An adequate chemotaxis capacity that allows the phagocytes to reach the focus of the infection is followed by the ingestion of foreign agents. The phagocytic capacity decreases with ageing (De la Fuente et al. 2004b, De la Fuente and Miquel 2009, Arranz et al. 2010), and this fact is also observed in the present work in both activities, the percentage of

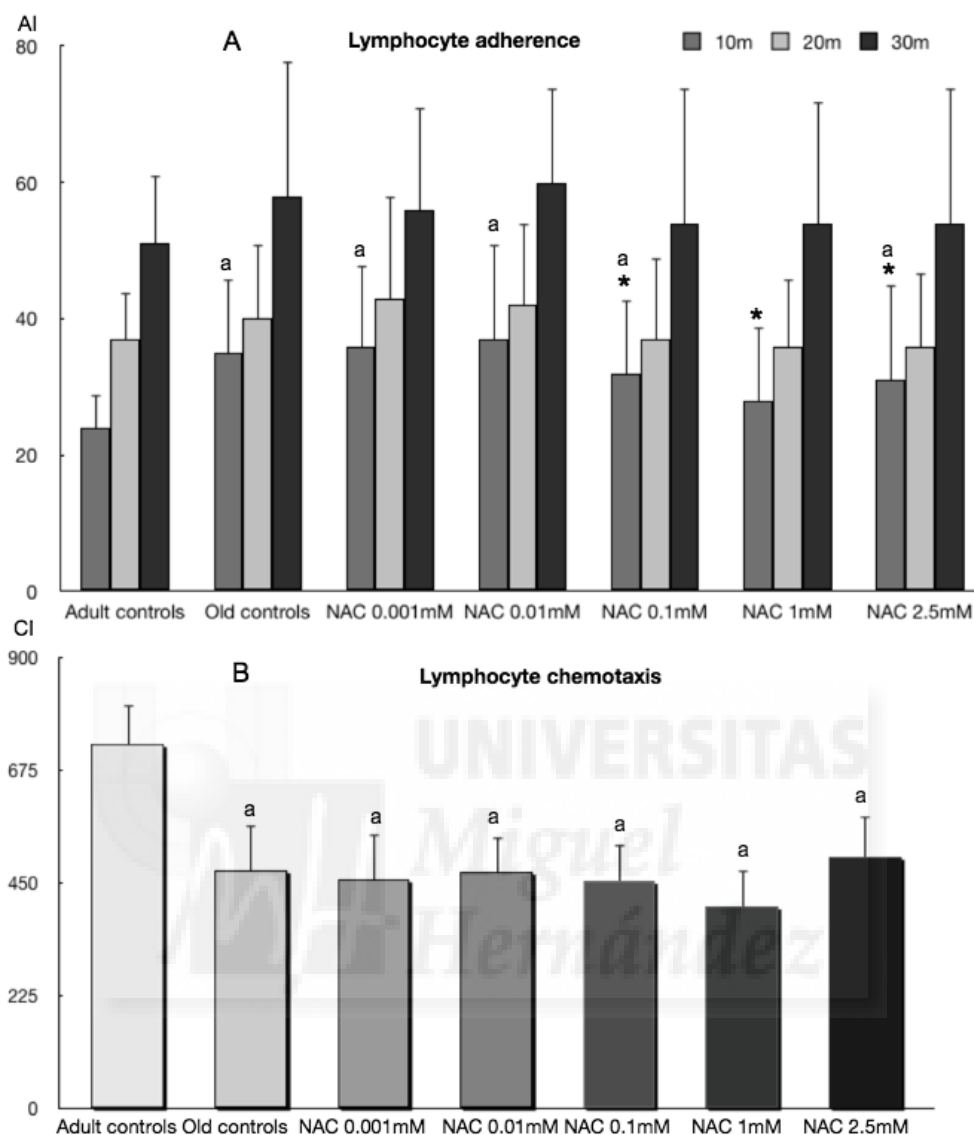


Fig. 4. **Adherence (A) and chemotaxis of peritoneal lymphocytes (B)** from old BALB/c mice incubated with 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 2.5 mM of N-acetylcysteine (NAC), as well as those indexes in cells from adult mice. Each column represents the mean \pm SD of 12 values corresponding to 12 animals, with each value being the mean of duplicate assays; AI, adherence index following 10, 20 and 30 min of incubation; CI, chemotaxis index; other symbols as in Fig. 1.

particles ingested (phagocytic index) and of macrophages ingesting at least a particle (phagocytic efficiency). Previous work showed that peritoneal macrophages use their endogenous antioxidants when they are phagocytosing (Hernanz et al. 1990). This could explain why NAC and other antioxidants *in vitro* increase the phagocytosis of macrophages from adult mice (Del Rio et al. 1998, Puerto et al. 2002, Victor and De la Fuente 2002, Pomaki et al. 2005). In

macrophages from old mice this effect is shown with 0.1 and 1 mM, but not with 2.5 mM, although this concentration is effective in macrophages from adult mice (Puerto et al. 2002, Victor and De la Fuente 2002). Previous studies also showed that a higher concentration of a thiol antioxidant produces a lesser effect on phagocytosis than other lower concentrations, as observed with GSH (Del Rio et al. 1998). Moreover, no effect on phagocytosis was found with

5 mM of NAC in macrophages from adult mice, but an increase of this function was found with lower concentrations (Pomaki et al. 2005). Although the amount of thiolic antioxidant such as NAC and thioproline that adult and old animals have to ingest with diet to improve phagocytic function was higher in old mice than in adult animals (De la Fuente et al. 2002), this it is not observed *in vitro*. It is possible that *in vitro* a high concentration of NAC neutralizes so much of the reactive oxygen species (ROS) produced by the cell, that it cannot carry out its function adequately. It is known that leucocytes produce ROS as chemical weapons to incapacitate pathogens and malignant cells and as modulators of gene expression, regulating the biosynthesis of many immune mediators (Knight 2000, Yoon et al. 2002). Moreover, macrophages are the immune cells more clearly involved in the oxidant generation, since they use free radicals in order to perform their defensive functions such as the phagocytic activity (De la Fuente 2008, De la Fuente and Miquel 2009). It is possible that another imbalance ROS/antioxidant appears with lower levels of ROS than those that cell needs when there are high concentrations of NAC *in vitro*. In addition, in a recent study, moderate concentrations of NAC *in vitro* (0.4–3.2 mM) increased alloantigen-induced proliferation, the expression of activation markers CD25 and CD71 on T cells, and the production of IFN- γ and IL-10, whereas high concentrations of NAC (12.5–50 mM) were suppressive (Karlsson et al. 2011). The results *in vivo* on old subjects commented on above, suggest that the alterations of the digestive tract and in the passage of the antioxidants through the gut, that appear with ageing, only allow adequate levels of these compounds to get to the immune cells in old animals when the amount of the antioxidant in the diet is high.

In the presence of a phagocytic stimulus, macrophages initiate what is known as the respiratory burst, characterized by the production of free radicals, the first of which is the superoxide anion. The levels of this free radical in the phagocytes of old mice increase in comparison to that of adult animals (De la Fuente et al. 2002, Guayerbas et al. 2002a), although we have found opposite results (De la Fuente et al. 2004b, 2011a). In previous work we have observed increased levels of intracellular superoxide anion in macrophages from adult mice after *in vitro* treatment with NAC (Del Rio et al. 1998, Victor and De la Fuente 2002). This effect was also found with GSH (Del Rio et al. 1998), an antioxidant that also increases neutrophil oxidative burst activity (Atalay et al. 1996). These results show that the neutralizing capacity of NAC does not interfere with the

generation of superoxide anion. Thus, it has been observed that some antioxidants can efficiently neutralize extracellular phagocyte-derived oxidants without affecting the bactericidal oxygen radicals inside the intracellular phagosomes (Jariwalla and Harakeh 1996). Moreover, antioxidants such as ascorbic acid increase the activity of the hexose monophosphate shunt in neutrophils leading to the synthesis of NADPH, which is needed for the reduction of molecular oxygen to superoxide anion, as well as increased NBT reduction (Anderson 1979). This fact could explain the increments obtained in both non-stimulated and stimulated cells in the presence of NAC. Moreover, under appropriate conditions, superoxide anion can be generated as a consequence of radical scavenging by thiol antioxidants like GSH in conditions usually found intracellularly. Then, superoxide would act as a radical sink being removed enzymatically by SOD (Winterbourn 1993). In addition, ingestion of a diet supplemented with thioproline and NAC increases the levels of superoxide anion (De la Fuente et al. 2002) or preserves these levels (Blanco et al. 1999) in the peritoneal leukocytes from adult mice.

With respect to the adherence and chemotaxis of lymphocytes – two functions that these cells share with phagocytes – the changes with ageing were similar to those in macrophages. In previous studies we have also observed an age-related increase of adherence and a decrease of chemotaxis in lymphocytes from old mice, adult prematurely ageing mice and old men and women (Guayerbas et al. 2002b, Viveros et al. 2007, Arranz et al. 2008, De la Fuente et al. 2008, De la Fuente and Miquel 2009). Similar changes have been shown in peritoneal lymphocytes from mice with endotoxic shock, a model of an acute oxidative stress situation (De la Fuente and Victor 2000). The presence of NAC *in vitro*, decreased the adherence, at least with 0.1 to 2.5 mM and at 10 min of incubation, but it did not modify the chemotaxis in lymphocytes from old mice. It is interesting to consider that in peritoneal lymphocytes from adult mice, 1 mM of NAC *in vitro* increases the adherence capacity of these cells, as well as their chemotaxis (De la Fuente et al. 2011b).

The role as immuno-modulators of antioxidants, such as NAC, bringing back altered immune function to more optimum values, has been observed in previous studies. Thus, in mice with lethal endotoxic shock, in which the peritoneal lymphocytes show increased adherence and depressed chemotaxis, NAC decreased adherence and increased chemotaxis; however, this antioxidant increased both functions in control animals (De la Fuente and Victor 2000). Moreover, in lymphocytes from chronologically adult

mice, but with premature ageing, which showed higher adherence capacity than these cells from the non prematurely ageing partners, NAC *in vitro* decreased this function in cells from the prematurely ageing but increased the function in those of non-prematurely ageing animals (Puerto et al. 2002).

In conclusion, our results support the proposal that NAC acts directly on the leucocytes and that the positive effects on the immune cell functions shown after administration of diet supplemented with NAC could be due, at least in part, to this direct effect and not only to the increase of intracellular GSH levels that produce NAC (Arranz et al. 2008). Thus, NAC may have benefits above other antioxidants, probably because of both its direct and GSH-mediated effects. Moreover, NAC increases *in vitro*, at least with concentrations of 0.5 mM, the activity of antioxidant enzymes such as catalase (Pomaki et al. 2005). This capacity of up-regulation of intracellular antioxidant defences has been proposed as a better way of improving the antioxidant status of the organism than the supplementation with higher amount of antioxidants (Viña et al. 2007). Thus, the NAC administration could be proposed as a good strategy to slow down ageing and therefore, reach a healthy longevity. However, more studies are required to clarify if the administration of antioxidants to old subjects is useful or not to control the rate of ageing. The results, although in the case of NAC are not as contradictory as with other antioxidants, are still not conclusive, and the issue of the amount of antioxidant effective (Halliwell 2009) need to be investigated further.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by MICINN (BFU2008-04336 and BFU2011-30336); UCM Research Group (910379ENEROINN) grants and RETICEF (RD06/0013/0003) (ISCIII) of Spain.

REFERENCES

- Alonso-Fernández P, De la Fuente M. Role of the immune system in aging and longevity. *Curr Aging Sci.* 4: 78–100, 2011.
- Anderson R. Effects of ascorbate on leukocytes: Part II. Effects of ascorbic acid and calcium and sodium ascorbate on neutrophil phagocytosis and post-phagocytic metabolic activity. *S Afr Med J.* 56: 401–404, 1979.
- Arranz L, Fernández C, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic Biol Med.* 45: 1252–1262, 2008.
- Arranz L, Caamano J, Lord JM, De la Fuente M. Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: Possible role of nuclear factor- κ B. *J Gerontol Biol Sci.* 65A: 941–950, 2010.
- Atalay M, Marnila P, Lilius EM, Hanninen O, Sen CK. Glutathione-dependent modulation of exhausting exercise-induced changes in neutrophil function of rats. *Eur J Appl Physiol.* 74: 342–347, 1996.
- Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* 120: 435–446, 2007.
- Bendich A. Interaction between antioxidant vitamin C and E and their effect on immune responses. In Miquel J, Quintanilla AT, Weber H (eds.): *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine. II.* CRC press, Boca Raton 1989, pp. 153–160.
- Blanco B, Fernández MD, Correa R, Del Rio M, Guaza C, Hernanz A, De la Fuente M. Changes in several functions of murine peritoneal macrophages by N-acetylcysteine and thioproline ingestion. Comparative effect between two strains of mice. *BioFactors.* 10: 179–185, 1999.
- Boyden SV. The chemotaxis effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 115: 453–466, 1962.
- De Flora S, Izzoti A, D'Agostini F, Cesarone CF. Antioxidant activity and other mechanisms of thiol involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am J Med.* 91: 122–130, 1991.
- De la Fuente M. Changes in the macrophage function with aging. *Comp Biochem Physiol.* 81A: 935–938, 1985.
- De la Fuente M. Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr.* 56: S5–S8, 2002.
- De la Fuente M. Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation.* 15: 213–223, 2008.
- De la Fuente M. Murine models of premature ageing for the study of diet-induced immune changes. Improvement of leukocyte functions in two strains of old prematurely ageing mice by dietary supplementation with sulphur-containing antioxidants. *Proc Nutr Soc.* 69: 651–659, 2010.
- 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.* 15: 3003–3026, 2009.
- De la Fuente M, Victor VM. Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol.* 78: 49–54, 2000.
- De la Fuente M, Carazo M, Correa R, Del Rio M. Changes in macrophage and lymphocyte functions in guinea-pigs after different amounts of vitamin E ingestion. *Brit J Nutr.* 84: 25–29, 2000.
- De la Fuente M, Guayerbas N, Catalán MP, Victor VM, Miquel J. The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve the immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Radic Res.* 36: 119–126, 2002.
- De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, F-Tresguerres JA. Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology.* 5: 389–400, 2004a.
- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, Alvarado C. Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol.* 50: OL683–OL690, 2004b.
- De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo MC. The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal* 7: 1356–1366, 2005.
- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F. Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic Res.* 42: 272–280, 2008.
- De la Fuente M, Cruces J, Hernandez O, Ortega E. Strategies to improve the functions and redox state of the immune system in aged subjects. *Curr Pharm Des.* 17: 3966–3983, 2011a.
- De la Fuente M, Hernanz A, Viniegra S, Miquel J. Sulfur-containing antioxidants increase *in vitro* several functions of lymphocytes from mice. *Int Immunopharmacol.* 11: 661–669, 2011b.
- Del Rio M, Ruedas G, Medina S, Victor VM, De la Fuente M. Improvement by several antioxidants of macrophage function *in vitro*. *Life Sci.* 63: 871–881, 1998.
- Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther.* 8: 1955–1962, 2008.
- Dröge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol.* 37: 1333–1345, 2002.
- Dröge W. Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome? *Philos Trans R Soc B.* 360: 2355–2372, 2005.
- Dröge W, Breikreuz R. Glutathione and immune function. *Proc Nutr Soc.* 59: 595–600, 2000.
- Gressier B, Cabanis A, Lebegue S, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC. Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: comparisons *in vitro* of some thiol-containing drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 16: 9–13, 1994.
- Guayerbas N, Catalán M, Victor VM, Miquel M, De la Fuente M. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Brain Behav Res.* 134: 41–48, 2002a.
- Guayerbas N, Puerto M, Ferrandez MD, De la Fuente M. A diet supplemented with thiolic antioxidants improves leukocyte function in two strains of prematurely ageing mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29: 1009–1014, 2002b.
- Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, De la Fuente M. Improvement of the macrophage functions in premature ageing mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. *Cell Mol Biol.* 50: OL677–OL681, 2004.
- Guayerbas N, Puerto M, Alvarado C, De la Fuente M. Effect of diet supplementation with N-acetylcysteine on leukocyte functions in prematurely ageing mice. *J Appl Biomed.* 3: 199–205, 2005.
- Halliwell B. The wandering of a free radical. *Free Radic Biol Med.* 46: 531–542, 2009.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 2: 298–300, 1956.
- Hernanz A, Collazos ME, De la Fuente M. Effect of age, culture media and lymphocyte presence in ascorbate content of peritoneal macrophages from mice and guinea pigs during phagocytosis. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 91: 166–170, 1990.
- Hernanz A, Fernández-Vivancos E, Montiel C, Vázquez JJ, Arnalich F. Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci.* 67: 1317–1324, 2000.
- High KP. Infection as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing Res Rev.* 3: 1–14, 2004.
- Hirokawa J, Sakaue S, Furuya Y, Ishii J, Hasegawa A, Tagami S, Kawakami Y, Sakai M, Nishi S, Nishihira J. Tumor necrosis factor- α regulates the gene expression of macrophage migration inhibitory factor through tyrosine kinase-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Biochem.* 123: 733–739, 1998.
- Jariwalla RJ, Harakeh S: Antiviral and immunomodulatory activities of ascorbic acid. *Subcell Biochem.* 25: 213–231, 1996.

- Karlsson H, Nava S, Remberger M, Hassan M, Ringden O. Eur J Immunol. 41: 1143–1153, 2011.
- Knight JA. Review: Free Radicals, Antioxidants, and immune system. Ann Clin Lab Sci. 30: 145–158, 2000.
- Lavie L. Sleep-disordered breathing and cerebrovascular disease: a mechanistic approach. Neurol Clin. 23: 1059–1075, 2005.
- Millea PJ. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. Am Fam Physician. 80: 265–269, 2009.
- Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. Exp Gerontol. 33: 113–126, 1998.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE, Jr. Mitochondrial role in cell aging. Exp Gerontol. 15: 575–591, 1980.
- Pomaki M, Mota MJ, De la Fuente M, Berger J. Effect of thiolic antioxidants on *in vitro* mouse peritoneal macrophage functions. Comp Clin Path. 13: 176–181, 2005.
- Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, De la Fuente M. Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. Pharmacol Biochem Behav. 73: 797–804, 2002.
- Victor VM, De la Fuente M. N-acetylcysteine improves *in vitro* the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Free Radic Res. 36: 33–45, 2002.
- Victor VM, De la Fuente M. Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF- κ B. Free Radic Res. 37: 19–27, 2003.
- Victor VM, Rocha M, Esplugues JV, De la Fuente M. Role of free radicals in sepsis: Antioxidant therapy. Curr Pharm Des. 11: 3141–3158, 2005.
- Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borras C. Fostering antioxidant defences: up-regulation of antioxidant genes or antioxidant supplementation? Br J Nutr. 98: S36–S40, 2007.
- Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence. Neuroimmunomodulation. 14: 157–162, 2007.
- Wayne SL, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. J Gerontol. 45: M45–48, 1990.
- Winterbourn CC. Superoxide as an intracellular radical sink. Free Radic Biol Med. 14: 85–90, 1993.
- Yoon SO, Yun ChH, Cheng AS. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. Mech Ageing Dev. 50: 1–8, 2002.

An Update of the Oxidation-Inflammation Theory of Aging: The Involvement of the Immune System in *Oxi-Inflamm-Aging*

Mónica De la Fuente* and Jaime Miquel

Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

Abstract: The aging process is one of the best examples of the effects of a deterioration of homeostasis, since aging is accompanied by an impairment of the physiological systems including the homeostatic systems such as the immune system. We propose an integrative theory of aging providing answers to the how (*oxidation*), where first (*mitochondria of differentiated cells*) and why (*pleiotropic genes*) this process occurs. In agreement with this oxidation-mitochondrial theory of aging, we have observed that the age-related changes of immune functions have as their basis an oxidative and inflammatory stress situation, which has among its intracellular mechanisms the activation of NF κ B in immune cells. Moreover, we have also observed that several functions of immune cells are good markers of biological age and predictors of longevity. Based on the above we have proposed the theory of oxidation-inflammation as the main cause of aging. Accordingly, the chronic oxidative stress that appears with age affects all cells and especially those of the regulatory systems, such as the nervous, endocrine and immune systems and the communication between them. This fact prevents an adequate homeostasis and, therefore, the preservation of health. We have also proposed a key involvement of the immune system in the aging process of the organism, concretely in the rate of aging, since there is a relation between the redox state and functional capacity of the immune cells and the longevity of individuals. Moreover, the role of the immune system in senescence could be of universal application. A confirmation of the central role of the immune system in oxi-inflamm-aging is that the administration of adequate amounts of antioxidants in the diet, improves the immune functions, decreasing their oxidative stress, and consequently increases the longevity of the subjects.

Key Words: Aging, oxidative stress, inflammation, immune system, oxi-inflamm-aging, antioxidants.

INTRODUCTION

Although in a now classic article published in 1957 Medawar [1] describes “aging” as an “unsolved problem of biology”, the great amount of research carried out since that time allows us to approach an understanding of aging. However, often if an excess of information is not well understood, it can blur the field of study and lead to wrong conclusions. In this review, after a brief exposition of the general characteristics of aging, the difference between maximum and mean longevity, and the theories that have tried to explain this biological process, we suggest an integrative theory of aging in which the vulnerability of the mitochondrial genome to oxidative injury in differentiated postmitotic cells [2,3] has a key relevance. Moreover, we define more clearly our oxidation-inflammation theory and the role that the immune system can have modulating the rate of aging [4,5]. Since immune cells are present in all animals, this role of the immune system can be of universal application. We suggest an evolutionary mechanism for the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. Health maintenance, which is the base of a functional longevity, depends on the preservation of homeostasis, and balance at all physiological levels, the typical characteristic of homeostasis, is more difficult to maintain with aging. In fact, the homeostatic systems such as the nervous, endocrine and immune systems

suffer an impairment with aging. This loss of homeostasis is established at a different rate in each subject, which is shown by a different biological age. Moreover, this rate is the result of individual epigenetic mechanisms acting on genes, from fetal life, throughout the life of the subject (Fig. 1).

Aging can be neither “cured” nor “eliminated”, it can only be mitigated, i.e.: to make the process slower. This is possible through the modulation of environmental factors such as nutrition. Thus, based on the oxidation-inflammation that underlies the aging process, the administration of adequate amount of antioxidants, which also show anti-inflammatory properties, could be a good strategy to avoid the excessive oxidative and inflammatory stress of aging and, consequently to improve health and increase longevity. Since the immune function is a good marker of health and biological age and a predictor of longevity, the effects of strategies using environmental factors or life style, such as the adequate ingestion of antioxidants, can be analyzed through the study of this homeostatic immune system. The last part of this review collects information in this regard and we present original data on the effects *in vitro* of thiolic antioxidants on several functions of lymphocytes from old mice.

CHARACTERISTICS OF THE AGING PROCESS

The aging process is one of the best examples of the effects of an impaired homeostasis. Thus, aging may be defined as a progressive and general decrease of the organism functions that leads to a lower ability to adaptively react to

*Address correspondence to this author at the Departamento de Fisiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, José Antonio Novais 2, 28040 Madrid, Spain; Tel: 913944989; Fax: 913944935; E-mail: mondelaf@bio.ucm.es

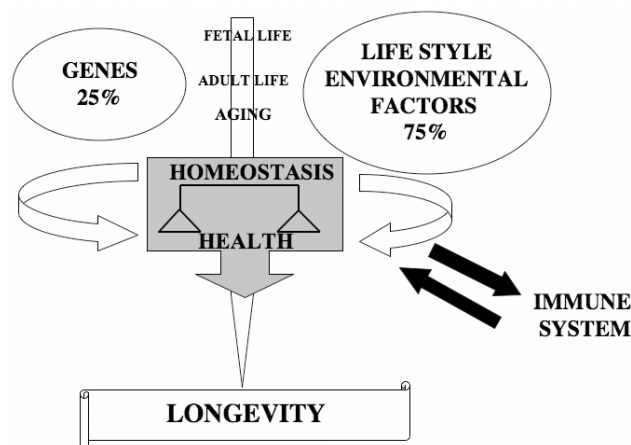


Fig. (1). How a good and long mean longevity can be reached?.

The base of a functional longevity is health maintenance and this depends on preservation of homeostasis (balance at all physiological levels). This health preservation depends on the genes (approximately in a proportion of 25%) and on the style of life and environmental factors (in a 75%). With aging it is more difficult to maintain the homeostasis as a consequence of deterioration of the regulatory systems. This loss of homeostasis is established at different rate in each subject, and this rate is the result of individual epigenetic mechanisms acting on genes from fetal life throughout the life of the subject. Since the functions and redox states of the immune system are good markers of health and predictors of longevity, we propose their study in order to determine each particular rate of aging and its response to changes in the style of life and environmental factors.

changes and preserve homeostasis. This accumulation of adverse changes with the passing of time increases the risk of disease and finally results in death. Thus, although aging should not be considered a disease, it strongly increases the chances of suffering many degenerative diseases. As Strehler [6] pointed out, there are four rules that define aging. It is universal (practically all animal species including the metazoans showing sexual reproduction suffer aging), progressive (the rate of aging is similar at different ages after the adult state), intrinsic (the causes that are the origin of aging must be endogenous, since even if animals are exposed to optimal environmental conditions throughout life, they still experience the aging process at the rate characteristic for their species) and deleterious (aging is obviously detrimental to the individuals since it leads to their death; however, at the species level, the detrimental character of aging could be argued since it is counteracted by a continuous replacement of the members of the population).

The consequences of aging involve a loss of efficiency in all physiological functions, but they are especially related to a decreased capacity to maintain the homeostasis in the individuals. An example of this is the lower capacity of elderly persons to endure extreme temperatures, infections or in general the situations in which stress occurs. If the principal characteristic of a healthy organism is to maintain the functional balance at all levels, with aging this balance fails.

THE LONGEVITY

The aging process is finished at the end of the maximum lifespan or maximum longevity (the maximum time that a

subject belonging to a determined species can live), that for instance in human beings is about 122 years whereas in mouse and rat strains is only 3 and 4 years, respectively. It is very important to distinguish this longevity from the mean longevity, which can be defined as the mean of the time that the members of a population that have been born on the same date live. The maximum longevity is fixed in each species, but the life span of individual organisms, even when they are of the same genotype and are raised in a common environment protected from extrinsic hazards, shows marked variability [7]. Although presently it is impossible to increase the maximum longevity, the mean lifespan can be increased by environmental factors and in human beings by factors of style of life that allow the maintenance of good health and to achieve the maximum lifespan in good condition. Thus, presently, human aging is a problem in developed countries because the mean lifespan or mean longevity is very high, about 75-83 years. Since we start the aging process at about 18 years of age, we spend most of the time in our life aging. For this reason it is very important to know which factors of life style can increase that longevity and how they can do it. A higher mean longevity is achieved by preservation of good health, and this depends on the genes, in 25% approximately, and on the style of life and environmental factors, in 75% [8] (Fig. 1).

THEORIES OF AGING

The answers to the key questions in gerontology such as how does aging happen?, where does aging start? and why does aging occur?, have stimulated so much speculation as to justify the cynical comment that there are as many theories of aging as there are gerontologists. Thus, as a consequence of the great complexity of the changes associated with senescence, more than 300 theories have been proposed to explain the process of aging [9]. Presently, most of these theories of aging mentioned by Medvedev in his review published in 1990 have been abandoned since they do not agree with the data from research on humans and laboratory animals, whereas other theories find acceptance and research support.

Although the theories of senescence proposed are too numerous to enumerate and several kinds of classifications of these theories have been published [10,11], we feel that most of those theories can be joined in three groups. The theories in one of these groups, "the genetic program theories", propose that aging is the result of a purposeful program driven by the genes. In another group are "the epigenetic theories", which indicate that aging is the result of events that are not guided by a program but are stochastic or random events not genetically programmed. The third group corresponds to "the evolutionary theories" of aging, which do not try to explain the mechanism of aging, but instead attempt to explain why the aging process occurs and the reason for the different rates of aging in the different species. In the first group we can include those theories proposing the existence of specific genes of longevity and theories of existence of biological clocks for aging. Among the latest, the theory of Hayflick, for example, is based on the idea that the somatic cells with replicative potential possess a "mitotic clock" that fixes their maximum lifespan [12]. Since the establishment of this "Hayflick limit" the terms replicative

senescence, cellular senescence and cellular aging have become synonymous. This theory and “the shortening telomere” theory (telomere attrition occurs with each round of cell division) [9,13] have to be considered possible explanations of cell differentiation processes or replicative cellular senescence, but not the base of organism aging. In the epigenetic group, it is possible to include several groups of theories such as: a) molecular structural stabilization and cross-linkage theories; b) metabolic theories (aging can be considered “a side effect” of aerobic metabolism: “wear- and- tear” or disorganization, rate-of-living, oxidation, damage by free radicals, mitochondrial injury) [9,11,14]; c) physiological theories of aging in which the neuroendocrine and the immunological theories are included [9]. In the group of evolutionary theories we can mention theories such as the risk of deprecation, duration of development and rate of reproduction, among others [9,10], and the first evolutionary theory of senescence that was suggested by Weissman [9,15] considering aging necessary for the disposal of the mortal soma in order to prevent organisms competing with their progeny for food and space.

Presently, despite published claims to the contrary there is no direct evidence that only the genes drive age changes. Even researchers following genetic theories in the past are now defenders of the idea that the aging process, which appears after reproductive maturation, is driven by random events not gene-programmed [16]. In conclusion, most theories of aging explain events that are consequence of the aging process but not their cause. Several of the epigenetic and evolutionary theories are useful to try to solve the puzzle of aging and we will use them further to elaborate an integrated theory of aging.

THE FREE RADICAL, OXIDATIVE AND MITOCHONDRIAL THEORIES OF AGING

Among all the aging theories the free-radical concept proposed by Harman [17] attracts a great deal of attention and is probably now the most widely accepted to explain how the aging process occurs. This epigenetic theory, that has been further developed by several researchers [18-21] including Miquel *et al.* [2-3] (the contributions of which are dealt with in more detail in the following section), proposes that aging is the consequence of the accumulation of damage by deleterious oxidation in biomolecules caused by the high reactivity of the free radicals and reactive oxygen species (ROS) produced in our cells as a result of the necessary use of oxygen. Since oxygen is mainly used in respiration to support the life-maintaining metabolic processes, the mitochondria, and more concretely their DNA (mtDNA), are probably the first target of this oxidation. As first pointed out by Miquel *et al.* [2,3,22], it is in the fixed post-mitotic cells, that can not regenerate fully these organelles, where the aging process starts.

Very important findings that complement the fundamental tenets of the free radical theory of aging are that the rate of mitochondrial oxygen radical generation, as well as the degree of membrane fatty acid unsaturation, and the oxidative damage to mtDNA are lower in the long-lived than in the short-lived species [20,23]. In any case mitochondrial injury by free radicals and loss of bioenergetic competence

occur, which lead to aging and death of cells and therefore of the organism [24].

As an example of the degree of acceptance of the above and related concepts, we can cite some comments by Beckman and Ames [25] in a widely cited review: “*The free radical theory of aging, conceived in 1956, has turned 40 and is rapidly attracting the interest of the mainstream of biological research (...). During the past decade several lines of research have convinced a number of scientists that oxidants play a role in aging*”. We fully agree with the above and believe it useful to review briefly the lines of research on “residual oxygen toxicity that overwhelm antioxidant defenses” by Gerschman [18], the “mitochondrial theories of aging” by Harman [17] and Miquel *et al.* [2], and the “oxygen radical-mitochondrial injury hypothesis of cell aging” [3].

In agreement with all the above oxidation-related theoretical concepts, the cells, in order to protect themselves against oxygen toxicity, have developed a variety of antioxidant mechanisms that prevent the formation of ROS or neutralize them after they are produced. However, these defensive systems are not perfect, and thus when the amount of ROS exceeds the antioxidant protection, an oxidative stress situation appears with resulting cell injury [26]. Despite the above, we should consider that oxygen is essential for life and that ROS, in certain amounts, are needed for many physiological processes that are essential for our survival [27,28]. Therefore, the functions of our organism are based on a perfect balance between the levels of ROS and those of antioxidants. It is the loss of this balance, because of an excess in the production of ROS or an insufficient availability of antioxidants, which leads to the oxidative stress, especially in the mitochondria of differentiated cells (as reviewed in more detail below) which underlies ROS-related diseases and aging [21] (Fig. 2).

THE OXYGEN STRESS-MITOCHONDRIAL INJURY THEORY OF FIXED POSTMITOTIC AND DIFFERENTIATED CELL AGING

The electron-microscopic finding of a striking age-related mitochondrial loss (and resulting accumulation of the age pigment lipofuscin) in the somatic tissues of the insect *Drosophila melanogaster*, as well as in the fixed post-mitotic Leydig and Sertoli cells of the mouse testis justified the proposal of an *oxygen stress-mitochondrial injury theory of aging*. Now this concept attracts a great deal of attention since, according to more recent work, the damage caused by ROS to mitochondrial ATP synthesis not only plays a key role in cell aging, but also in the fundamental cellular process of apoptosis.

This oxygen stress-mitochondrial theory proposed by Miquel and Fleming [3] and Miquel [22,29] maintains that the ROS released in the respiratory chain injure the genome and membranes of the differentiated cells that lack the organelle-regenerating power of frequent mitosis. More concretely, the theory proposes that because of the oxidative and mutagenic environment, and the vulnerability of the mitochondrial genes (that lack the protection by histones) the mitochondria of fixed postmitotic cells (and to a lesser degree those of other differentiated cells) suffer accumulating

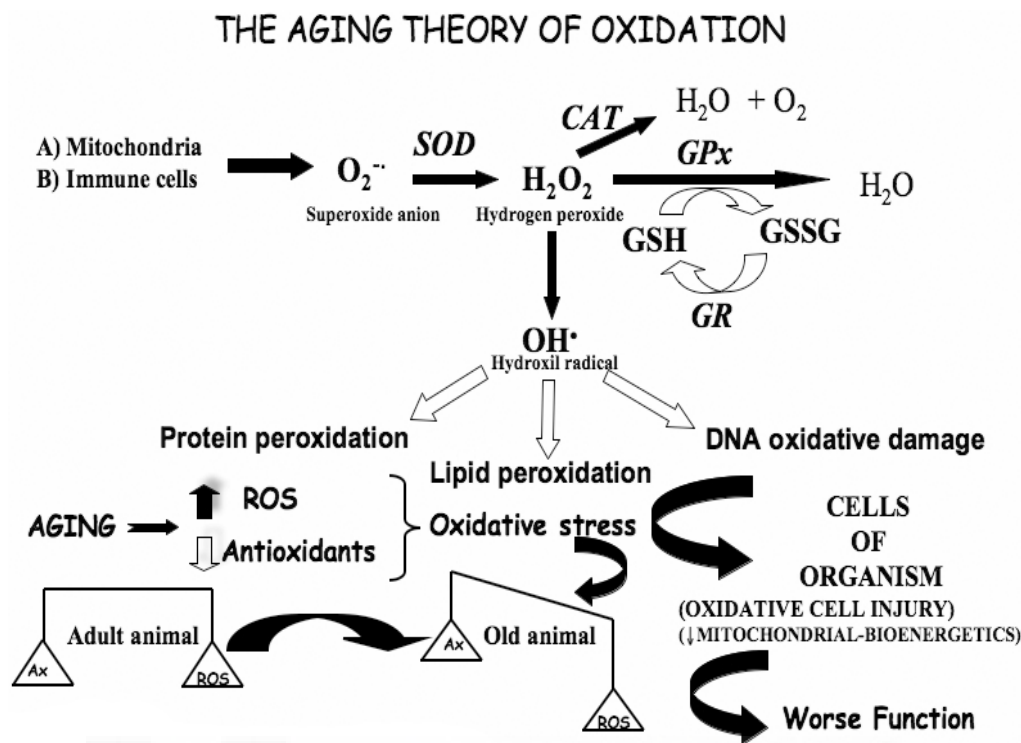


Fig. (2). The aging theory of oxidation. Aging is the consequence of accumulation of oxidative damage in biomolecules caused by the high reactivity of the free radicals and reactive oxygen species (ROS) produced in our cells, especially in mitochondria, as a result of the necessary use of oxygen. The immune cells also produce important levels of ROS. The first oxygen free radical appearing in cells is the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), which produces hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^{\cdot}), the most reactive free radical, which carries out the oxidation of biomolecules such as proteins, lipids and DNA. Cells, in order to protect themselves against oxygen toxicity, have developed a variety of antioxidant mechanisms that prevent the formation of ROS or neutralize them after they are produced. Thus, superoxide dismutase (SOD) catalyzes the inactivation of superoxide anion and catalase (CAT) inactivates hydrogen peroxide. The reduced glutathione (GSH) is the most important antioxidant in the organism and neutralizes peroxides using glutathione peroxidase (GPx) and in this action it is transformed to oxidized glutathione (GSSG). The antioxidant enzyme glutathione reductase (GR) is used to catalyze the reduction of glutathione. We should consider that oxygen is essential for life and that ROS, in certain amounts, are needed for many physiological processes, which are essential for our survival. Therefore, the functions of our organism are based on a perfect balance between the levels of ROS and those of antioxidants. However, with aging a loss of the balance appears, with an excess in the production of ROS or an insufficient availability of antioxidants, which leads to the oxidative stress. This situation of oxidative stress results in oxidative cell injury, which at the mitochondrial level causes a loss of bioenergetic competence, and therefore a worse function of cells.

mtDNA and membrane damage. These genetic and structural injuries impair the maintenance, renewal and function of the mitochondria, with resulting bioenergetic decline and progressive loss of somatic physiological functions.

This oxygen stress-mitochondrial theory of aging is supported by the research findings from the laboratory of Miquel summarized in Table 1 [3,30-37], and is in agreement with similar concepts published by other authors such as Linnane [38] that proposed “mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases” and Kowald and Kirkwood [39], who linked aging to “accumulation of damaged mitochondria through delayed degradation of damaged organelles (...) in fixed post mitotic and dividing cells”.

THE INTEGRATED THEORY OF AGING: HOW, WHERE AND WHY OF AGING

The most widely accepted theories of aging offer partial explanations of the causes and effects of this process, which is similar at the different levels of biological organization

(molecular, cellular and physiological) in human subjects and in all multicellular animals. Since the aging process is very complex, a theory based on only one mechanism can not offer a satisfactory explanation of all its aspects. This justifies the proposal of a theory that integrates early concepts that offer partial explanations of the mechanism of aging with others more recent [2,14,15,17-19,40-42] (Table 2). Thus, although recently it has been pointed out that “the senescence in vivo remains to be fully determined” [43], we have proposed an integrated theory that attempts to reply to the three important questions of biogerontology: “the how”, “the where” and “the why” of aging. We propose regarding the how that the aging process is linked to the oxidation produced by the oxidative stress, which is at the base of the many age-related changes which affect a large number of parameters including morphology, physiology and behaviour at all levels of organization: molecular, cellular, tissue, organic and that of the whole individual. We also suggest a reasonable answer to the question of where aging starts: in the mitochondria from fixed differentiated cells. And why does aging happen?. The answer seems to be found in sev-

Table 1. Research from the Laboratory of Miquel Supporting His Oxygen Stress-Mitochondrial Injury Theory of Aging of Fixed Postmitotic and Other Differentiated Cells

a)	Age pigment (lipofuscin, a waste product from mitochondrial-membrane lipid peroxidation) is found in the fixed postmitotic cells of an invertebrate, namely aged <i>Drosophila melanogaster</i> [30].
b)	In mouse testis, in contrast to the lack of lipofuscin (LF) in the dividing spermatogonia, LF and mitochondrial damage occur in the fixed postmitotic Leydig and Sertoli cells [31].
c)	An increased aerobic metabolism, such as caused by moderately high temperatures increases the rate of <i>Drosophila</i> aging (as shown by an accelerated loss of physiological performance and increased age pigment accumulation) without changing its total O ₂ use throughout life, despite the striking differences in maximal life span [32].
d)	A comparative study of three normal strains of <i>D.melanogaster</i> shows that their maximal lifespan is inversely proportional to their respiration rate [33].
e)	Aging changes the physico-chemical characteristics of the membrane lipids of <i>Drosophila</i> mitochondria and modulates their respiratory capacity [34].
f)	When housed in a space vehicle, drosophilas stressed by being unable to control their flight in the situation of weightlessness increase their respiration, with resulting premature aging [3].
g)	Aged drosophilas do not synthesize abnormal proteins although there is a decrease in general protein synthesis. This provides support for the mitochondrial-bioenergetic concepts of aging by ruling out theories that propose nuclear DNA mutations as the key mechanism of aging [35].
h)	The administration in the diet of thiazolidine carboxylic acid or tioprolone, a normal component of liver mitochondria and precursor of reduced glutathione increases the life span of <i>D. melanogaster</i> [36].
i)	Aging of mouse brain results in an impairment of oxidative phosphorylation as well as a decrease in the activity of cytochrome c oxidase and glutathione in synaptic mitochondria [37].

Table 2. Selection of Theories of Aging Related to Cell Differentiation, Metabolic Rate, Free Radicals, Oxygen Stress and Mitochondrial Injury, that Focus on the Aging Process at Several Levels of Biological Organization and are the Basis of Our Integrative Theory of Senescence

Author	Year of Publication	Key Concept / Cause of Aging	References
Weissman	1891	Division of work between <i>immortal</i> proliferating germ cells and somatic working and senescing cells	[15]
Minot	1907	Price paid for cell differentiation	[41]
Pearl	1928	Side effect of metabolism	[14]
Harman	1956	Damage by free radicals (that injure all cell types)	[17]
	1972	The mitochondria as the "biological clock" of aging	[19]
Williams	1957	Genes that program the organism for maximal vigor at the age of reproduction but have noxious effects afterwards	[42]
Gerschman	1962	Toxicity of oxygen due to lack of a fully competent antioxidant protection	[18]
Miquel <i>et al.</i>	1980	Oxy-radical injury to the genes and membranes of mitochondria of differentiated and especially fixed post-mitotic cells.	[2]

eral evolutionary theories and related concepts published long time ago. Thus, we agree with the concept of Williams [42] that aging is a consequence of characters selected by evolution as an advantage for the young subjects of the species allowing them to reach the reproductive age in the best condition and thus preserve these species, but are a disadvantage for old subjects. Thus, selection acts before the adult age and the maintenance of the species is more relevant biologically than the longevity of the individuals.

Moreover, we state that aging results from the differentiation process shown by somatic cells, especially those un-

able to divide such as most neurons, in contrast to germ cells. This process is linked to the appearance of mitochondria with very high levels of oxygen consumption and resulting oxidative damage to their molecules, especially to mtDNA. The resulting loss of bioenergetic competence and physiological performance is involved in the senescence and death of the members of the metazoan species, the genes of which, housed in a series of "disposable somas" [44], have an unlimited survival in their normal habitat thanks to sexual reproduction. Thus, senescence is the "price" paid by metazoans for the appearance in biological evolution of differentiated cells, the mitochondrial genome of which is quite vul-

nerable to oxygen free radical attack. It is evident that what allows better functions in the age of reproduction, namely oxygen utilization for cell energy production, is the main cause of functional impairment afterwards. Thus aging would be an unprogrammed effect of the high levels of oxidative stress in the differentiated cells, quite irrelevant from the viewpoint of species survival through sexual reproduction.

BIOLOGICAL AGE, A CONCEPT LINK TO MEAN LONGEVITY

The aging process is very heterogeneous. Thus, there are different rates of physiological changes in the various systems of the organism and in the diverse members of a population of the same chronological age. This justifies the introduction of the concept of "biological age" or "functional age", which is very useful to assess the level of aging experienced by each individual and therefore his life expectancy [45]. Since chronological age fails to provide an accurate indicator of the aging process [46], and aging is associated with a great number of changes at all levels of biological organization, there is a need to select parameters that are useful as biomarkers of aging. The most complete investigation on biological age was performed by Borke and Norris [47], on over one thousand men, in the longitudinal study on human aging of the *Gerontological Center* of Baltimore. The retrospective analysis of this study showed that the subjects presenting certain parameters "more aged" than those found in the majority of the subjects of the same chronological age had a shorter life expectancy. These biomarkers include those related to respiratory function, systolic arterial tension and reaction times determined by psychometric tests. Although the concept of biological aging has been investigated since the 1970s, most studies mainly selected a profile of physical parameters, including some physiological and biochemical parameters, and in spite of recent attempt to extend the kinds of parameters of biological age [48], the proposals are still incomplete and not very concrete. Thus, most research on biological age did not include immune parameters. Since the immune function is a marker of health and longevity [49] and a positive relation has been shown between a good function of several immune cells and longevity [50-56], presently several immune parameters are considered essential and very representative of the "true" biological age of a subject and thus, they can be considered appropriate biomarkers of biological age (as reviewed in more detail below).

THE IMMUNE SYSTEM AS A HOMEOSTATIC SYSTEM

The immune system is one of the regulatory systems of the organism. The immune system is a remarkably versatile defense system that has evolved to protect animals from infectious agents (e.g. bacteria, virus, fungi, parasites, etc) and malignant cells. This activity is carried out, from the birth of individuals, *via* different components such as epithelial barriers, immune cells and immune molecules, which act together in a dynamic network, the complexity of which, rivals that of the nervous system. The immune system is constantly active in order to discriminate between "non-self" and "self" and thus, destroy the non-self.

Two types of immunity protect the body: 1) Innate (or natural, non specific) and 2) adaptive (or acquired, specific). 1) Innate immunity is present already at birth and provides the first barrier against invaders. If pathogens pass the epithelial and mucosal barriers, cells of the innate immunity such as monocytes, macrophages, neutrophils and dendritic cells, come into play to rapidly eliminate them, and hence contain the infections. In addition, NK cells are implicated also in the control of infections and resistance to tumors. The basic signalling receptors of the innate immune cells in the recognition of pathogens are the Toll-like receptors (TLR), which detect a broad range of molecular patterns that are commonly found on pathogens, called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). 2) Adaptive immunity is a more sophisticated immunity acting when the innate defense cannot clear the infection in a short time. This immunity involves the specific recognition of antigens (molecules of pathogens or tumoral cells recognized as foreign). The cells of adaptive immunity, the lymphocytes, both T cells and B cells, carry receptors on their surface and they recognize antigens, either presented by an antigen-presenting cell or free in extracellular fluids. There are three kinds of T cells: A) Cytotoxic T cells (Tc), that express the surface protein marker CD8+, which directly kill infected cells and tumor cells. B) Helper T cells (Th), expressing CD4+ as the surface marker, which aid B and other T cells to do their work. These cells can be type 1 (Th1) and type 2 (Th2). The Th1 promote cell-mediated reaction providing effective defense against intracellular pathogens. The Th2 activate humoral immunity with antibody production. C) Regulatory T cells (Treg), which suppress the activity of lymphocytes to prevent their overreaction. Communication within adaptive immunity and between innate and acquired systems requires direct cell-to-cell interactions as well as the production of chemical messengers such as cytokines.

The three steps of the mechanisms of the immune response are: 1) Recognition of antigens (the immune system is able to recognize subtle chemical differences that distinguish one foreign pathogen from another, as well as to discriminate between foreign molecules and the own cells and proteins). 2) Activation and regulation of this activation (after the recognition of antigens, the immune system recruits a variety of cells and molecules to mount an appropriate response; thus the proliferation of specific lymphocytes and the production of cytokines are key activities in this step). The regulation of the activation is a key to obtain perfect results, since an inappropriate regulation, both by decreased or increased activation, leads to illness. 3) Effector response to eliminate or neutralize the antigens. In this effector response an inflammatory situation is generated. The effector cells are then destroyed, but the memory cells are produced in the activation step and thus, although they do not act at that moment, they are maintained in the organism. A later exposure to the same foreign organism induces a memory response, characterized by a more rapid and heightened immune reaction that serves to eliminate the pathogen and prevent disease.

In view of the above, it is possible to understand that the immune system contributes to homeostasis recognizing and eliminating foreign and altered self-antigens, thus maintaining the appropriate cell types and molecules that constitute

the tissues and organs. Moreover, this system with its cells and mediators contributes to the maintenance of the correct functions of the body [4,5,56]. Thus, the appropriate function of the immune system has been considered the best marker of health and longevity [5,49,56].

OXIDATION AND INFLAMMATION AS RELATED HOMEOSTATIC MECHANISMS OF THE IMMUNE RESPONSE

We should consider that the immune cells need to produce free radicals and other oxidant and inflammatory compounds in order to perform their defensive functions [4,5,27,28]. Thus, one type of action of cells involved in host defense consists ROS production of as chemical weapons to incapacitate pathogens and malignant cells. In addition, gene expression can be modulated by ROS, regulating the biosynthesis of antibodies or cytokines and other immune mediators. However, ROS produced in relatively high concentration cause cellular damage as mentioned above. Thus, ROS stimulate immune functions such as proliferation or produce cellular damage, depending on their specific concentration [28]. The immune cells need to produce the adequate levels of ROS to carry out their defensive function, but an excess of ROS can cause damage to immune cells, even more considering that the membrane characteristics of these cells make them very vulnerable to oxidative damage [4,27,57]. Therefore, if any cell needs to maintain a balance between the production of oxidants and the antioxidant defense in order to prevent an excess of the first and the resulting oxidative stress, this balance is even more essential to preserve the functional capacity of immune cells and, therefore, the health of the organism (Fig. 3).

Emerging evidence shows the close link between oxidation and inflammation since excessive or uncontrolled free radical production can induce an inflammatory response, and free radicals are inflammation effectors [58]. In fact, an inflammation occurs when of the immune system responds to the invasion of pathogens. Thus, inflammation is not *per se* a negative phenomenon, since it is needed to maintain life through a constant struggle to preserve the integrity of the individuals. However, if the levels of inflammatory compounds exceed the control of anti-inflammatory compounds, an imbalance appears and the situation of inflammation is established. There is an extensive list of pathological processes, such as hypertension and endothelial dysfunction [4,59], atherosclerosis [60] and neurodegenerative diseases [61] that are now considered to include in their pathogenesis not only an oxidative process, but also an inflammatory component. Thus, a balance of pro-inflammatory compounds, needed to cope with damaging agents and crucial for survival, and anti-inflammatory markers is also essential for an appropriate immune function, health condition and successful aging [62-64]. Again, a balance is necessary, to avoid inflammatory stress (Fig. 3).

Homeostatic and Anti-Homeostatic Functions of the Immune System

Considering all the facts indicated above we have extensive evidence of the homeostatic role of the immune system. Interestingly, Besedovsky and Del Rey [65] proposed the idea that the immune system shows also anti-homeostatic

functions, contributing with these to natural selection. Thus, homeostasis, as a product of natural selection, contributes to evolution as long as the survival of one individual would not threaten the survival of other members of the species and thus of the species itself. For example, an individual infected by pathogenic microorganisms may not only have his own life compromised but might also be a vector capable of transmitting this agent to other healthy individuals. The longer that infected individual survives, the higher is the threat to the species. Therefore, there are conditions in which immune mediated homeostasis enters into conflict with evolution. The conflict of interest between immune-mediated homeostasis and natural selection may be overcome by mechanisms referred to as "anti-homeostatic" functions of the immune system. In fact, in recent years it is well known that the cause of death of individuals with strong sepsis processes is not the infection, but the excessive activation of the immune system, which produces high amounts of inflammatory and oxidative compounds. If one asks why there are no mechanisms efficient enough to prevent the over expression of genes, the products of which could cause self-destruction, a possible explanation is that these products may mediate processes of "active" negative self-selection exerted by the immune system. These processes might have been acquired in evolution to limit homeostasis when the survival of the individual compromises the survival of other members of the species [65].

IMMUNOSENESCENCE

As mentioned above, aging is accompanied by a decline of the physiological systems including the immune functions. In fact, it is well known that with the passage of time there is a decrease in the resistance to infections and an increase in autoimmune processes and cancer, which indicates the presence of a less competent immune system. In fact, the increased death rate found in aged populations is due in great proportion to infectious processes [66]. Thus, there is an impairment of the immune system with age, which exerts a great influence on the increasing morbidity and mortality observed in aging human subjects [49]. However, it is presently accepted, although there are conflicting observations on this subject, that almost every component of the immune system undergoes striking age-associated re-structuring. This leads to changes that may include enhanced as well as diminished functions, involving each component of the immune system, as well as their interactions [4,5,56,67-71]. This fact is denominated immunosenescence. As has been recently indicated, understanding the specific mechanisms and targeting interventions are dependent on research to elucidate the relationship between frailty-associated impaired immunity and immunosenescence in developing an impaired immunity [72].

Immunosenescence results in a pronounced decrease in T-cell functions, especially in the T-cell helper, which affects humoral immunity and causes an impaired B-cell function [69,70,73]. However, not all immune cell types or all functions of an immune cell show a significant decrease. In fact, several cell types and functions of a cell are more activated with age whereas other types and functions do not show significant age-related changes. Thus, a cell type which has been relatively neglected in studies of age and immunity

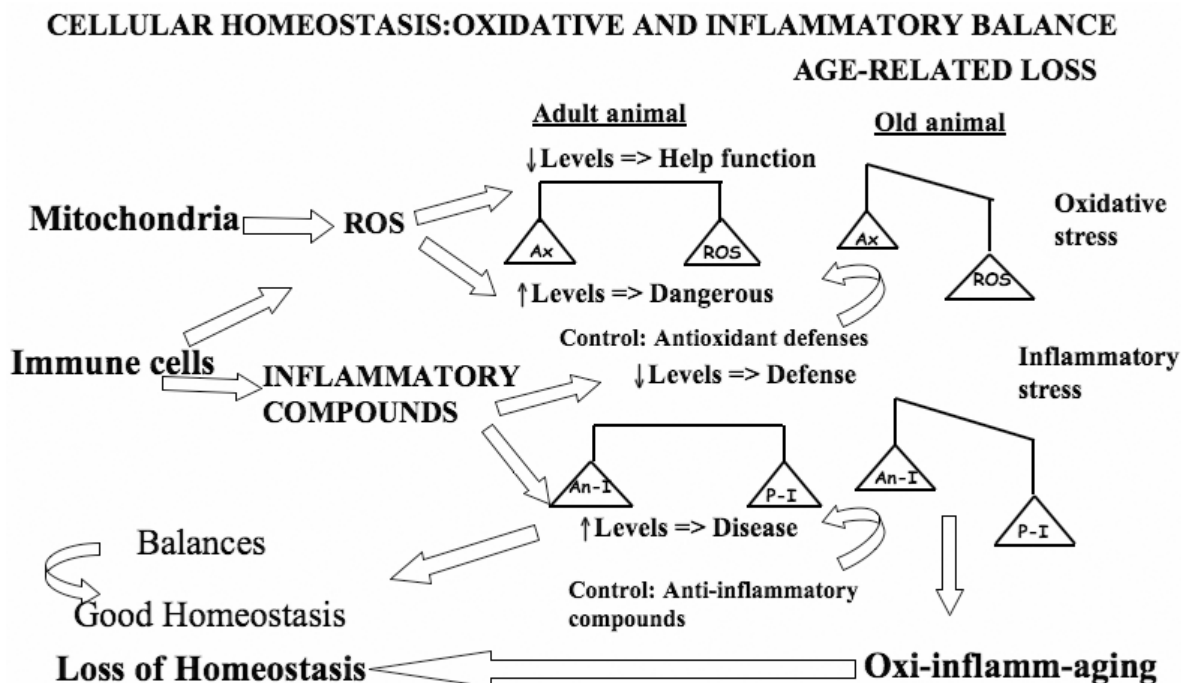


Fig. (3). The oxidative and inflammatory balance support of cellular homeostasis. The cells of the organism produce ROS (especially at the mitochondrial level, as consequence of the respiratory chain, but also in the cytoplasmic membrane, as occurs in the immune cells). ROS in certain amounts are needed for many physiological processes, which are essential for animal survival, but when the amounts of ROS are very high, they lead to oxidative damage. Thus, there are antioxidant (Ax) mechanisms to control that excess, and the balance between ROS and antioxidant levels is the base of a preserved cellular homeostasis typical of the healthy adult. With aging there are more ROS and less antioxidant compounds available, and the oxidative stress appears. Immune cells produce in their defensive work against pathogens pro-inflammatory (P-I) compounds, which are involved with the immune response destroying the pathogens. However, the inflammation has to be controlled to avoid a chronic situation, and this control is linked to the anti-inflammatory (An-I) compounds. There is a balance between inflammatory and anti-inflammatory compounds in the healthy adult that is the base of homeostasis. With aging the level of pro-inflammatory compounds increase and it is higher than the level of anti-inflammatory compounds, leading to inflammatory stress. Moreover, oxidation and inflammation are two processes very related. Thus, with age an oxi-inflamm-aging appears, which is the base of the loss of homeostasis.

is the Treg subset. With age these cells maintain their function capacity but increase in number, and this could explain the greater suppressive activity in the elderly [74,75]. The age-related alterations in the cells from innate immunity have been less studied than those of lymphocytes. Although the evidence accumulated over the last decade supports the profound impact of aging on this immunity, the results obtained on the age-related changes of the functions of cells from innate immunity are often contradictory [5,67,68,76-80]. In general, the NK cells, one of the cellular mediators of innate defence more extensively studied in the elderly, show a decreased cytotoxicity and cytokine production [76,79]. The NKT cells also change in number and function with age [80]. The phagocytic cells such as neutrophils and macrophages show a significant decrease in several of their functions [5,54,55,57,76-80]. Thus, although phagocytes, the age-related changes of phagocytes, which were studied by us for a long time [81], were thought to play a less critical role in the immune dysfunction that occurs throughout aging. Nevertheless recent studies point to the general decline in the functional activities of these cells as one major reason for the susceptibility and vulnerability to bacterial and viral infections among aged subjects, which stand out as the most common causes of illness and death in aging [5,76-80]. However, several activities of cells from innate immunity

increase with aging, namely those related with an increase of oxidative and inflammatory conditions, which show an impairment in the regulation of this immune response. Adherence capacity to tissues, expression of Toll-like receptors such as TLR2 or TLR4, or production of pro-inflammatory cytokines are increased with aging [4,5,78,79,82].

In addition, since the innate and adaptive immune systems co-operate to ensure an optimal immune response, we have to consider that any decline in innate immunity will impact on the function of the adaptive immune system and vice-versa [5,76,80,83]. Thus, at the level of a key component of T cell immunity such as the antigen presentation, the age-related changes in the antigen-presenting cells such as macrophages and dendritic cells could play a relevant role in the alterations of the initiation and outcome of T cell immune response [76]. Moreover, the dendritic cells have been implicated in the age-related change to a predominant Th2 response instead of the predominant Th1 of the adult [84]. In fact, this change from predominant Th1-type to predominant Th2-type responses to antigens with an accompanying shift in cytokine profiles has been proposed as a mechanism for age-related immune dysfunction [73].

Although several of the age-related changes observed in the immune response have been attributed to the modifica-

tions of immune cell subpopulations with aging [73,85], the age-related quantitative variations in a type of immune cell is not necessarily related with its functions. This is the case for NK cells, which increase in number with age but decrease their tumoral cytotoxic capacity [73,76,85]. However, the presence of a higher ratio of memory lymphocytes with respect to naïve cells could explain the decrease of several immune functions [73,84]. Despite the fast increasing amount of data on immunosenescence [67-85], the puzzle of all the changes in the different aspects of the immune function with age has not yet been solved, and the specific role played by the immune system in aging of the organisms is not wholly understood.

THE PSYCHO - NEURO - ENDOCRINE - IMMUNE COMMUNICATION. ALTERATIONS WITH AGING

We know that there is a “neuroendocrine-immune” system that allows the preservation of homeostasis and therefore of health [65,86,87] (Fig. 4). Thus, advances in the field of psychoneuroimmunology have shown that the central nervous system and the immune system are intimately linked and do not function as independent systems. Interactions between these systems are necessarily complex since each of the systems is intrinsically complex. Presently it is accepted that this communication is based on the following facts: A) Immune, endocrine and neural cells can express receptors for cytokines, hormones and neurotransmitters; B) Immune and neuroendocrine products coexist in lymphoid, endocrine and neural tissue; C) Endocrine and neural mediators can affect the immune system; and D) Immune mediators can affect endocrine and neural structures [65]. It was suggested that the immune system represents a system of reception of information of non-cognition related stimuli that appear in the organism (infections, tumor cells or other types of foreign cells) and it responds to those stimuli, accompanied by transfer of that information (by means of the cytokines produced by immune cells) to the neuroendocrine system. In addition, the neuroendocrine system is a receptor of cognitive stimuli (light, sound, stress situations, etc.) to which it responds, and its mediators (neurotransmitters and hormones) reach the immune system to inform it about the situation [88].

The scientific confirmation of this communication has allowed us to understand, on the basis of the experimental data, a number of facts of everyday life. Thus, it is well known that the situations of depression, emotional stress or anxiety, provoked for instance by the loss of employment or of a close relative, are accompanied by a greater vulnerability to conditions ranging from infectious processes to cancer or autoimmune diseases. This agrees with the concept that the immune system is impaired, and results in worse health and a shorter life span [53,55,89-91]. By contrast, pleasant emotions and an “optimistic outlook” on life help us to overcome immune system-related diseases and enjoy better overall health [92]. Conversely, it has been shown that immune system changes such as found in infectious processes alter nervous system functions, which can even lead to psychotic disorders and neural diseases [93].

With age all regulatory systems involved in homeostasis, i.e., the nervous, the endocrine and the immune system, as well as the communication between them, show an impair-

ment [4,5,94,95] (Fig. 4). This important observation justified the proposal of another theory of aging, according to which the changes in this communication between the immune system and the nervous system (and concomitant loss of homeostasis and resistance to stress) is the probable cause of physiological senescence [96]. Recent studies of our group support that this fact occurs in aging, as well as the idea that the impairment of the immune system with aging could affect the functions of the other regulatory systems through an increased oxidative and inflammatory stress, resulting in the age-related homeostasis alteration and increase in morbidity and mortality [4,5].

In relation with the above an inadequate response to stress is one of the conditions leading to an acceleration of aging accompanied by poor health of the immune system and other physiological systems [97-99]. Thus, our group has shown that mice with chronic hyperreactivity to stress and anxiety show a premature immunosenescence and are prematurely aging [100]. We have also observed recently that mice exposed to the stressful condition of isolation have behavioural responses that reveal an impairment of cognition, certain degree of depression and a more evident immunosenescence than control animals of the same age housed in groups (work in the process of publication). Likewise, human subjects suffering chronic anxiety [89,91] or depression show a significant premature immunosenescence.

It is difficult to determine whether with aging neural changes induce immunological changes or an altered immune system induces nervous changes, or whether both processes occur simultaneously, which is the most likely mechanism according to some authors [95]. In addition, we have observed that the *in vitro* response of immune cells to a wide range of neurotransmitter concentrations changes with the age of the subject [101-103]. This demonstrates that although the levels of neurotransmitters that come into contact with the immune cells are maintained with age, the response of the cells of the immune system to them could be different. Thus, the communication between those homeostatic systems deteriorates with age and this justifies the loss of homeostatic capacity and the consequent increase of morbidity and mortality that appear with aging [4,5] (Fig. 4).

THE IMMUNE SYSTEM, A MARKER OF BIOLOGICAL AGE AND PREDICTOR OF LONGEVITY

It has been demonstrated that the competence of the immune system is an excellent marker of health [49] and several age-related changes in immune functions have been linked to longevity [4,5,50-57]. Thus, the levels of immunological parameters such as excess of CD8⁺ CD27⁻ CD28⁻ T cells, low T cell proliferative responses *in vitro* and low interleukine-2 (IL-2) secretion predicted mortality, together with increased IL-6 levels and a CD4: CD8 ratio <1 define “Immune Risk Profile” in humans [104]. Based on the above, we decided to find out if some immune functions could be useful as markers of biological age or “biomarkers” and therefore as predictors of longevity. We felt that this project was worthwhile since biological age is a more adequate parameter than chronological age to measure the rate of aging of a subject, although very seldom the proposed batteries of biomarkers have included immune functions.

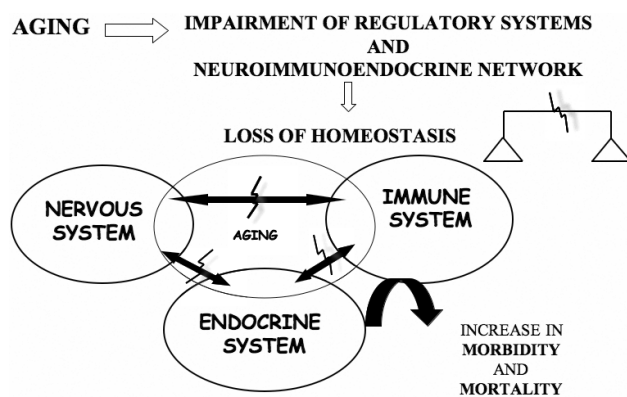


Fig. (4). Regulatory systems and aging. With aging there is an impairment of the regulatory systems, namely the nervous, the endocrine and the immune system as well as of the neuro-endocrine-immune communication. These age-related alterations lead to loss of homeostasis and therefore to the age-related increase in morbidity and mortality.

Among all functions of immune cells we have focused on those listed in Table 3. Thus, in *lymphocytes*: their ability to adhere to the vascular endothelia, migrate towards the site of antigen recognition (chemotaxis), proliferate in response to mitogens and release cytokines such as IL-2. In *phagocytes*: different step of their phagocytic process such as the adherence to tissues, the chemotaxis, the ingestion or phagocytosis of foreign particles and the destruction of pathogens by means of the intracellular production of free radicals such as the superoxide anion and other ROS located in the phagosome of these cells. Furthermore, we have analyzed the capacity of NK cells to destroy tumoral cells of the same animal species being investigated. The same parameters as above have been determined in the various decades of life of human subjects from the adult age of twenty until eighty in leukocytes of peripheral blood, and throughout the life of mice in their peritoneal leukocytes. These longitudinal studies, which despite their high cost, can be carried out on mice (that have a mean life span of two years), are almost impossible to perform on human subjects. Surprisingly our results have shown that in the members of both species similar age-related changes of the above mentioned immune parameters occur. Thus, with aging there is a decrease of functions such as the lymphoproliferative response and the NK activity that protect us against tumoral cells. There is also a decline of the IL-2, as well as of chemotaxis, phagocytosis and adequate levels of ROS in the phagosomes. In addition, there is an increase of the functions that could become noxious, if active in excess. For instance an excessive activation of adherence of immune cells to tissue may prevent their arrival to the site where they have to perform their organism-protecting task. Also there is an increase with age in other immune functions potentially harmful that will be dealt with below, such as the extra-cellular release of superoxide anion and pro-inflammatory cytokines like $TNF\alpha$ [4,5,57] (Table 3).

In order to identify the above parameters as markers of biological age and predictors of longevity we need to demonstrate that the levels that they show in particular subjects reveal their real health and senescent conditions. This has been achieved in the following two ways:

- A) Ascertaining that the individuals with those parameters showing levels older than those of most subjects of the same population, sex and chronological age die before their counterparts. The confirmation that a premature immunosenescence in those parameters may predict a premature death can be tested only in experimental animals. This was performed using a model of premature senescence in mice proposed by our group. The animals that we have denominated PAM (*prematurely aging mice*), in contrast to the NPAM (*nonprematurely aging mice*) of the same population, sex and chronological age, are identified by their poor response in a simple T-maze exploration test. This provides strong support for the concept that the nervous and the immune systems are closely linked. In mice with premature aging we have observed that the above mentioned immune functions show levels characteristic of older mice. In addition, to a more significant immunosenescence, the PAM showed high levels of anxiety and a brain neurochemistry characteristic of older animals. Nevertheless the most convincing evidence that the immune parameters studied are useful markers of biological age is that the PAM showed a shorter life span than their counterpart NPAM of the same sex and chronological age [5,54,55,100] (Table 3).
- B) An additional way to confirm the key role of the immune system in health and longevity is the finding that subjects reaching a very advanced age preserve the immune functions at levels similar to those of the adults. This has been shown in both humans and experimental animals such as mice. In human subjects our group has ascertained that in healthy centenarians the above mentioned immune functions perform as well as in young-adults (30-year old) and much better than in 70-year old human subjects [105]. A similar finding has been obtained on peritoneal immune cells of very long-living mice [103].

All the above results confirm that the immune system is a good marker of biological age and a predictor of longevity. Moreover, since the evolution of the parameters shown in Table 3 is similar in mice and human subjects, we can assume that men and women showing the above immune parameters at the levels of older subjects have a higher biological age and a shorter longevity.

THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATORY STRESS IN IMMUNOSENESCENCE

After knowing the changes that the immune system with aging, suffers, at least several of them, it is necessary to consider why immunosenescence occurs. If, as it is generally accepted, the mechanisms that underlie aging must be of general application, it seems logical to accept that the cause of immunosenescence is the same as that responsible for the senescence of the other cells of the organism, namely the oxidative disorganization linked to the unavoidable use of oxygen to support cellular functions. In addition, as it has been mentioned above, there is a close link between oxidative stress and inflammation, and many age-related pathologies are now considered to include in its pathogenesis both oxidative and inflammatory processes [58-64]. In fact, the levels of pro-inflammatory enzymes and molecules, such as cyclooxygenase 2, several cytokines and prostaglandins, increase with age [62]. Moreover, the increase of inflammatory

compounds can explain several aspects of immunosenescence [106]. Therefore, aging seems to be associated with an oxidative and inflammatory stress [63,64].

Trying to answer the question if there is an increased oxidative and inflammatory stress in the immune cells with aging, our group decided to investigate the age-related changes in the redox and inflammatory state of immune cells. Thus we have analyzed in immune cells, specially in peritoneal leukocytes of mice, but also in neutrophils and lymphocytes from peripheral blood of humans, a variety of oxidant and inflammatory compounds (extra-cellular superoxide anion, oxidized glutathione (GSSG), xantin oxidase (XO) activity, TNF- α , IL-6, PGE₂), and anti-inflammatory and antioxidant protectors (IL-10, reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)), as well as oxidative damage to biomolecules such as lipids and DNA (Table 3). Our results indicate that aging leukocytes suffer oxidative and inflammatory stress, resulting in higher levels of parameters of oxidation and inflammation, decreased antioxidant defenses and increased oxidative damage to lipids and DNA [4,5] (Table 3). Moreover, an increased oxidative and inflammatory stress has been also found in the immune cells of PAM with respect to those of NPAM and in the leukocytes of male mice with respect to those of female mice [5,100] (Table 3). In addition, very long-living mice and human centenarians show a redox condition in their immune cells similar to that of healthy adult subjects. In fact, recent studies have pointed out a lower expression of genes resulting in inflammation and oxidation in human centenarians, who show preserved immune functions [63,64,105]. Thus, centenarians seem to have a peculiar compromise between both pro and anti-inflammatory compounds and they are remarkably free of most age-related diseases that have an inflammatory component [63,64]. Although these conditions have not been adequately studied in exceptionally long-living experimental animals, we have observed that peritoneal immune cells from very old mice not only preserve in general their function in response to stimuli [103], but also show controlled oxidative-inflammatory stress (in the process of being published).

Intracellular Signal Changes with Aging: Role of the Nuclear Factor KappaB (NF κ B) in Immunosenescence

Age-related changes in the intracellular signals have been reported and they can explain the altered functional response in immunosenescence [73,107]. In the immune cells the degree of phosphorylation after activation shows a decline with age in mice and humans. There are changes in the formation of second messengers with both an increase in several of them such as cyclic adenosine monophosphate (cAMP) [108] and a decrease in other such as inositol triphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG), as well as in the activation of kinases such as mitogen-activated protein kinases (MAPK) and protein kinase C (PKC), among other deficiencies in signal transduction [73, 109]. These defects are responsible for the decreased ability of lymphocytes from elderly individuals to be activated by normal extracellular stimuli. The age-associated increase of oxidants and inflammatory compounds could be related with an up-regulation of a transcription factor as ubiquitous as the nuclear factor- κ B

(NF κ B) activation, which is involved with the expression of genes of oxidant and inflammatory compounds, and has been linked to many acute and chronic oxidative and inflammatory disease states [106,110-113]. Moreover, NF κ B is down-regulated by glutathione precursors such as N-acetylcysteine (NAC), which thus prevent excessive oxidation and inflammation in the above situations [111,112].

Although the activation of NF κ B in leukocytes with aging has been scarcely studied, recent articles highlight the role of the NF κ B system in aging and immune response [62,106,114-116]. Thus, the NF κ B binding domain is the genetic regulatory motif that is most strongly associated with the aging process, and longevity factors such as sirtuin 1 (SIRT1) can inhibit NF κ B signalling and simultaneously protect against the inflamm-aging process [116]. We have analyzed the NF κ B activation, in resting conditions, in peritoneal immune cells throughout aging, and our results show that the immune cells from exceptionally long-living mice have levels of activation of NF κ B similar to those of younger animals. Moreover, in old mice, only animals with controlled basal NF κ B activation in leukocytes achieved longevity, and the adult animals with a very high activation of the NF κ B in their peritoneal leukocytes died early. Thus, the level of activation of that factor in leukocytes is significantly related to the life expectancy of the subjects from which the cells were obtained (data in the process of publication).

ROLE OF THE IMMUNE SYSTEM IN THE AGING PROCESS

The Oxidation-Inflammation Theory of Aging

With all the above results obtained by us and others on the immune system and in agreement with other published data supporting the idea of an inflammation and oxidation condition in aging [62,117] we have proposed an oxidative-inflammatory theory of aging [4,5] (Fig. 5). We suggest that aging is linked to a chronic oxidative stress, which affects all cells of the organism, but specially those of the regulatory systems. Thus the nervous, endocrine and immune system would show the greatest oxidative damage and, being unable to preserve their redox balance, would suffer functional losses incompatible with an adequate preservation of homeostasis, with a resulting increase in morbidity and mortality such as found in old age. In addition, the immune system, because of its need to generate continuously oxidative and inflammatory compounds could activate, if it is not well regulated, factors such as the NF- κ B, which after reaching certain level of activation stimulates the expression of genes programming the production of higher amounts of those compounds. Thus it is likely that if the production of oxidative and inflammatory compounds is not well controlled the organism may enter a "vicious circle" in which the great amount of oxidant and inflammatory compounds produced by the immune system would activate even more the further production of the same noxious compounds through factors such as the above mentioned NF- κ B. If this harmful circle is not well controlled, these noxious compounds would disorganize with the passage of time not only the immune cells, but also all other cells of the aging organism (which have a worst response to oxidative stress than young cells), thus contributing to maintain the chronic oxidative stress of the

Table 3. Changes in Immune Function and Oxidative Stress Parameters in Peritoneal Leukocytes from Old Mice Versus Adults, and PAM Versus NPAM, as well as in Peripheral Blood Leukocytes from Elderly Versus Adult Men and Women. Effects of a Diet Supplemented with Antioxidants in Old Mice, in PAM and in Elderly Men and Women

	Old Mice and PAM	Elderly Men and Women	Antioxidant Supplementation
Immune Functions			
Adherence of macrophages and lymphocytes	Increase	-	Decrease
Adherence of neutrophils and lymphocytes	-	Increase	Decrease
Mobility of macrophages and lymphocytes	Decrease	-	Increase
Mobility of neutrophils and lymphocytes	-	Decrease	Increase
Phagocytosis capacity of macrophages	Decrease	-	Increase
Phagocytosis capacity of neutrophils	-	Decrease	Increase
Intracellular superoxide anion and ROS	Decrease	-	Increase
Lymphoproliferative response to mitogens	Decrease	Decrease	Increase
Natural Killer (NK) activity	Decrease	Decrease	Increase
IL-2 release	Decrease	Decrease	Increase
Oxidant and Pro-Inflammatory Compounds			
Extra-cellular superoxide anion	Increase	-	Decrease
Superoxide anion levels	-	Increase	Decrease
Oxidized glutathione (GSSG)	Increase	Increase	Decrease
Oxidized/reduced glutathione (GSSG/GSH)	Increase	Increase	Decrease
Tumor necrosis factor alpha (TNF α)	Increase	Increase	Decrease
Prostaglandin E2 (PGE2)	Increase	-	Decrease
Nitric Oxide (NO) and Xantin Oxidase (XO)	Increase	-	Decrease
Antioxidant Defences			
Reduced glutathione (GSH) levels	Decrease	Decrease	Increase
Superoxide dismutase (SOD) activity	Decrease	Decrease	Increase
Catalase (CAT) activity	Decrease	Decrease	Increase
Glutathione peroxidase (GPx) activity	Decrease	-	Increase
Glutathione reductase (GR) activity	Decrease	-	Increase
Oxidative Damage			
Malondialdehyde (MDA)	Increase	Increase	Decrease
8oxo-7,8dihydro-2deoxyguanosine (8oxodG)	Increase	-	Decrease
Activation of Nuclear Factor kB	Increase	-	Decrease

organism. In view of all the above, it seems evident that the immune system can play a role in the uncontrolled oxidation and inflammation process linked to aging and thus affect the rate of aging (Fig. 5).

Examples Supporting the Role of the Immune System in Aging

We can say, based on the above, that when an animal shows a great oxidative stress in its immune cells, these have a worst function and that animal shows a decreased longev-

ity. On the contrary, if the immune cells of a subject maintain better their redox state, their functions will be also better and this subject will reach greater longevity. Thus, there is a relation between the redox state of the immune cells, their functional capacities and the life span of the subject [5] (Fig. 6).

As examples supporting this idea and, consequently, the role of the immune system in aging, we can mention several experimental models that we have studied, and developed during the last years, as novel approaches to assess prema-

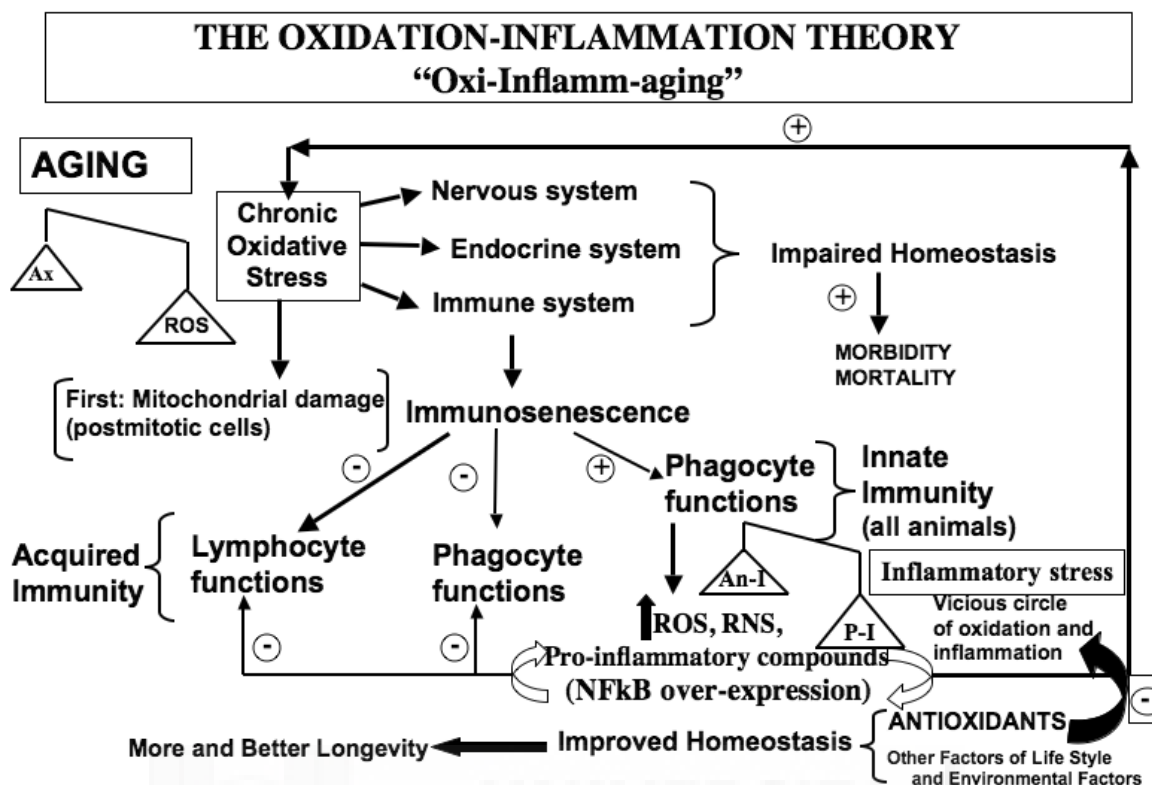


Fig. (5). A more developed scheme of the oxidation-inflammation theory than that previously published [4,5]. Aging is a chronic oxidative stress condition (higher levels of oxidants than of antioxidants) affecting all cells, especially those of the regulatory systems, i.e., the nervous, endocrine and immune system and the communication among them. This explains the impaired homeostasis and the increased morbidity and mortality found in old age. According to the oxidative mitochondrial theory of aging, the differentiated postmitotic cells are the first to suffer damage with age. In animals with a complex immune system the T lymphocytes, and especially the T memory cells (which are the most abundant T cells in aged subjects and are also the most postmitotic cells of the immune system) are those that suffer the effects of the oxidative stress of aging. In the age-associated re-structuring of the immune cells or immunosenescence, there is a decrease of several lymphocyte and phagocyte functions (those related to the acquired immunity), but an increase in other functions, specially those carried out by phagocytic cells generating continuously oxidative and inflammatory compounds (cells and functions responsible for the innate immunity and present in all animals). These compounds produced in order to eliminate foreign agents, could activate the factor of transcription NF- κ B, which after reaching certain level of activation stimulates the expression of genes programming the production of higher amounts of those compounds. If this process is not regulated well a vicious circle of oxidation-inflammation could be established, which would increase the oxidative stress and the inflammatory stress, and consequently accelerate aging. Thus we could conclude that in all animal species the immune cells modulate the rate of aging of each subject. In agreement with this concept, the administration of antioxidants has been shown to cut the mentioned vicious circle, improving both the nervous and immune systems, decreasing their oxidative stress, and consequently improving homeostasis and increasing longevity. Other factors of the environment and life style also have to be considered.

ture aging. We can present two groups of these models. A) Models in which the members of a species with high longevity maintain a better function and redox state of the immune cells. B) In the other group of models, subjects showing an immunosenescence and oxidative and inflammation stress condition, in relation to other members of the group of the same chronological age, have a lower life span (Fig. 6).

A) Model of Females Versus Males and Model of Long Living Mice and Human Centenarians

In the mammalian species the females, that usually have better immune functions than the males [118], also have a longer mean life span owing to the effects of the estrogens that allow them to live in a less oxidized condition [119], as reflected in the better redox state of their leukocytes (data in the process of being published).

In addition, the human centenarians [105] and the laboratory mice with a high mean-life expectancy (data sent for publication) are those that maintain better the redox state of their immune cells and therefore their immune functions.

B) Model of Immunosenescence

B1. Model of Poor Response to Stress and Anxiety: PAM Versus NPAM, and Anxious Women Versus Non Anxious Women

The model, above mentioned, of premature aging confirmed in our laboratory on several strains of mice relies on the differences in performance among mice of the same sex and chronological age when subjected to a T-maze behavioral test [53-55]. The animals that fail the test are "biologically older," i.e., suffer premature immunosenescence, show a neurochemistry similar to mice of an older chronological age and display higher levels of anxiety and emotionality

RELATION BETWEEN THE REDOX STATE AND THE FUNCTIONAL CAPACITY OF THE IMMUNE CELLS, AND THE LONGEVITY OF INDIVIDUALS

Examples supporting the role of the immune system in aging

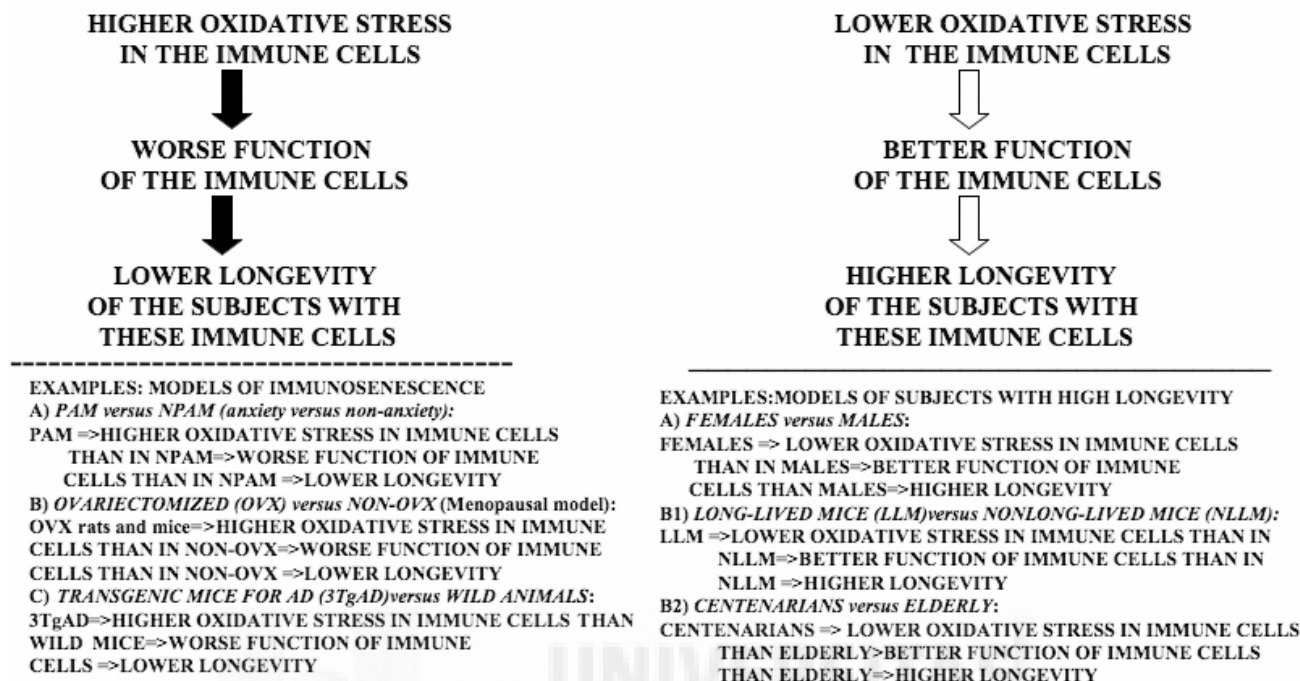


Fig. (6). Relation of the oxidative state of leukocytes, their function and individual longevity. High levels of oxidative stress in the immune system result in an impaired function of its cells and a lower longevity of the subjects having these cells, whereas the contrary situation, namely low oxidative stress and better function of immune cells, is accompanied by high longevity. In agreement with the above several models of premature aging such as PAM (based on the higher anxiety levels of these animals), ovariectomized rats and mice (menopausal model) and the transgenic mice model for Alzheimer's disease, as well as several models of higher longevity such as being females, long-living mice and centenarians, are linked to low and high oxidative stress, respectively, in the immune cells.

with respect to animals of the same chronological age that perform the test correctly [100]. Moreover, these PAM show a greater oxidative stress not only in their immune cells but also in the brain, liver, heart and kidney [100], as well as a shorter life span than their NPAM counterparts [5]. In addition, it has also been mentioned that human subjects suffering chronic anxiety show a significant premature immunosenescence [89].

B2. Menopausal Models

Recently, we have stated that ovariectomy in rodents (a good model of mimicking human menopause) constitutes another model for assessing premature aging, since it accelerates immunosenescence and fastens the progression of aging in behaviours related to sensor motor abilities and neophobia/emotionality. Thus, ovariectomized rats and mice show an older biological age that does not correspond with their chronological age, a deterioration of general homeostasis in the organism and therefore would constitute an example of acceleration of the physiological aging process [118 and data in the process of publication].

B3. Obesity Versus Non-Obesity Animals

Obese subjects show a higher incidence of infection and some types of cancer, suggesting an impaired immune function. Although there are several studies on the immunologi-

cal state in obese compared to non-obese subjects, and, in general, an impaired immune function linked to obesity seems to be accepted [120,121] the information is limited and often controversial [122]. In addition, obesity is associated with an inflammatory state [123]. We have recently observed that immune cells from genetically obese rats (Zucker: fa/fa) show premature immunosenescence as well as an oxidative stress situation (data to be published).

B4. Transgenic Mice for Alzheimer's Disease Versus Wild Animals

Presently it is accepted the role of oxidation and inflammation, at the brain level, in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) [124, 125]. Recently we have studied in old male and female triple-transgenic for AD (3xTg-AD) mice (harboring *PS1*_{M146V}, *APP*_{Swe}, *tau*_{P301L} transgenes) in contrast to wild type animals behavioural, endocrine and immune parameters, as well as the redox state of these mice. The results indicate that several aspects of the impairment of the neuroimmunoendocrine network that occurs with aging are more evident in the 3xTg-AD mice, especially in males. This supports the hypothesis of a premature immunosenescence as a pathogenically relevant factor in AD, which was found to be enhanced in the 3xTg-AD males suggesting that this could also be responsible for the increased morbidity and mortality of these subjects [126].

THE ROLE OF THE IMMUNE SYSTEM IN THE OXI-INFLAMM-AGING, CONTROLLING THE MEAN LONGEVITY, COULD HAVE EVOLUTIONARY REASONS AND BE OF UNIVERSAL APPLICATION

It is well known that since we are born our immune system has to face a great variety of foreign agents and, in order to protect the organism against them, needs to release toxic oxidant and inflammatory compounds. An adequate production of these noxious products is needed to increase the probability that a subject survives to reach the age of reproduction, what is essential for survival of the species. Obviously, the immune system has not been well prepared to preserve their defensive functions for a long time, especially after the reproductive period. In the case of the members of the human species living in developed countries which show considerable increases in their mean life span, they, in general, suffer the consequences of having a very activated immune system during a long period of time [5,62,63,127,128]. As it happens with oxygen use, that allows a very active life condition but has as its "side effect" the production of noxious ROS, a very active immune system is designed to provide protection against the risk of contracting infections and tumours to which we are chronically exposed, but has a "price", i.e., that if the oxygen-inflammation-supported functions and resulting stress are not well controlled or the aging organism lacks a satisfactory individual adaptation to this stress, the senescent process accelerates [5]. Thus, the participation of the immune system in the oxi-inflamm-aging seems evident, and thus, the immune system can accelerate or not the aging process, modulate the biological age and consequently the mean longevity.

Why the Present Increase in the Human Mean Longevity is Associated with an Increase in Oxi-Inflamm-Aging and Oxidative-Inflammatory Pathologies?

Oxidation and inflammation are at the base of most of the age-related diseases such as Alzheimer's disease, atherosclerosis, diabetes and cancer just to mention a few. Thus, it has been proposed that these diseases are "the price we pay" for a life-long active immune system [128]. The frequency and progression of these diseases seem dependent on the genetic background of individuals. In fact, emerging evidence suggest that pro-inflammatory genotypes are related to unsuccessful aging and the increase of chronic inflammatory diseases, especially in old age [129]. We suggest, that if there is now a high frequency of these diseases, it is a consequence of the fact that in the establishment of our species the individuals with pro-inflammatory and pro-oxidant genotypes were able to reach the reproductive age with more probabilities, since they were more capable of surviving to infections. Presently, we suffer the consequences of that evolutionary advantage.

Can the Immune Cells be Involved in the Rate of Aging in all Kind of Animals and thus can have the Immune System Role in Aging a Universal Application?

Based on all the above, we can conclude that "the immune theory of aging" such as was originally proposed [130], can not be accepted since this theory proposed as the cause of organism senescence the decrease of the immune

function and this concept does not follow the principle of universality of Strehler. We should keep in mind that not all animal species have immune systems as complex as those of the mammals. Nevertheless it seems evident, based on all the above information, that the leukocytes can play a fundamental role in aging. We suggest that this role in the rate of aging can be of universal application. Confirmation of this idea could be found in the fact that the immune cells producing oxidant and inflammatory compounds in the highest amounts, and even more with aging, are those responsible for the innate immunity, especially the phagocytic cells which are found, with different denominations, in all animals, including the invertebrates. Moreover, the master regulator of the innate immunity is the NF- κ B system, an ancient signalling pathway found in both insects and vertebrates, and it is needed to consider that NF- κ B signalling seems to be the culprit of inflamm-aging [115].

If the immune system is relatively well known in vertebrate animals, in which, as it has been mentioned above, the innate and adaptive immunity collaborate, increasing the efficiency of immune responsiveness, in invertebrates this system is less known. However, it is presently accepted that all animals and even the plants, have some sort of immunity, although they do not have components of adaptive immunity. Thus, it seems that an innate immunity is found already in unicellular organisms, but evolution has added novel adaptive immune responses to the defense mechanisms. As mentioned above, during aging, adaptive immunity declines, whereas innate immunity, in several aspects, seems to be activated, inducing a pro-inflammatory profile. An evolution-related view of immunosenescence should explain why acquired immunocompetence, which is more specialized and obtained more recently in evolution, is the most impaired with age whereas the innate immune response, older and less specific, is better preserved and may be even stimulated in excess in the aging organism [115] (Fig. 5). In agreement with the above, we have observed that in the peritoneal immune cell populations of mice, as in blood immune cells of human subjects, the macrophages and neutrophils, respectively, are the immune cells responsible for the generation of higher levels of oxidant compounds than those produced by lymphocytes, and these levels significantly increase with age in those phagocytic cells [5] (Table 4). Thus, it is probable that the macrophages, which as already pointed out are found in all animals, are implicated in the chronic oxidative and inflammatory stress of senescence due to their high age-related increase in the production of ROS and inflammatory cytokines [4,5,68,78].

In non-vertebrate phyla, whose immune system has been scarcely studied, there is no equivalent of a lymphoid lineage and thus, as it has been shown in insects, they lack an acquired immunity based on the presence and function of lymphocytes [131]. Nevertheless, the invertebrates produce inflammation-like responses and cytotoxic free radicals during infection, and other defensive actions, through a cellular and humoral immune system similar to the innate immune system of vertebrates [131-135]. Thus, several insect species produce small peptides in response to infections with strong antimicrobial activity. We should also remember that the Toll-like receptors (TLR) were first found in *Drosophila melanogaster*, and that these receptors are mediators of in-

Table 4. Comparative Age-Related Changes in the Levels of Oxidants, Pro-Inflammatory Compounds, Antioxidant Defenses and Oxidative Damage to Lipid in Peritoneal Macrophages and Lymphocytes from Mice and Neutrophils and Lymphocytes from Human Peripheral Blood

Oxidant and Pro-Inflammatory Compounds	Macrophages and Neutrophils	Lymphocytes
Oxidized glutathione (GSSG) levels Oxidized/reduced glutathione (GSSG/GSH)	↑	No change
Antioxidant Defences		
Total Glutathione Reduced glutathione (GSH) levels Superoxide dismutase (SOD) activity	↓	↓
Oxidative Damage		
Malondialdehyde (MDA)	↑	No change

flammatory response [136,137]. Although it has not been studied yet, it is possible that in invertebrates the immune system may be able to modulate the rate of aging.

Thus we can conclude that in all animal species the immune cells could modulate the rate of aging of each subject and thus be involved with the mean longevity. Moreover, we suggest that the immune system, concretely the innate immunity, using its above commented anti-homeostatic role, is an important tool of evolution for eliminating old subjects of each species.

COMPATIBILITY AND INTEGRATION OF THE OXIDATIVE-MITOCHONDRIAL AND THE OXIDATION-INFLAMMATION THEORIES OF AGING

In view of the convenience of attempts to integrate compatible and complementary concepts on the mechanisms of aging at the various levels of biological organization [9,24,138], it seems opportune to consider if the above summarized oxidation-inflammation theory [4,5] is compatible with the concept of the oxygen stress-mitochondrial genetic injury (or oxidative-mitochondrial theory) proposed by the group of Miquel [2,3,29]. In agreement with the above, it is logical to accept that the oxygen stress due to the generation of ROS in immune cells in order to support their functions (especially the ROS produced in the cytoplasmic membranes of phagocytes) are involved in the senescent dysfunction of these cells. In addition, the oxidative stress linked to the production of ATP in mitochondria may contribute to the senescent involution of the immune cells. This could be more evident in the T lymphocytes, specially the T memory cells that can survive for a long time in the postmitotic condition like the fixed postmitotic cells of the nervous and endocrine systems, which are affected by mitochondrial damage. Moreover, an increase of memory T cells and a decrease in the relative proportion of naïve T cells occur with advancing age. In addition, it is interesting to remember that the secretions of the cells of those systems, i. e.: neurotransmitters and hormones, modulate the immune functions and this modulation changes with age [95]. In agreement with the above, an electron-microscopic study by our group has shown that the

lymphocytes from aged mice accumulate abundant granules of lipofuscin [5], a pigment that is the end-product of the oxidative disorganization and auto-digestion of mitochondria [31]. In addition, although it is commonly assumed that neutrophils possess few, if any, functional mitochondria and that they do not depend on these organelles for cell function, there is research indicating that intact mitochondrial function is required to sustain some neutrophil functions in infections and inflammations [139] (Fig. 5).

Therefore we can conclude that the *oxidation-inflammation* and the *oxidative-mitochondrial* theories can be integrated in order to gain a better understanding of the sub-cellular and cellular mechanisms of senescence of the immune system, which like other physiological systems relies on a "symbiosis" of often-dividing and fixed postmitotic cells. In our opinion, this new integration of two theories may allow a better understanding of the key role played by the above mentioned two kinds of oxygen stress (from cytoplasmic-membrane and from mitochondrial origin) in the aging of the immune system and the organism.

ROLE OF ANTIOXIDANTS IN THE IMMUNE CELLS: A STRATEGY TO REVITALIZE THE IMMUNE FUNCTION AND HOMEOSTASIS IN AGING: CONFIRMATION OF THE OXIDATION-INFLAMMATION THEORY

Presently the existence of an oxidant-antioxidant imbalance in aging is accepted, and the first observations suggesting a key role for oxidative injury in aging were, precisely, those showing the favorable effects of endogenous and dietary antioxidants, which have been demonstrated in experimental animals and human subjects [140]. Although it was published that the levels of several antioxidants in diverse species correlate with the maximal longevity of those species [141], and that the over-expression of antioxidant enzymes such as SOD and CAT in transgenic animals is related with an increase of both mean and maximal life span [142], more recent work has demonstrated that species that live longer have lower levels of antioxidants, since they produce lower levels of ROS than the species with lower maximum longev-

ity [143]. Nevertheless, in each species to maintain appropriate levels of antioxidants is relevant to the biological age, and consequently to the mean longevity, of the members of that species, as it will be indicated later.

A direct link between oxidative stress, aging and human diseases can be further established by studies analyzing the impact of variation in human genes encoding for antioxidant defense systems [144]. Moreover, the endogenous antioxidants decrease in oxidative stress situations, such as endotoxemia and aging, because they are spent neutralizing the excess of ROS [4,5,112,140]. Thus, presently it is generally accepted that longevity may be associated with an optimal antioxidant protection, and that the senescent decrease in antioxidant levels supports the free radical theory of aging and provides a rationale for attempts to decrease the rate of aging by supplementing the diet with antioxidants [4,5,57,140].

The ingestion of a diet enriched with antioxidants seems adequate for maintaining an optimum redox balance and therefore protecting the aging organism against oxygen stress. Thus, the administration of compounds such as vitamins C and E, polyphenols and sulfuric antioxidants (taurine, thioproline (TP) and N-acetylcysteine (NAC), among others), which are precursors of glutathione (GSH), in isolation or in nutritional formulations containing several compounds, may be recommended, because of their antioxidant and anti-inflammatory action, for use in both laboratory animals and human subjects. In fact, previous studies from our laboratory in chronologically-old mice, in PAM, and in elderly men and women, have demonstrated the beneficial effect of those antioxidants, which show important favorable effects on health, acting on the nervous and the immune systems [4,5,57,79,140,145-160] (our results summarized in Table 3). We have observed that supplementation of the diet with those antioxidants not only improves the immune function in aging mice, bringing it to adult values, but also neutralizes the oxidative stress, thus helping to reach values of oxidants, antioxidants and biomolecular damage similar to those of adults and NPAM in mice and adults in humans (results summarized in Table 3 and Fig. (7)). Moreover, our group has observed that the lymphocytes from old mice after ingestion of a diet supplemented with thiol antioxidants did not show the lipofuscin pigments present in control animals [5].

In addition, in the performance of their function the leukocytes may exhaust their reserves of antioxidants [161]. This could help to explain why in both laboratory animals and human subjects, the homeostasis-linked functional competence of the immune system in the adult age improves after diet supplementation with appropriate amounts of antioxidants such as vitamin C, vitamin E, thiol antioxidants and polyphenols [162-164].

Since the favorable action of the antioxidants on the immune system is expressed in an increase of the functions that are depressed and a decrease of those that are excessively active, the antioxidants can not be considered general immunostimulants. In fact they may bring each immune function and redox state to its optimum, thus acting as immunomodulators [165]. This modulating ability appears to be focused at the level of the ubiquitous intracellular factors implicated in oxidation and inflammation, such as the NF- κ B [112].

This regulatory role of the antioxidants would be performed not only on the immune system, but also on the other regulatory systems, including the nervous system, in which the oxidative stress also underlies its senescent impairment. Thus, as a matter of fact it is accepted that the antioxidants play a role in the recovery of a great number of nervous functions [21]. Moreover, in the PAM the ingestion of thiolic antioxidants not only improves the immune function, but also the behavioral response [100,145]. Moreover, interestingly, this immune "rejuvenation" as well as the improvement of the nervous system is apparent in the laboratory mice showing the greatest longevity [4,5]. In unpublished work from our laboratory we have also found that chronologically old mice and PAM with an antioxidant supplemented diet (a mixture of antioxidants, such as vitamin C, vitamin E, β -carotene, zinc and selenium, in very little amount, and TP and NAC) show a significant increase in their life span. According to a recent review, antioxidants able to neutralize free radicals at their sites of production in the mitochondria such as NAC and alpha-lipoic acid, although unable to increase the species-characteristic maximum life span, may increase mean individual longevity [140].

The results obtained in the immune system of humans after diet supplementation with antioxidants are due to a decrease of the oxidative stress in these cells, in a similar way to that observed in leukocytes from mice. Since the improvements in the immune functions found with antioxidant supplementation are similar in humans and mice, and because these changes in mice are accompanied by an increase in life span, it is probable that similar effects could be obtained in humans (Fig. 5 and 7).

Role in Aging of Glutathione (GSH) and Other Sulfuric Antioxidants that Increase Its Levels: Unpublished Results on the Direct Effect of these Antioxidants on the Immune Cells from Old Mice

The oxidant-antioxidant imbalance in aging can be reflected in a deficiency of GSH, an antioxidant that has a relevant role in aging. GSH is the most abundant non-protein thiol in mammalian cells, in which it is essential for survival [166]. This tripeptide shows many important cellular functions, among which we can mention its role regulating enzymatic activity and especially as redox buffer maintaining a given thiol/disulfide redox potential and protecting the cell against oxidants [167]. Since all cell functions depend to a high degree on the redox reactions of the thiol compounds, the preservation of adequate levels of GSH or of other thiolic or sulfuric compounds during aging is essential for an adequate activity of cells in general and especially for those of the nervous and immune systems, and therefore for health of the aging subjects. Studies performed in aged experimental animals and elderly people showed a decrease in the GSH levels, in plasma, blood, organs and immune cells [78,147,168]. In fact it has been shown that the organelles and cells of the aged animals contain less GSH than those of the young, and this decrease becomes more striking at the age when mortality shows a marked increase. Thus, the administration of GSH, because of its protective effect against the oxidative stress of the DNA of mitochondria and the GSH loss in these organelles with age, is able to increase life expectancy in laboratory animals [36]. Some work carried out

AGE-RELATED CHANGES IN FUNCTION AND OXIDATIVE AND INFLAMMATORY STATE PARAMETERS IN IMMUNE CELLS FROM ELDERLY MEN AND WOMEN AND FROM CHRONOLOGICALLY OLD MICE AND PREMATURELY AGING MICE (PAM). EFFECT OF THE INGESTION OF ANTIOXIDANTS

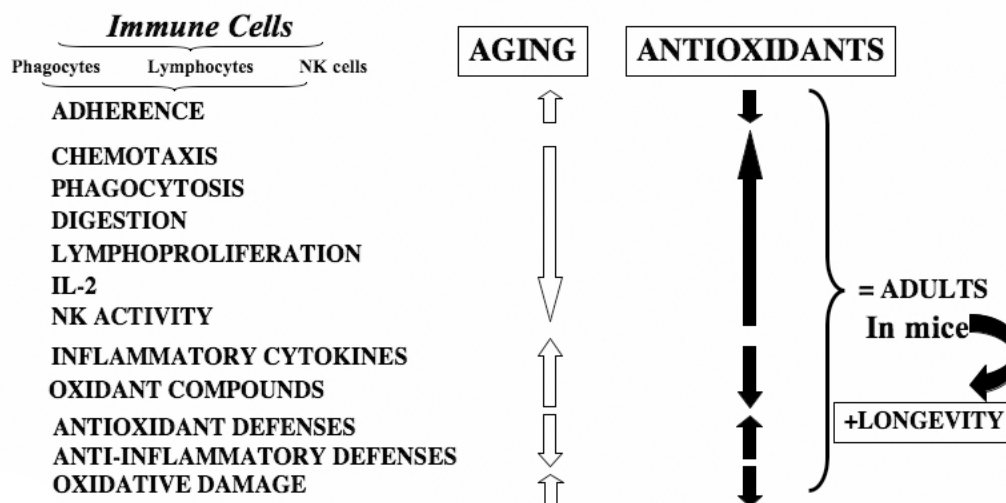


Fig. (7). Role of antioxidants on the function, redox and inflammatory state of immune cells with aging. The age-related changes in the function and redox parameters of the immune cells are modulated by the ingestion of appropriate amounts of antioxidants that bring the values of these parameters, in elderly humans and in chronologically old or prematurely aging experimental animals, closer to those in the corresponding adult subjects or non-prematurely aging controls. In mice, the animals ingesting antioxidants in the diet show an increase in their longevity. The information of the figure summarizes the results obtained in the laboratory of De la Fuente with respect to the effects of antioxidants on the aging immune system. In elderly men and women, we have studied the effect of Vitamin C and vitamin E ingested for 4 or 3 months (1000mg/day or 500mg/day of vitamin C and 200 mg/day of vitamin E) [4,79,146,] and NAC (600mg/day for 2 and 4 months) [147]. In old mice, administration of TP (0.07% or 0.1%w/w) for 9 months [150] and for 5 weeks [151]. In PAM, intake for 5 weeks of TP [152] NAC [148,149] and of TP+NAC (0.1%w/w) [154,155]. The amount of these thiolic antioxidants needed to have a favourable effect is higher in aged than in adult mice [153]. Further, administration of a mixture of antioxidants (vitamin C, vitamin E, β -carotene, zinc and selenium) for 5 weeks [156-158], polyphenol-rich cereals [159] and soybean isoflavones [82,160] also improves the parameters studied.

by us shows that the administration by diet of antioxidants that increase the levels of GSH such as TP and NAC, improves the immune function in chronologically aged humans and experimental animals, as well as in PAM [147-155]. The responsible intracellular mechanism could be the regulation of the activation of NF κ B. In fact we have observed that NAC decreases the activation of this factor in immune cells [111,112] and we have also described that intracellular GSH deficiency is associated with enhanced NF κ B activation in older non-insulin dependent diabetic patients [169].

Based on the above and on previous results obtained by us studying the effect *in vitro* of thiolic antioxidants on macrophages and NK cells from adult mice [170-172] and NK cells from old mice [173], we carried out an experiment *in vitro* to test the effects of TP (1 mM, the concentration most effective in the previous studies) on several functions of lymphocytes from axillary nodes, spleen and thymus of old Swiss mice. Moreover, we used in parallel GSH (5 mM, which was also the most effective concentration in the previous experiments) to compare the effect of both antioxidants. The results are shown in Table 5. As can be seen both antioxidants, TP and GSH, increase the spontaneous mobility, the directed mobility to the infectious focus (chemotaxis) and the proliferative response to the mitogen concanavalin A (ConA) in leukocytes from the three immune organs. In all

cases the values become close to those seen in cells from adult animals, a response similar to that found in our previous work on those lymphocyte functions studied *in vivo* in old Swiss mice fed with a diet supplemented with TP [150,151]. The effect of both antioxidants is similar in the immune functions studied. Thus we can suggest that the effects observed *in vivo* on the immune function after supplementation with TP are due to the direct action of this antioxidant, and those effects could be mediated, at least in part, by the increase of GSH in the immune cells. Moreover, as can be seen in Table 6, those concentrations of GSH and TP increase significantly the viability of leukocytes from axillary nodes, spleen and thymus throughout 72 hours of culture, and the differences with respect to the controls increase with the time of incubation, the GSH being the most effective.

Confirmation of the Oxidation-Inflammation Theory

The above mentioned oxidation-inflammation theory of aging can be supported by all those results with antioxidants, since the administration of adequate amounts of antioxidant compounds in the diet is a strategy of environmental conditions, including life style, which allows to break the vicious circle of the oxi-inflamm-aging. Thus, the oxidative and inflammatory stress, that appears to play a fundamental role in

Table 5. Effect *In Vitro* of GSH (5 mM) and TP (1 mM) on the Mobility (Spontaneous and Directed or Chemotaxis) and Proliferative Response to the Mitogen ConA in Lymphocytes from Axillary Nodes, Spleen and Thymus of old Swiss Mice

	Old Mice			Adult Mice
	Old controls	GSH	TP	Adult Controls
Axillary Nodes				
Spontaneous mobility	235±55	325±76 ^{*c}	376±89 ^{**c}	491±134 [#]
Chemotaxis	282±56	366±94 ^{*c}	396±85 ^{**c}	942±122 [#]
Proliferation to ConA	0.267±0.058	0.524±0.114 ^{***a}	0.464±0.118 ^{***c}	0.618±0.080 [#]
Spleen				
Spontaneous mobility	256±59	423±108 ^{***}	390±91 ^{**}	468±96 [#]
Chemotaxis	356±92	453±107 ^c	481±93 ^{*c}	757±190 [#]
Proliferation to ConA	0.463±0.059	0.633±0.163 ^{***}	0.809±0.130 ^{***c}	0.635±0.102 [#]
Thymus				
Spontaneous mobility	240±56	422±87 ^{***}	402±73 ^{***}	461±88 [#]
Chemotaxis	418±67	531±100 ^{*c}	494±63 ^{*c}	693±153 [#]
Proliferation to ConA	0.392±0.060	0.526±0.101 ^{***}	0.511±0.073 ^{***}	0.524±0.082 [#]

Each value is the mean±SD of 12 experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 with respect to the corresponding controls. [#]p<0.001 with respect to the old controls. ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 with respect to the adult controls. The methods carried out for analyzing the functions indicated have been previously described [151]. Spontaneous mobility and chemotaxis are expressed as number of cells _____ [151]; Proliferation as absorbance.

Table 6. Effect *In Vitro* of GSH (5 mM) and TP (1 mM) on the Viability (%) of Lymphocytes from Axillary Nodes, Spleen and Thymus of Old Swiss Mice at Different Time of Culture

Time (h)	Antioxidant	Axillary Nodes	Spleen	Thymus
1 h	Controls	86 ± 6	96 ± 3	93 ± 6
	GSH	92 ± 3 ^{**}	96 ± 3	98 ± 2 [*]
	TP	89 ± 4	97 ± 3	96 ± 2
4 h	Controls	82 ± 5	85 ± 6	91 ± 6
	GSH	89 ± 5 [*]	92 ± 4 ^{**}	97 ± 2 [*]
	TP	87 ± 6	94 ± 5 ^{**}	96 ± 3 [*]
6 h	Controls	82 ± 3	79 ± 7	88 ± 7
	GSH	88 ± 4 [*]	86 ± 7 ^{**}	91 ± 7 [*]
	TP	84 ± 3	88 ± 6 ^{**}	90 ± 6 [*]
24 h	Controls	68 ± 8	73 ± 7	71 ± 9
	GSH	79 ± 8 [*]	84 ± 3 ^{***}	77 ± 8 ^{**}
	TP	70 ± 9	80 ± 6 ^{**}	76 ± 7 [*]
48 h	Controls	33 ± 10	64 ± 9	56 ± 10
	GSH	72 ± 7 ^{***}	76 ± 7 ^{**}	66 ± 8 ^{**}
	TP	63 ± 12 ^{**}	72 ± 6 ^{**}	66 ± 8 ^{**}
72 h	Controls	23 ± 7	51 ± 11	24 ± 7
	GSH	67 ± 12 ^{***}	70 ± 6 ^{**}	55 ± 14 ^{***}
	TP	53 ± 7 ^{***}	65 ± 5 ^{**}	34 ± 7 ^{**}

Each value is the mean±SD of 8 experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 with respect to the corresponding controls. The cellular viability was evaluated by the trypan-blue exclusion test [170].

the aging of the immune system and other regulatory systems, can be counteracted to certain degree by antioxidant administration. In view of all the above it seems reasonable to propose that an adequate antioxidant diet supplementation may be a useful procedure to slow down the age-related homeostatic impairment and thus improve the health and biological age of subjects and increase their longevity (Fig. 5).

CONCLUSIONS AND FUTURES RESEARCH

In summary, aging is a loss of homeostasis related to a chronic oxidative stress, i.e. to an imbalance in the antioxidant/oxidant levels with an increase in ROS production and a decrease in antioxidant defenses. This chronic oxidative stress injures cells and all physiological systems, but the effects are more evident in the regulatory systems, such as nervous, endocrine and immune systems that allow the maintenance of homeostasis in the organism and therefore preserve health. This alteration could explain the impaired homeostasis that leads to an increase in the morbidity and mortality of aging. Focusing on the immune system, it produces oxidants and inflammatory compounds in its daily work, and if its function is not well regulated it can go into a vicious circle that maintains the state of chronic oxidative and inflammatory stress, and consequently increases the rate of aging of organisms. Thus, we propose an oxidation-inflammation theory of aging, or oxi-inflamm-aging, in which the immune system could have an important role. Moreover, an adequate nutrition, with antioxidant supplementation can neutralize in part the oxidative and inflammatory stress and the vicious circle of oxidation produced by the immune cells. More research is needed in order to provide further support for our hypothesis. The study of age-related genes is presently a focus of attention for much research, and this is an excellent subject of study. However, we propose also to investigate how epigenetic mechanisms acting on genes cause the loss of homeostasis, and the rate of this loss, since it is different for each subject. Moreover, we have to elucidate how the environment factors affect this rate from fetal life throughout the life of the subject. This seems the best way to be able to slow down the unavoidable aging process in each subject (Fig. 1).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Hernanz for his critical revision of the article, and also express their gratitude to Dr. Del Rio, Dr. Ferrandez, Dr. Correa, Dr. Medina, Dr. Victor, Dr. Vallejo, Dr. Guayerbas, Dr. Puerto, Dr. Alvarado, Dr. Alvarez, Dr. Alonso, Dr. Gimenez-Llort, Ms Sanchez, Ms De Castro, Ms Vida, Ms Maté, Ms Arranz and Ms Baeza for their invaluable help in performing the experiments which have allowed us to arrive at the ideas expressed in this article. This work was supported by grants of the MEC (BFU 2005-06777), MCINN (BFU2008-04336), Research Group of UCM (910379ENEROINN) and RETICEF (RD06/0013/0003) (ISCIII).

ABBREVIATIONS

AD = Alzheimer's disease
An-I = Anti-inflammatory compounds
Ax = Antioxidants

cAMP = Cyclic adenosine monophosphate
CAT = Catalase
DAG = Diacylglycerol
GPx = Glutathione peroxidase
GR = Glutathione reductase
GSH = Reduced glutathione
GSSG = Oxidized glutathione
HO = Hydroxyl radical
H₂O = Water
H₂O₂ = Hydrogen peroxide
IL = Interleukin
IP3 = Inositol triphosphate
MAPK = Mitogen-activated protein kinase
mtDNA = mitochondrial DNA
NAC = N-acetylcysteine
NFκB = Nuclear factor kappa B
NK = Natural killer cells
NPAM = Non-prematurely aging mice
O₂ = Molecular oxygen
O₂⁻ = Superoxide anion radical
PAM = Prematurely aging mice
PAMPs = pathogen-associated molecular patterns
P-I = Pro-inflammatory compounds
PKC = Protein kinase C
ROS = Reactive oxygen species
SIRT1 = Sirtuin 1
SOD = Superoxide dismutase
TNFα = Tumor necrosis factor-alpha
Tc = Lymphocytes T cytotoxic
Th = Lymphocyte T helper
TP = Thioproline
Treg = Lymphocyte T regulator
TLR = Toll-like receptor
XO = Xantin oxidase

REFERENCES

References 174-176 are related articles recently published.

- [1] Medawar PB. An unresolved problem of Biology. In: *The Uniqueness of the Individual*. London: Methuen 1957.
- [2] Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980; 15: 575-91.
- [3] Miquel J, Fleming JE. Theoretical and experimental support for an oxygen radical-mitochondrial damage hypothesis of cell aging. In: Johnson JE Jr, Harman D, Walford R, Miquel J, Eds. *Free radicals, aging and degenerative diseases*. New York: Alan R Liss 1986; pp. 51-74.
- [4] De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo, MC. The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favor-

- able effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1356-66.
- [5] De la Fuente M. Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 213-23.
- [6] Strehler BL. Time, cells and aging. New York: Academic Press 1977.
- [7] Kirkwood TBL, Feder M, Finch CE, Franceschi C, Globerson A, Klingenberg ChP, *et al.* What accounts for the Wide variation in life span of genetically identical organisms reared in a constant environment?. *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 439-43.
- [8] Workshop Report. Aging-from molecules to population. *Mech Ageing Dev* 2008; 129: 614-23.
- [9] Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* 1990; 65: 375-98.
- [10] Carnes BA, Staats DO, Sonntag WE. Does senescent give rise to disease?. *Mech Ageing Dev* 2008; 129: 693-9.
- [11] Viña J, Borrás C, Miquel J. Critical review: theories of aging. *IUBMB Life* 2007; 59: 249-54.
- [12] Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36.
- [13] Goyns MH. Genes, telomeres and mammalian ageing. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 791-9.
- [14] Pearl R. The rate of living. London: University of London Press 1928; 50.
- [15] Weissman A. Essays upon heredity and kindred biological problems. London-New York: Oxford University Press-Clarendon 1891.
- [16] Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1100: 1-13.
- [17] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 2: 298-300.
- [18] Gerschman R. Man's dependence on the earthly atmosphere. In: Schaeffer KS, Ed. *Proc 1st Symp Submarine and Space Medicine*. New York: MacMillan 1962; p. 475.
- [19] Harman D. The biological clock. The mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 1972; 20: 99-117
- [20] Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 2004; 27: 595-600.
- [21] Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Viña J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 2000; 32: 189-98.
- [22] Miquel J. An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat Res* 1992; 275: 209-16.
- [23] Pamplona R, Barja G. Aging rate, mitochondrial free radical production, and constitutive sensitivity to lipid peroxidation: insights from comparative studies. In: von Zglinicki T, Ed. *Aging Molecular Level*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers 200; pp. 47-64.
- [24] Miquel J, Economos AC, Johnson JE Jr. A systems analysis-thermodynamic view of cellular and organismic aging. In: Johnson JE Jr, Ed. *Aging and cell structure*. New York: Plenum Press 1984; vol. 2: pp. 247-80.
- [25] Beckman K, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-81.
- [26] Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem* 1986; 25: 1058-71.
- [27] Knight JA. Review: free radicals, antioxidants, and immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30: 145-58.
- [28] Yoon SO, Yun ChH, Cheng AS. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev* 2002; 50: 1-8.
- [29] Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 1998; 33: 113-26.
- [30] Miquel J, Oro J, Bensch KG, Johnson JE, Jr. Lipofuscin: fine structural and biochemical studies. In: Pryor W, Ed. *Free Radicals in Biology*. New York: Academic Press 1977; vol. 3: pp. 133-82.
- [31] Miquel J, Lundgren PR, Johnson JE. Spectrophotometric and electron microscopic study of lipofuscin accumulation in the testis of aging mice. *J Gerontol* 1978; 33: 5-19.
- [32] Miquel J, Lundgren PR, Bensch KG, Atlan H. Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 1976; 5: 347-70.
- [33] Miquel J, Binnard R, Fleming J. Role of metabolic rate and DNA repair in *Drosophila* aging: implications for the mitochondrial mutation theory of cell aging. *Exp Gerontol* 1983; 18: 167-71.
- [34] Fleming JE, Miquel J. Effects of temperature on the metabolic rate of *Drosophila*. *Experientia* 1983; 39: 267-8.
- [35] Fleming JE, Quatrocki E, Miquel J, Marcuson R, Zuckerkandl E, Bensch KG. Age dependent changes in proteins of *Drosophila melanogaster*. *Science* 1986; 231: 1157-59.
- [36] Miquel J, Ecnomos AC. Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidin carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol* 1979; 14: 279-85.
- [37] Ferrandiz ML, Martínez M, De Juan E, Diez A, Bustos G, Miquel J. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in the brain of aged mice. *Brain Res* 1994; 644: 335-38.
- [38] Linnane AW, Ozawa T, Marzuki S, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1989; i: 64-5.
- [39] Kowald A, Kirkwood TBL. Accumulation of defective mitochondria through delayed degradation of damaged organelles and its possible role in the aging of fixed post-mitotic and dividing cells. *J Theor Biol* 2000; 202: 145-60.
- [40] Miquel J. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr* 1991; 12: 99-117.
- [41] Minot CS. The problem of age, growth and age. *Pop Sci Monthly* 1907; 71: 509-27.
- [42] Williams GC. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 1957; 2: 397-411.
- [43] Muller M. Cellular senescence: molecular mechanisms, *in vivo* significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 59-98.
- [44] Kirkwood TBL, Holliday R. The evolution of aging and longevity. *Proc R Soc London* 1979; 205: 531-46.
- [45] McFarland RA. Human factors in air transportation: occupational health and safety. New York: McGraw-Hill 1953.
- [46] Finkel D, Whitfiel K, McGue M. Genetic and environmental influences on functional age: a twin study. *J Gerontol B Psicol Sci Soc Sci* 1995; 50: P104-113.
- [47] Borkan A, Norris AH. Assessment of biological age using a profile of physical parameters. *J Gerontol* 1980; 35: 177-84.
- [48] Bae ChY, Kang YG, Kim S, Cho Ch, Kang HCh, Yu BY, *et al.* Development of models for predicting biological age (BA) with physical, biochemical, and hormonal parameters. *Arch Gerontol Geriatr* 2008; 47: 253-65.
- [49] Wayne SL, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 1990; 45: M45-48.
- [50] Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and non-survivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995; 50: B378-82.
- [51] Yong-Xing M, Yue Z, Zan-Shun W, Shu-Qi Ch, Zi-Jun L, Jian-Gang Z, *et al.* Physiological basis for long life span. *Mech Ageing Dev* 1997; 98: 47-55.
- [52] Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, *et al.* Natural killer cells in the later decades of human life. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84: 269-75.
- [53] Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002; 37: 249-56.
- [54] Guayerbas N, Catalan M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* 2002; 134: 41-48
- [55] Guayerbas N, De La Fuente M. An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol* 2003; 27: 339-50.
- [56] De la Fuente M. The immune system as a marker of health and longevity. *Antiaging Med* 2004; 1: 31-41.
- [57] De la Fuente M. Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56: S5-8.
- [58] Kulinsky VI. Biochemical aspects of inflammation. *Biochemistry* 2007; 72: 595-607.
- [59] Csiszar A, Wang M, Lakatia EG, Ungvari Z. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. *J Appl Physiol* 2008; 105: 1333-41.
- [60] Lobby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* 2007; 65: S140-6.
- [61] Yuan H, Zheng JC, Liu P, Zhang SF, Xu JY, Bai LM. Pathogenesis of Parkinson's disease: oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory process. *Neurosci Bull* 2007; 23: 125-30.

- [62] Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 572-81.
- [63] Franceschi C. Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured?. *Nutr Rev* 2007; 65: S173-76.
- [64] Ostan R, Bucci L, Capri M, Salvioli S, Scurti M, Pini E, Monti D, Franceschi C. Immunosenescence and immunogenetic of human longevity. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 224-43.
- [65] Besedovsky HO, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrin Rev* 1996; 17: 64-102.
- [66] High KP. Infection as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing Res Rev* 2004; 3: 1-14.
- [67] Ortega E, García JJ, De la Fuente M. Ageing modulates some aspects on the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes. *Exp Physiol* 2000; 85: 519-25.
- [68] Sebastian C, Espia M, Serra M, Celada A, Lloberas J. Macrophage Aging: a cellular and molecular review. *Immunobiol* 2005; 210: 121-6.
- [69] Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of aging. *J Pathol* 2007; 211: 144-56.
- [70] Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* 2007; 120: 435-46.
- [71] Kumar R, Burns EA. Age-related decline in immunity: implications for vaccine responsiveness. *Expert Rev Vaccines* 2008; 7: 467-79.
- [72] Castle SC, Uyemura K, Fulop T, Makinodan T. Host resistance and immune responses in advanced age. *Clin Geriatr Med* 2007; 23: 463-79.
- [73] Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, *et al.* T cells and aging. *Front Biosci* 2002; 7: d1056-d83.
- [74] Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, *et al.* The number of human peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 540-46.
- [75] Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J, Mysliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans-impact of immunosenescence. *Clin Immunol* 2006; 119: 307-16.
- [76] Solana R, Pawelec G, Tarazona R. Aging and innate immunity. *Immunity* 2006; 24: 491-94.
- [77] Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quagliano D. The immune system in the elderly III. Innate immunity. *Immunol Res* 1999; 20: 117-26.
- [78] De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Álvarez P, Alvarado C. Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol* 2004; 50: 683-90.
- [79] De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F. Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic Res* 2008; 42: 272-80.
- [80] Gomez CR, Nomellini V, Frunce DE, Kovacs EJ. Innate immunity and aging. *Exp Gerontol* 2008; 43: 718-28.
- [81] De la Fuente M. Changes in the macrophage function with aging. *Comp Biochem Physiol* 1985; 81: 935-38.
- [82] Baeza I, De Castro NM, Arranz L, De la Fuente M. Expression of Toll-like receptors on peritoneal macrophages and dendritic cells from old mice treated with soybean isoflavones and green tea. *P Nutr Soc* 2008; 67 (OCE): E27.
- [83] Lord JM, Butcher S, Killampali V, Lascelles D, Salmon M. Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 1521-35.
- [84] Rafi A, Castle SC, Uyemura K, Makinodan T. Immune dysfunction in the elderly and its reversal by antihistaminas. *Biomed Pharmacother* 2003; 57: 246-50.
- [85] Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 2004; 5: 133-39.
- [86] Wrona D. Neural-immune interactions: An integrative view of bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* 2006; 172: 38-58.
- [87] Besedovsky HO, Del Rey A. Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun* 2007; 21: 34-44.
- [88] Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J Immunol* 1984; 132: 1067-70.
- [89] Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M. Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res* 2007; 62: 1-8.
- [90] Hernanz A, Bayon J, Bisbal E, Sanchez M, De la Fuente M. Leukocyte functions are altered in patients with depressive disorder. *J Neuroimmunol* 2008; 197: 167.
- [91] Arranz L, De Vicente A, Muñoz M, De la Fuente M. Impairment of immune function in the social excluded homeless population. *Neuroimmunomodulation* 2009. In press.
- [92] Barak Y. The immune system and happiness. *Autoimmun Rev* 2006; 5: 523-27.
- [93] Merrill JE. Production and influence of inflammatory cytokines in diseases of the adult central nervous system. In: Ader R, Felten DL, Cohen N, Ed. *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press 2001; pp. 547-61.
- [94] Smith RG, Betancourt L, Sun Y. Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system. *Endocr Rev* 2005; 26: 203-50.
- [95] Bellinger DL, Madden KS, Lorton D, Thyagarajan S, Felten DL. Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in immunosenescence. In: Ader R, Felten DL, Cohen N, Ed. *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press 2001; pp. 241-86.
- [96] Fabris N. A neuroendocrine-immune theory of aging. *Int J Neurosci* 1990; 51: 373-75.
- [97] McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialog Clin Neurosci* 2006; 8: 367-81.
- [98] Bauer ME. Chronic stress and immunosenescence. A review. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 244-53.
- [99] Gouin JP, Hantsoo L, Kiecolt-Glaser JK. Immune dysregulation and chronic stress among older adults: a review. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 254-62.
- [100] Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14: 157-62.
- [101] De la Fuente M, Del Rio M, Medina S. Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J Neuroimmunol* 2001; 116: 156-67.
- [102] De la Fuente M, Medina S. NPY and phagocytic cell functions. In: Zukowska Z, Feuerstein GZ, Eds. *The NPY Family of Peptides in Immune Disorders, Inflammation, Angiogenesis and Cancer*. Basel/Switzerland: Birkhäuser Verlag 2005; pp. 107-22.
- [103] Puerto M, Guayerbas N, Alvarez, P, De la Fuente M. Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leukocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol* 2005; 165: 33-40.
- [104] Pawelec G. Immunity and ageing in man. *Exp Gerontol* 2006; 41: 1239-42.
- [105] Alonso-Fernandez P, Puerto M, Maté I, Ribera JM, De la Fuente M. Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of adults. *J Am Geriatr Soc* 2008; 56: 2244-51.
- [106] Meydani SN, Wu D. Age-associated inflammatory changes: role of nutritional intervention. *Nutr Rev* 2007; 65: S213-16.
- [107] Hirokawa K. Age-related changes of signal transduction in T cells. *Exp Gerontol* 1999; 34: 7-18.
- [108] De la Fuente M, Del Rio M, Victor VM, Medina S. Neuropeptide Y effects on murine natural killer activity. Changes with aging and cAMP involvement. *Regul Pept* 2001; 101: 73-79.
- [109] Garcia GG, Sadighi AA, Millar RA. Age-related defects in moesin/serrin cytoskeletal signals in Mouse CD4 T cells. *J Immunol* 2007; 179: 6403-09.
- [110] Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-71.
- [111] Victor VM, De la Fuente M. Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF-kappaB. *Free Radic Res* 2003; 37: 19-27.
- [112] Victor VM, Rocha M, Esplugues JV, De la Fuente M. Role of free radicals in sepsis: Antioxidant therapy. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 3141-58.
- [113] Gwinn MR, Vallyathan V. Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health* 2006; 9: 27-39.
- [114] Trebilcock GU, Ponnappan U. Evidence for lowered induction of nuclear factor kappa B in activated T lymphocytes during aging. *Gerontology* 1996; 42: 137-46.
- [115] Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Activation of innate immunity system during aging:

- NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. Ageing Res Rev 2008; 7: 83-105.
- [116] Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K. SIRT 1 longevity factor suppresses NF- κ B-driven immune responses: regulation of aging *via* NF- κ B acetylation?. Bioessays 2008; 30: 939-42.
- [117] De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. Exp Mol Pathol 2006; 80: 219-27.
- [118] De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, *et al.* Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. Biogerontology 2004; 5: 389-400.
- [119] Viña J, Sastre J, Pallardo FV, Gambini J, Borras C. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders. Protective effect of estrogens. Free Radic Res 2006; 40: 1359-65.
- [120] Nieman DC, Henson DA, Nehlsen-Cannarella SL, Ekkens M, Utter AC, Butterworth DE, *et al.* Influence of obesity on immune function. J Am Diet Assoc 1999; 99: 294-9.
- [121] Marcos A, Nova E, Montero A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. Eur J Clin Nutr 2003; 57: 566-69.
- [122] Lamas O, Marti A, Martinez JA. Obesity and immunocompetence. Eur J Clin Nutr 2002; 56: 542-45.
- [123] Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, *et al.* Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. Eur Cytokine Netw 2006; 17: 4-12.
- [124] Heneka MT, O'Banion MK. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. J Neuroimmunol 2007; 184: 69-91.
- [125] Sonnen JA, Breitner JC, Lovell MA, Markesbery WR. Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models. Free Radic Biol Med 2008; 45: 219-30.
- [126] Gimenez-Llort L, Arranz L, Maté I, De la Fuente M. Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's Disease and its relation with longevity. Neuroimmunomodulation 2008; 15: 331-43.
- [127] Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, Barbi C, Bonafé M. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. Exp Gerontol 1999; 34: 911-21.
- [128] De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. FEBS Lett 2005; 579: 2035-9.
- [129] Ferencik M, Stvrtnova V, Hulin I, Novak M. Inflammation-a lifelong companion. Attempt at a non-analytical holistic view. Folia Microbiol 2007; 52: 159-73.
- [130] Walford L. The Immunologic Theory of Aging. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland 1969; 70-75.
- [131] Meister M. Blood cells of *Drosophila*. cell lineages and role in host defence. Curr Opin Immunol 2004; 16: 10-5.
- [132] Lavina MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol 2002; 32: 1295-309.
- [133] Tirouvanzian R, Davidson CJ, Lipsick JS, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of *Drosophila* hemocytes reveals important functional similarities to mammalian leukocytes. Proc Natl Acad Sci 2003; 101: 2912-7.
- [134] Manaka J, Kuraishi T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Higashida H, Henson P, *et al.* Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. J Biol Chem 2004; 279: 48466-76.
- [135] Crozatier M, Meister M. *Drosophila* haematopoiesis. Cell Microbiol 2007; 9: 1117-26.
- [136] Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. Toll-like receptor signal transduction. Exp Mol Med 2007; 39: 421-38.
- [137] McCoy CE, O'Neill LA. The role of toll-like receptors in macrophages. Front Biosci 2008; 13: 62-70.
- [138] Vijg J, Müller WEG. The science of aging and the need for a mechanistic approach. Mech Ageing Dev 2000; 114: 1-3.
- [139] Fossati G, Moulding DA, Spiller DG, Moots RJ, White MRH, Edwards SW. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. J Immunol 2003; 170: 1964-72.
- [140] Miquel J. Can antioxidant diet supplementation protect against age-related mitochondrial damage? Ann NY Acad Sci 2002; 959: 508-16.
- [141] Cutler RG. Antioxidants and aging. Am J Clin Nutr 1991; 53: 373S-9.
- [142] Orr WC, Sohal R. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. Science 1994; 263: 1128-30.
- [143] Barja G. Mammalian and bird aging, oxygen radicals, and restricted feeding. In Model Systems in Aging. New York: Springer 2004; pp. 173-89.
- [144] Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R. Oxidative stress, human genetic variation and disease. Arch Biochem Biophys 2001; 389: 84-93.
- [145] Guayerbas N, Puerto M, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. Thiolic antioxidant supplementation of the diet reverses age-related behavioral dysfunction in prematurely ageing mice. Pharmacol Biochem Behav 2005; 80: 45-51.
- [146] De la Fuente M, Ferrández MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A, Miquel J. Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. Can J Physiol Pharmacol 1998; 76: 373-80.
- [147] Arranz L, Fernandez C, Rodriguez A, Ribera JM, De la Fuente M. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. Free Radic Biol Med 2008; 45: 1252-62.
- [148] Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, De la Fuente M. Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. Pharmacol Biochem Behav 2002; 73: 797-804.
- [149] Guayerbas N, Puerto M, Alvarado C, De la Fuente M. Effect of diet supplementation with N-acetylcysteine on leukocyte functions in prematurely ageing mice. J Appl Biomed 2005; 3: 199-205.
- [150] De la Fuente M, Ferrández MD, Muñoz F, De Juan E, Miquel J. Stimulation by the antioxidant thioproline of the lymphocyte functions of old mice. Mech Ageing Dev 1993; 68: 27-36.
- [151] De la Fuente M, Ferrández MD, Del Rio M, Burgos MS, Miquel J. Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline. Mech Ageing Dev 1998; 104: 213-25.
- [152] Correa R, Blanco B, Del Rio M, Victor V, Guayerbas N, Medina S, *et al.* Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. Biofactors 1999; 10: 195-200.
- [153] De la Fuente M, Guayerbas N, Catalán MP, Victor VM, Miquel J. The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve the immune functions is higher in aged than in adult mice. Free Radic Res 2002; 36: 119-26.
- [154] Guayerbas N, Puerto M, Ferrandez MD, De la Fuente M. A diet supplemented with thiolic antioxidants improves leukocyte function in two strains of prematurely ageing mice. Clin Exp Pharmacol Physiol 2002; 29: 1009-14.
- [155] Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, De la Fuente M. Improvement of the macrophage functions in premature ageing mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. Cell Mol Biol 2004; 50: OL677-OL81.
- [156] Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L, De la Fuente M. Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. Antioxid Redox Signal 2005; 7: 1203-10.
- [157] Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausserés N, Jimenez L, De la Fuente M. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. Nutrition 2006; 22: 767-77.
- [158] Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L, De la Fuente M. Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants. Dev Comp Immunol 2006; 30: 1168-80.
- [159] Alvarez P, Alvarado C, Puerto M, Schlumberger A, Jimenez L, De la Fuente M. Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals. Nutrition 2006; 22: 913-21.
- [160] Baeza I, De Castro NM, Alvarado C, Alvarez P, Arranz L, Bayon J, *et al.* Improvement of immune cell functions in aged mice treated for 5 weeks with soybean isoflavones. Ann N Y Acad Sci 2007; 1100: 497-504.
- [161] Hernanz A, Collazos ME, De la Fuente M. Effect of age, culture media and lymphocyte presence in ascorbate content of peritoneal macrophages from mice and guinea pigs during phagocytosis. Int Arch Allergy Appl Immunol 1990; 91: 166-70.

- [162] Blanco B, Ferrández MD, Correa R, Del Rio M, Guaza C, Hernanz A, *et al.* Changes in several functions of murine peritoneal macrophages by N-acetylcysteine and thioproline ingestion. Comparative effect between two strains of mice. *Biofactors* 1999; 10: 179-85.
- [163] De la Fuente M, Carazo M, Correa R, Del Rio M. Changes in macrophage and lymphocyte functions in guinea-pigs after different amounts of vitamin E ingestion. *Brit J Nutr* 2000; 84: 25-29.
- [164] Alvarez P, Alvarado C, Mathieu F, Jimenez L, De la Fuente M. Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leukocytes. *Eur J Nutr* 2006; 45: 428-38.
- [165] De la Fuente M, Victor VM. Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 49-54.
- [166] Viña JR. *Glutathione: Metabolism and Physiological Function*. CRC Press Boston 1990.
- [167] Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 916-21.
- [168] Hernanz A, Fernández-Vivancos E, Montiel C, Vázquez JJ, Arnalich F. Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci* 2000; 67: 1317-24.
- [169] Arnalich F, Hernanz A, López-Maderuelo M, De la Fuente M, Arnalich FM, Andrés-Mateos E, *et al.* Intracellular glutathione deficiency is associated with enhanced nuclear factor- κ B activation in older non-insulin dependent diabetic patients. *Free Radic Res* 2001; 35: 873-84.
- [170] Del Rio M, Ruedas G, Medina S, Victor VM, De la Fuente M. Improvement by several antioxidants of macrophage function *in vitro*. *Life Sci* 1998; 63: 871-81.
- [171] Correa R, Del Rio M, De la Fuente M. Improvement of murine immune functions *in vitro* by thioproline. *Immunopharmacology* 1999; 44: 281-91.
- [172] Pomaki M, Mota MJ, De la Fuente M, Berger J. Effect of thiolic antioxidants on *in vitro* mouse peritoneal macrophage functions. *Comp Clin Pathol* 2005; 13: 176-81.
- [173] Ferrández MD, Correa R, Del Rio M, De la Fuente M. Effects *in vitro* of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 1999; 34: 675-85.
- [174] Amadio M, Scapagnini G, Laforenza U, Intrieri M, Romeo L, Govoni S, *et al.* Post-transcriptional regulation of HSP70 expression following oxidative stress in SH-SY5Y cells: the potential involvement of the RNA-binding protein HuR. *Curr Pharm Des* 2008; 14(26): 2651-8.
- [175] Hyogo H, Yamagishi S. Advanced glycation end products (AGEs) and their involvement in liver disease. *Curr Pharm Des* 2008; 14(10): 969-72.
- [176] Unoki H, Yamagishi S. Advanced glycation end products and insulin resistance. *Curr Pharm Des* 2008; 14(10): 987-9.

Received: April 15, 2009

Accepted: April 18, 2009





Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice[☆]

M. D. Ferrández, R. Correa, M. Del Rio, and M. De la Fuente*

Department of Animal Physiology, Faculty of Biological Sciences, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

Received 21 October 1998; received in revised form 15 February 1999; accepted 16 February 1999

Abstract

The aim of the present work is to study the change with aging in the effect in vitro of several antioxidants: thiazolidine-4-carboxylic acid or thioproline, N-acetylcysteine (NAC), ascorbic acid (AA), and α -tocopherol (vitamin E, VE) on the natural killer (NK) activity in mononuclear cells from axillary nodes, spleen, thymus and peritoneal leukocytes from BALB/c male mice. Young (8 ± 2 weeks), adult (24 ± 2 weeks), mature (48 ± 2 weeks), and old (72 ± 2 weeks) animals were studied. A nonradioactive cytotoxic assay with cells from the murine lymphoma YAC-1 as target cells and a relation effector cells/target cells of 10/1 were used. The concentrations of the different antioxidants were: 1 mM for thioproline and N-acetylcysteine and 5 μ M for ascorbic acid and α -tocopherol, which induced a maximum effect in our previous dose-response experiments. The results show that, in general, the above antioxidants cause an enhancement of the NK activity at all ages studied, this stimulation being higher with thioproline and N-acetylcysteine than with ascorbic acid and α -tocopherol. The effects were similar for the three lymphoid organs and the peritoneum. This stimulation of the NK activity by antioxidants is an important favorable response, especially in old mice, in which age results in a decrease in NK function and, therefore, in a higher incidence of neoplasia. © 1999 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: NK cell activity; Thioproline; N-acetylcysteine; Ascorbic acid; α -tocopherol; Lymphocytes; Macrophages

1. Introduction

Aging is linked to changes in the immune system, both in humans and in many mammalian species (Solana et al., 1991; Franceschi et al., 1995; Miller, 1996; Pawelec et

[☆] This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social Grant Nos. 95/1623 and 97/2078.

* Corresponding author. Tel.: +34-91-3944989; fax: +34-91-3944935.

E-mail address: mondelaf@eucmax.sim.ucm.es (M. De la Fuente)

al., 1997). In general, the results obtained on the effects of age on the immune system show that a decline occurs mainly in the T-cell-dependent immune functions (Hirokawa et al., 1994; Pawelec, 1995; Globerson, 1995), one of the most important of which is the natural killer (NK) cell activity that plays a fundamental role in the surveillance against neoplastic growth, in addition to its important regulatory function (Trincheri, 1989; O'Shea and Ortaldo, 1992). There are contradictory results concerning changes in NK cell activity with aging. Thus, this activity has been found to be increased (Krishnaraj and Blandford, 1988) or unchanged (Pross and Baines, 1982; Ligthart et al., 1989), although most research shows a decrease with aging (Riccardi et al., 1986; Bocchieri et al., 1988; Bloom, 1994; Hirokawa et al., 1994; Kutza et al., 1995; Mariani et al., 1996).

Cells of the immune system are particularly sensitive to changes in the antioxidant status not only because the antioxidant/oxidant balance is responsible for maintaining the in-

tegrity and functionality of membrane lipids, cellular proteins, and nucleic acids, and controlling signal transduction of gene expression in immune cells (Meydani et al., 1995), but also because immune cells perform important functions through the generation of a high number of oxygen free radicals. For these reasons, it is not surprising that immune cells usually have higher concentrations of antioxidants than other cells (Coquette et al., 1986).

Tissues of older organisms are relatively more vulnerable to free radical-induced damage. This fact and the above-mentioned senescent immune changes may be the result of an increase in the rate of free-radical generation and/or a decline in the competence of antioxidants (Sohal and Allen, 1986), including substances such as ascorbic acid (AA), α -tocopherol (VE), and thiolic compounds. Therefore, several authors have linked the immune changes in the aging process to a progressive oxidation of thiolic compounds (Oeriu and Vochitu, 1965; Weber and Miquel, 1986; Miquel and Weber, 1990).

AA and VE have been shown to have an immunostimulatory role (Meydani, 1991; Bendich, 1992; Jariwalla and Harakeh, 1996). Moreover, we have observed the positive effect on macrophage function *in vitro* of several antioxidants such as AA, VE, and thiolic compounds, namely N-acetylcysteine (NAC), thioproline, and glutathione (GSH) (Del Rio et al., 1998). Thioproline has been shown, by our group, to have a favourable effect on NK activity when administered in the diet to old mice (De la Fuente et al., 1993). Recently, it has been reported that NAC enhances the adhesion properties of NK cells, increasing their cytolytic activity (Rivabene et al., 1995).

Thus, the aim of this work is to study the effects *in vitro* of several antioxidants on age-related changes in NK activity, to justify the attempts to improve the immune system in old age by dietary supplementation with antioxidants such as AA, VE, and thiolic compounds such as thioproline (thiazolidine-4-carboxylic acid) and N-acetylcysteine (NAC).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Young (8 ± 2 weeks), adult (24 ± 2 weeks), mature (48 ± 2 weeks), and old (72 ± 2 weeks) male BALB/c mice (Iffa Credo, France) were used. All animals were maintained on a 12-h reversed light/dark cycle, at a constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and fed Sander

Mus (Panlab) and water ad libitum. Mice were checked periodically to verify their pathogen-free condition.

2.2. Antioxidants

Thioprolone and N-acetylcysteine (Sigma) had a final concentration of 1 mM. AA and VE (Merck) had a concentration of 5 μ M. Both concentrations induced a maximum effect in previous dose-response experiments.

2.3. Collection of peritoneal leukocytes

Peritoneal suspensions were obtained from each animal after cervical dislocation. The abdomen was cleansed with 70% ethanol, the abdominal skin was carefully dissected without opening the peritoneum, and 4 mL of Hank's solution adjusted to pH 7.4 were injected intraperitoneally (i.p.). The abdomen was massaged and a 90–95% of the injected volume was recovered. Cell viability was 95–98%, as determined by trypan-blue exclusion.

2.4. Collection of mononuclear cells from immunocompetent organs

Cellular suspensions were obtained from axillary nodes, spleen, and thymus of mice. The organs were removed aseptically, freed of fat, minced with scissors, and gently pressed through a mesh screen (Sigma). The cellular suspensions were centrifuged (2 500 rev./min 25 min) in a gradient of Urograph-Ficoll (Schering and Sigma, respectively) with a density of 1.070. The hallos were resuspended in RPMI 1640 enriched with L-glutamine (Life Technologies Canada, Burlington, Ontario) and supplemented with 10% fetal calf serum (Life Technologies) and gentamicin (100 μ g/mL, Life Technologies) and washed three times. Cell viability was measured by using the trypan-blue exclusion test, showing a viability of 95%.

2.5. NK assay

An enzymatic colorimetric assay was used for cytolysis measurements of target cells (Cytotox 96 TM Promega, Boehringer Ingelheim) based on the determination of LDH using tetrazolium salts. This technology has been demonstrated to provide identical values (within experimental error) to those obtained by parallel ^{51}Cr release assays of our own (Del Rio and De la Fuente, 1995) and of other authors (Decker and Lohmann-Matthes, 1988). Murine lymphoma YAC-1 cells were used as targets in the NK assay. The cells were maintained in complete medium (RPMI-1640 plus 10% fetal calf serum, Life Technologies). Target cells were seeded in 96-well U-bottom culture plates (Costar) at 10^4 cells/well in 1640 RPMI without phenol red. Effector cells, i.e. mononuclear cells from axillary nodes, spleen, or thymus and peritoneal leukocytes, which have been previously used in NK studies (Scaringi et al., 1990; Sayer et al., 1990; De la Fuente et al., 1993b) were added at 10^5 cells/well. The effector/target rate used—10/1—allowed us to observe similar results to those obtained previously. The antioxidants at the different concentrations studied were added to the wells. The plates were centrifuged at $250 \times g$ for 4 min to facilitate cell contacts and then they were incubated for 4 h at 37°. After incubation, lactate dehydrogenase enzymatic activity was measured in 50 μ L/well of the supernatants

by addition of the enzyme substrate and absorbance recording at 490 nm. Three kinds of control measurements were performed: a target spontaneous release, a target maximum release, and an effector spontaneous release. To determine the percentage of target cells killed, the following equation was used: % lysis = $((E - ES - TS)/(M - ES - TS)) \times 100$, where E = mean of absorbances in the presence of effector cells, ES = mean of absorbances of effector cells incubated alone, TS = mean of absorbances in target cells incubated with medium alone, and M = mean of maximum absorbances after incubating target cells with lysis solution.

In addition, one more control (with YAC-1 cells and antioxidants, without effector cells) was performed to rule out a possible effect of the antioxidants on cell viability.

2.6. Statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm SD of the values from eight experiments performed in duplicate. In the statistical study, the normality of the samples was confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test and the homogeneity of variances by the Levene test. When the variances were homogeneous, the two-way analysis of variance (ANOVA; main effects and interactions) and Scheffe's *F*-test were used for the comparison of parametric samples. Conversely, when the variances were not homogeneous, the two-way ANOVA and Tamhane test were used.

3. Results

The results obtained in the present work show the changes with age on the natural cytotoxicity in mice and the effect of several antioxidants on this function at four different ages. The possible action of these antioxidants on target cell viability was ruled out by the control experiments performed with that purpose, which confirmed they had no effect at this level.

The age-related changes in the percentage of natural cytotoxicity from axillary nodes are shown in Fig. 1. The values obtained in adult mice (24 ± 2 weeks old) were significantly higher ($p < 0.001$) than those of young (12 ± 2 weeks old) and old mice (72 ± 2 weeks old). The presence in vitro of the antioxidants (Table 1) enhanced the natural cytotoxicity, causing statistically significant differences with respect to controls at the different ages studied. In young mice, thioproline, NAC, VE, and AA increased the natural cytotoxicity in vitro ($p < 0.01$ for AA and $p < 0.001$ for the other three). The effects of thioproline and NAC were significantly higher than those of AA and vitamin E. In adult mice, thioproline and NAC increased this function markedly ($p < 0.001$), which was also increased by VE ($p < 0.01$) and AA ($p < 0.05$). Again, the effects of thioproline and NAC were significantly higher than those of AA and VE. In mature mice (48 ± 2 weeks old), only thioproline showed a significant effect ($p < 0.01$), and the values obtained were statistically different from those of AA and VE. Finally, in old mice, all the antioxidants used augmented significantly ($p < 0.001$) the NK activity. The values being, again, significantly higher for thioproline and NAC than for AA and VE. The two-way ANOVA test showed statistically significant results for the effect of age ($p < 0.001$) and antioxidants ($p < 0.001$), with a significant interaction between both ($p < 0.001$).

Regarding the NK activity of spleen, like in axillary nodes, it was lower in young and old animals as compared with adults (Fig. 1). The antioxidants enhanced the natural

CELL LYSIS (%)

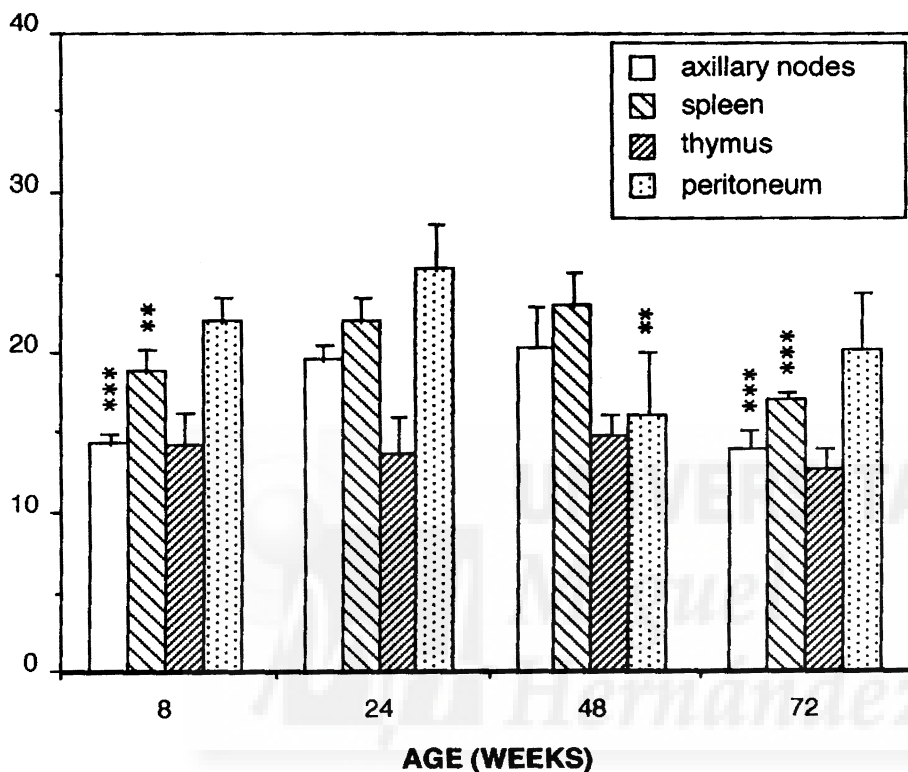


Fig. 1. NK lysis percentages of total mononuclear cells from axillary nodes, spleen, thymus, and peritoneal leukocytes from young (8 ± 2 weeks), adult (24 ± 2 weeks), mature (48 ± 2 weeks), and old (72 ± 2 weeks) BALB/c male mice. Each value is the mean \pm SD of eight experiments performed in duplicate. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to the corresponding adult values.

cytotoxicity, with statistically significant differences with respect to controls at the different ages studied (Table 2). Thus, in young mice all the studied antioxidants enhanced ($p < 0.001$) the NK activity, with the effect of thioproline being significantly higher than that of the others. In adult mice, thioproline, NAC, and VE increased this activity significantly ($p < 0.01$), but the increase was not statistically significant in the presence of AA. In mature mice, with the exception of AA and NAC, the antioxidants augmented the natural cytotoxicity (thioproline, $p < 0.01$, and vitamin E, $p < 0.001$). In old mice, all the antioxidants increased NK activity significantly ($p < 0.01$ for thioproline, NAC and VE; $p < 0.05$ for AA). The two-way ANOVA test showed statistically significant results for the effects of the two independent variables, i.e. age ($p < 0.001$) and antioxidants ($p < 0.001$), with a significant interaction between both ($p < 0.001$).

The NK activity of thymus did not show any significant changes with age (Fig. 1). Again, the presence of antioxidants in vitro enhanced the natural cytotoxicity with respect to controls (Table 3). In young mice, the four antioxidants increased this activity significantly ($p < 0.001$). The same occurs with adult mice and in these animals the effect observed with NAC was higher ($p < 0.05$) than that of ascorbic acid. In mature mice, again the four antioxidants stimulated NK ($p < 0.001$) and the effect of NAC was

Table 1

NK lysis percentages of total mononuclear cell suspensions from axillary nodes of BALB/c mice incubated with thioproline (1 mM), NAC (1 mM), ascorbic acid (5 μ M), and α -tocopherol (5 μ M)

	Young	Adult	Mature	Old
Control	14.2 \pm 0.7	19.5 \pm 1.0	20.3 \pm 2.6	14.0 \pm 1.0
Thioproline	36.9 \pm 4.1 ***	31.4 \pm 2.7 ***	31.0 \pm 5.9 **	32.7 \pm 5.1 ***
NAC	41.6 \pm 4.1 ***	37.6 \pm 3.8 [†] ***	25.4 \pm 3.9	39.3 \pm 7.1 ***
Ascorbic acid	26.7 \pm 3.7 ^{†,‡} **	25.1 \pm 3.5 ^{†,‡,‡‡} *	17.5 \pm 2.4 ^{††,‡‡}	25.4 \pm 3.1 [‡] ***
Tocopherol	27.9 \pm 4.6 ^{†,‡‡‡} ***	23.7 \pm 2.0 ^{†††,‡‡‡} **	17.7 \pm 2.1 ^{††,‡‡}	24.3 \pm 1.2 ^{†,‡} ***

Each value is the mean of eight experiments performed in duplicate.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to control values.

[†] $p < 0.05$; ^{††} $p < 0.01$; ^{†††} $p < 0.001$ with respect to thioproline values.

[‡] $p < 0.05$; ^{‡‡} $p < 0.01$; ^{‡‡‡} $p < 0.001$ with respect to NAC values.

significantly higher than that of the other antioxidants. In old mice, thioproline enhanced significantly the percentage of lysis ($p < 0.001$) as did the remaining antioxidants ($p < 0.01$). The two-way ANOVA test showed statistically significant results for the effect of antioxidants ($p < 0.001$), with significant interaction with age ($p < 0.001$).

Finally, the NK activity of peritoneal cell suspensions did not show any significant changes with age (Fig.1). Table 4 shows the effect of the antioxidants on the percentages of NK lysis from peritoneum. In young mice, only AA showed a statistically significant difference with respect to control ($p < 0.001$), showing significant differences with respect to the thioproline and NAC values. In adult animals, thioproline ($p < 0.001$), NAC ($p < 0.001$), and VE ($p < 0.01$) enhanced NK activity. The increase obtained in mature age was highly significant ($p < 0.001$) for thioproline, NAC, and VE. In old mice, AA and VE showed significant differences with respect to controls ($p < 0.01$ and $p < 0.001$,

Table 2

NK lysis percentages of total mononuclear cell suspensions from spleen of BALB/c mice incubated with thioproline (1 mM), NAC (1 mM), ascorbic acid (5 μ M), and α -tocopherol (5 μ M).

	Young	Adult	Mature	Old
Control	18.9 \pm 1.2	22.0 \pm 1.5	23.0 \pm 2.1	17.0 \pm 0.7
Thioproline	44.4 \pm 6.0 ***	33.8 \pm 4.4 **	39.6 \pm 7.6 **	29.4 \pm 5.7 **
NAC	37.4 \pm 3.6 [†] ***	44.2 \pm 9.3 **	28.5 \pm 5.6	25.1 \pm 4.0 **
Ascorbic acid	32.0 \pm 4.2 ^{†††} ***	25.3 \pm 4.3 ^{†,‡‡}	23.6 \pm 2.2 ^{††}	24.3 \pm 4.4 *
Tocopherol	32.9 \pm 4.2 ^{†††} ***	35.5 \pm 7.0 [§] **	36.9 \pm 4.4 ^{§§} ***	26.2 \pm 3.1 **

Each value is the mean of eight experiments performed in duplicate.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to control values.

[†] $p < 0.05$; ^{††} $p < 0.01$; ^{†††} $p < 0.001$ with respect to thioproline values.

[‡] $p < 0.05$; ^{‡‡} $p < 0.01$; ^{‡‡‡} $p < 0.001$ with respect to NAC values.

[§] $p < 0.05$; ^{§§} $p < 0.01$ with respect to ascorbic acid values.

Table 3

NK lysis percentages of total mononuclear cell suspensions from thymus of BALB/c mice incubated with thioproline (1 mM), NAC (1 mM), ascorbic acid (5 μ M), and α -tocopherol (5 μ M)

	Young	Adult	Mature	Old
Control	14.1 \pm 2.1	13.6 \pm 2.3	14.7 \pm 1.3	12.5 \pm 1.3
Thioproline	25.8 \pm 3.0 ***	26.5 \pm 1.9 ***	27.2 \pm 3.2 ***	32.5 \pm 2.4 ***
NAC	30.9 \pm 7.0 ***	28.0 \pm 3.3 ***	32.8 \pm 4.1 [†] ***	27.1 \pm 5.2 **
Ascorbic acid	27.0 \pm 2.7 ***	22.4 \pm 2.5 ^{††} ***	23.1 \pm 2.8 ^{†††} ***	27.8 \pm 5.2 **
Tocopherol	28.2 \pm 2.8 ***	26.0 \pm 2.8 ***	23.9 \pm 1.2 ^{†††} ***	34.6 \pm 7.9 **

Each value is the mean of eight experiments performed in duplicate.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to control values.

[†] $p < 0.01$ with respect to thioproline values.

^{††} $p < 0.05$; ^{†††} $p < 0.001$ with respect to NAC values.

respectively), whereas thioproline and NAC had no significant effect. The two-way ANOVA test showed statistically significant results for the effect of age ($p < 0.001$) and antioxidants ($p < 0.001$), with significant interaction between both ($p < 0.001$).

4. Discussion

With respect to the influence of age on NK activity, the results from the control groups indicate that aging induces a decrease in this function, at least in mononuclear cells obtained from axillary nodes and spleen. This finding agrees with the generally accepted idea that immune functions decline with age, fundamentally lymphocyte responses (Hirokawa et al., 1994; Pawelec, 1995; Solana and Pawelec, 1998), and concretely the NK

Table 4

NK lysis percentages of total mononuclear cell suspensions from peritoneum of BALB/c mice incubated with thioproline (1 mM), NAC (1 mM), ascorbic acid (5 μ M), and α -tocopherol (5 μ M).

	Young	Adult	Mature	Old
Control	12.0 \pm 1.4	15.2 \pm 2.8	6.1 \pm 3.9	10.2 \pm 3.5
Thioproline	11.2 \pm 2.8	30.4 \pm 6.1 ***	28.0 \pm 6.3 ***	13.9 \pm 1.9
NAC	9.4 \pm 3.2	28.4 \pm 5.5 ***	29.5 \pm 7.4 ***	16.5 \pm 7.0
Ascorbic acid	22.9 \pm 1.2 ^{†††,‡‡‡} ***	22.9 \pm 4.6	14.8 \pm 3.2 ^{†,‡}	32.1 \pm 6.4 ^{††,‡} **
Tocopherol	18.1 \pm 5.0	28.5 \pm 5.6 **	30.1 \pm 8.4 [§] ***	32.6 \pm 6.4 ^{††,‡‡} ***

Each value is the mean of eight experiments performed in duplicate.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to control values.

[†] $p < 0.05$; ^{††} $p < 0.01$; ^{†††} $p < 0.001$ with respect to thioproline values.

[‡] $p < 0.05$; ^{‡‡} $p < 0.01$; ^{‡‡‡} $p < 0.001$ with respect to NAC values.

[§] $p < 0.05$ with respect to ascorbic acid values.

activity (Mysliwska et al., 1992; Mariani et al., 1996; Albright and Albright, 1998). In fact, this loss of NK function with aging would explain, at least in part, the higher incidence of neoplastic growth in old age.

The different response of the natural activity from thymus cells (with respect to those from the other locations) to age (no effect) and to the antioxidants (high significant effect at all ages studied), could be explained on the basis of the different cellular populations on the immunocompetent organs studied. Moreover, thymus is a primary immune organ with a low proportion of differentiated cells and concretely of NK cells, a possible explanation for the low levels of NK activity obtained in controls. The observed increase in this response caused by antioxidants could have a favourable effect as regards the control of tumor growth.

The usefulness of diet supplementation with antioxidants to prevent or limit age-related immune depression has been recently shown in mice by many authors (Furakawa et al., 1990; De la Fuente et al., 1998a). Immune cells require a delicate balance between prooxidant and antioxidant mechanisms and reduced glutathione (GSH) plays a key role because of the reducing power caused by the presence of a sulfhydryl group of cysteine. As indicated by Saez et al. (1990), adequate levels of GSH contribute to the reduction of hydrogen peroxide and lipid peroxides catalyzed by GSH peroxidase, thus serving as an inhibitor of peroxidation-induced damage linked to excessive free-radical production during oxidative stress.

In agreement with the above, not only GSH (Pieri et al., 1992) but also thioproline and NAC, which act as glutathione precursors in cells, exert a favourable effect on immune cells, the function of which depends on redox reactions of thiol compounds (Miquel and Weber, 1990). Thus, GSH has been shown to increase lymphoproliferation in response to mitogens in rat splenocytes (Pieri et al., 1992) as well as mobilization of neutrophils, also in rats (Atalay et al., 1996), and we have observed a stimulation of murine lymphocyte proliferation and migration after ingestion of a diet supplemented with thioproline for 36 weeks (De la Fuente et al., 1993). Even a short-term ingestion of this antioxidant (5 weeks) by old mice showed a stimulant effect on proliferation and mobility of lymphocytes, as well as on cytotoxic activities such as antibody-dependent cellular cytotoxicity and NK activity (De la Fuente et al., 1998a). The antioxidant NAC has also been proven to enhance the NK activity of lymphocytic cells from human peripheral blood, acting on the distribution of those molecules of the cytoskeleton, which are implicated in cell-substrate and cell-to-cell contacts (Rivabene et al., 1995). The other thiolic antioxidant used, namely thioproline, may exhibit a similar action on cytolytic cells. Furthermore, in a recent study, Urban et al. (1997) have shown that ingestion of NAC (600 mg daily) by healthy individuals for a period of 2 weeks optimizes phagocytosis of neutrophils. We have also observed that thioproline, NAC and GSH increase, *in vitro* several functions of murine peritoneal macrophages (Del Rio et al., 1998). Thus, in the present work, the highest increases of NK activity were usually seen in response to NAC and thioproline.

In addition, several antioxidants had been shown to increase interleukin IL-2 synthesis in lymphocytes (Meydani, 1991). IL-2, a well-known enhancer of NK cell growth and cytolytic activity (Celada, 1994; Nguyen et al., 1998), increases the production by NK cells of interferon (IFN)- γ and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (Mehrotra et al., 1998). IFN- γ and IL-2 have been proven to increase the NK activity from peritoneal cells in BALB/c mice (Sayers et al., 1990). Moreover, it has been suggested that IFN- γ increases the NK recruitment from blood, whereas IL-2 enhances the lytic activity of NK cells. Our group has observed an increment of IL-2 production in mice after diet

supplementation with NAC + thioproline (unpublished data). On the other hand, it has been proposed that the decrease in NK function with age is, at least in part, attributable to decreased IL-2 levels (Albright and Albright, 1998). Thus, our antioxidants could stimulate NK function in aged mice through IL-2 enhancement.

AA and VE are nutrients that regulate the immune system by their antioxidant properties (Bendich, 1996; Jariwalla and Harakeh, 1996), thereby playing a stimulatory role in the phagocytic function of human neutrophils in vivo (Muggli, 1993; De la Fuente et al., 1998b) and in murine macrophages in vitro (Del Rio et al., 1998), as well as on lymphocyte cells (Jariwalla and Harakeh, 1996; De la Fuente et al., 1998b). In the present work, both antioxidants have shown a stimulant effect in vitro on NK activity. Other vitamin antioxidant compounds such as β -carotene also enhances this cytotoxic activity when supplemented in the human diet (Santos et al., 1998) or administered i.p. to mice (Carlos et al., 1997).

The results obtained in the present work suggest the convenience of diet supplementation with thiolic compounds and antioxidant vitamins in order to prevent the reduced cytotoxic activities found with aging, that may be responsible, at least in part, of the greater incidence of neoplastic diseases.

Acknowledgments

We thank Dr. J. Miquel and Dr. A. Hernanz for their critical review of the manuscript.

References

- Albright, J. W. & Albright, J. F. (1998). Impaired natural killer cell function as a consequence of aging. *Exp Gerontol*, 33, 13–25.
- Atalay, M., Marnila, P., Lilius, E. M., Hänninen, O., & Chandan, K. S. (1996). Glutathione-dependent modulation of exhausting exercise-induced changes in neutrophil function of rats. *Eur J Appl Physiol*, 74, 342–347.
- Bendich, A. (1992). Vitamins and immunity. *J Nutr*, 122, 601–603.
- Bendich, A. (1996). Antioxidants vitamins and human immune responses. *Vitam Horm*, 52, 35–62.
- Bloom, E. T. (1994). Natural killer cells, lymphokine-activated killer cells, and cytotoxic T lymphocytes: compartmentalization of age-related changes in cytotoxic lymphocytes? *J Gerontol Biol Res*, 49, B85–B92.
- Bocchieri, M. H., Sabol, J. L., & O'Neill, D. K. (1988). Age-related decline in cell-mediated immunity in C58 leukemic mouse strain. *Gerontology*, 34, 221–230.
- Carlos, T. F., Riondel, J., Mathieu, J., Guiraud, P., Mestries, J. C., & Favier, A. (1997). Beta-carotene enhances natural killer cell activity in athymic mice. *In Vivo*, 11, 87–91.
- Celada, A. (1994). Citocinas (II). Citocinas que median la inmunidad celular adquirida. Citocinas que median la inmunidad humoral adquirida. Citocinas que regulan la hematopoyesis. In: A. Celada (Ed). *Inmunología Básica*, 447–457. Labor: Barcelona, Spain.
- Coquette, A., Vray, B., & Vanderpas, J. (1986). Role of vitamin E in the protection of the resident macrophage membrane against oxidative damage. *Arch Int Physiol Biochem*, 94, 529–534.
- Decker, T. & Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods*, 115, 61–70.
- De La Fuente, M., Ferrandez, M. D., Muñoz, F., De Juan, E., & Miquel, J. (1993a). Stimulation by the antioxidant thioproline of the lymphocyte functions of old mice. *Mech Ageing Dev*, 68, 27–36.
- De La Fuente, M., Del Rio, M., & Hernanz, A. (1993b). Stimulation of natural killer natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activities in murine leukocytes by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuropeptide C: involvement of cyclic AMP, inositol 1,4,5-trisphosphate and protein kinase C. *J Neuroimmunol*, 48, 143–150.

- De La Fuente, M., Ferrandez, M. D., Del Rio, M., Burgos, M. S., & Miquel, J. (1998a). Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline. *Mech Ageing Dev*, *104*, 213–225.
- De La Fuente, M., Ferrandez, M. D., Burgos, M. S., Soler, A., Prieto, A., & Miquel, J. (1998b). Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. *Can J Physiol Pharmacol*, *76*, 373–380.
- Del Rio, M., & De La Fuente, M. (1995). Stimulation of natural killer (NK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activities in murine leukocytes by bombesin-related peptides requires the presence of adherent cells. *Regul Pept*, *60*, 159–166.
- Del Rio, M., Ruedas, G., Medina, S., Victor, V. M., & De La Fuente, M. (1998). Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Sci*, *63*, 871–881.
- Franceschi, C., Monti, D., Sansoni, P., & Cossariza, A. (1995). The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today*, *16*, 12–16.
- Furakawa, T., Meydani, S. N., & Blumberg, J. B. (1990). The potential benefits of dietary glutathione on immune function and other practical implications. In: J. Viña (Ed.). *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions* (pp. 351–366). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Globerson, A. (1995). T lymphocytes and aging. *Int Arch Allergy Immunol*, *107*, 491–497.
- Hirokawa, K., Utsuyama, M., Zeng, Y.-X., Kurashima, C., & Kasai, M. (1994). Immunological alterations with ageing-laying stress on recent progress in Japan. *Arch Gerontol Geriatr*, *19*, 171–183.
- Jariwalla, R. J. & Harakeh, S. (1996). Antiviral and immunomodulatory activities of ascorbic acid. *Subcellular Biochemistry* 25. In: R. J. Harris (Ed.). *Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology* (pp. 215–231). New York: Plenum Press.
- Krishnaraj, R. & Blandford, G. (1988). Age-associated alterations in human natural killer cells 2. Increased frequency of selective natural killer subsets. *Cell Immunol*, *114*, 137–148.
- Kutza, J., Kaye, D., & Murasko, D. M. (1995). Basal natural killer cell activity of young versus elderly humans. *J Gerontol Biol Sci*, *50A*, B110–B116.
- Ligthart, G. J., Schuit, H. R., & Hijmans, W. (1989). Natural killer cell function is not diminished in the healthy aged and its proportional to the number of NK cells in the peripheral blood. *Immunology*, *68*, 396–402.
- Mariani, E., Sgobbi, S., & Meneghetti, A. (1996). Perforins in human cytolytic cells: the effect of age. *Mech Ageing Dev*, *92*, 195–209.
- Mehrotra, P. T., Donnelly, R. P., Wong, S., Kanegane, H., Geremew, A., Mostowski, H. S., Furuke, K., Siegel, J. P., & Bloom, E. T. (1998). Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J Immunol*, *160*, 2637–2644.
- Meydani, S. N. (1991). Dietary modulation of the immune response in the aged. *Age*, *14*, 108–115.
- Meydani, S. N., Wu, D., Santos, M. S., & Hayek, M. (1995). Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am J Clin Nutr*, *62*, 1462S–1476S.
- Miller, R. A. (1996). The aging immune system: primer and prospectus. *Science*, *272*, 70–74.
- Miquel, J. & Weber, H. U. (1990). Aging and increased oxidation of the sulfur pool. In: J. Viña (Ed.). *Glutathione Metabolism and Physiological Functions* (pp. 187–192). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Muggli, R. (1993). Vitamin C and phagocytes. In: S. Cunningham-Rundles (Ed.). *Nutrient Modulation of the Immune Response* (pp. 75–90). New York: Marcel Dekker.
- Mysliwska, J., Bryl, E., Bigda, J., Chodnik, T., Foerster, J., & Mysliwski, A. (1992). Level of NK cytotoxic activity in the elderly aged more than 80 years. *Arch Gerontol Geriatr*, *15*, 21–28.
- Nguyen, Q. H., Roberts, R. L., Ank, B. J., Lin, S. J., Lau, C. K., & Stiehm, E. R. (1998). Enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity of neonatal cells by interleukin-2 (IL-2) and IL-12. *Clin Diagn Lab Immunol*, *5*, 98–104.
- Oeriu, S. & Vochitu, E. (1965). The effect of administration of compounds which contain SH groups on the survival rate of mice, rats and guinea pigs. *J Gerontol*, *20*, 417–419.
- O'Shea, S. R. & Ortaldo, F. (1992). The biology of natural killer cells insights into the molecular basis of function. In: C.E. Lewis & J.O.D. McGee (Eds.). *The Natural Killer Cell*. Oxford: IRL Press.
- Pawelec, G. (1995). Molecular and cell biological studies of ageing and their application to considerations of T lymphocyte immunosenescence. *Mech Ageing Dev*, *79*, 1–32.
- Pawelec, G., Adibzadeh, M., Solana, R., & Beckman, I. (1997). The T cell in the aging individual. *Mech Ageing Dev*, *93*, 35–45.
- Pieri, C., Moroni, F., & Recchioni, R. (1992). Glutathione influences the proliferation as well as the extent of mitochondrial activation in rat splenocytes. *Cell Immunol*, *145*, 210–217.
- Pross, H. J. & Baines, M. G. (1982). Studies of natural killer cells I. In vivo parameters affecting normal cytotoxic function. *Int J Cancer*, *29*, 383–390.

- Riccardi, C., Giampietri, A., Migliorati, G., Frati, L., & Herberman, R. B. (1986). Studies on the mechanisms of low natural killer cell activity in infant and aged mice. *Nat Immun Cell Growth Regul*, 5, 238–249.
- Rivabene, R., Viora, M., Matarrese, P., Rainaldi, G., D'Ambrosio, A., & Malorni, W. (1995). N-acetyl-cysteine enhances cell adhesion properties of epithelial and lymphoid cells. *Cell Biol Int*, 19, 681–686.
- Saez, G. T., Bannister, W. H., & Bannister, J. V. (1990). Free radicals and thiol compounds—the role of glutathione against free radical toxicity. In: J. Viña (Ed.). *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions* (pp. 237–254). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Santos, M. S., Gaziano, J. M., Leka, L. S., Beharka, A. A., Hennekens, C. H., & Meydani, S. N. (1998). Beta-carotene-induced enhancement of natural killer cell activity in elderly men: an investigation role of cytokines. *Am J Clin Nutr*, 68, 164–170.
- Sayers, T. J., Mason L. H., & Wiltout, T. A. (1990). Trafficking and activation of murine natural killer cells: differing roles for IFN- γ and IL-2. *Cell Immunol*, 127, 311–326.
- Scaringi, L., Cornacchione, P., Rosati, E., Boccanera, M., Cassone, A., Bistone, F., & Marconi, P. (1990). Induction of LAK-like cells in the peritoneal cavity of mice by inactivated *Candida albicans*. *Cell Immunol*, 129, 271–287.
- Sohal, R. S. & Allen, R. G. (1986). Relationship between oxygen metabolism, aging and development. *Adv Free Rad Biol Med*, 2, 117–160.
- Solana, R., Villanueva, J. L., Peña, J., De La Fuente, M. (1991). Cell mediated immunity in ageing. *Comp Biochem Physiol*, 99A, 1–4.
- Solana, R. & Pawelec, G. (1998). Molecular and cellular basis of immunosenescence. *Mech Ageing Dev*, 102, 115–129.
- Trincheri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*, 47, 201–376.
- Urban, T., Akerlund, B., Jastrand, C., & Lindeke, B. (1997). Neutrophil function and glutathione-peroxidase activity in healthy individuals after treatment with N-acetylcysteine. *Biomed Pharmacother*, 51, 388–390.
- Weber, H. U. & Miquel, J. (1986). Antioxidant supplementation and longevity. In: L.H. Chen (Ed.). *Nutritional Aspects of Aging* (p. 42). Boca Raton, FL: CRC Press.

Short communication

Changes in macrophage and lymphocyte functions in guinea-pigs after different amounts of vitamin E ingestion

M. De la Fuente*, M. Carazo, R. Correa and M. Del Río

Department of Animal Physiology, Faculty of Biological Science, Complutense University of Madrid, Spain

(Received 22 April 1999 – Revised 11 November 1999 – Accepted 9 December 1999)

Vitamin E is the main biological lipid-soluble antioxidant and plays a crucial role in the maintenance of the immune system. In the present work, twenty-one guinea-pigs (3-weeks-old) were distributed into three groups, which during 5 weeks ingested different amounts of vitamin E (/kg diet): 15 mg (low vitamin E diet), 150 mg (medium vitamin E diet; control) or 1500 mg (high vitamin E diet). The function of lymphocytes and macrophages were then studied. In macrophages obtained from the peritoneum several steps of the phagocytic process (chemotaxis, ingestion and superoxide anion production) were assayed, as well as chemotaxis and proliferation of peritoneal and spleen lymphocytes. The results indicate that with respect to the medium vitamin E diet, low ingestion of vitamin E causes a decrease in chemotaxis and production of superoxide anion by macrophages and an increase in the phagocytic capacity. With the high vitamin E diet an increase in macrophage and lymphocyte chemotaxis, superoxide anion production and lymphoproliferative capacity, as well as a decrease in phagocytosis, were observed. Therefore, diet supplementation with higher than usual levels of vitamin E appears to be beneficial for the immune system.

Vitamin E: Leucocytes: Immune response: Guinea-pigs

Vitamin E is the most important lipid-soluble antioxidant present in body tissues and is considered the first line of defence against lipid peroxidation because of its quenching activity that protects cell membranes from free radical injury (Sies & Murphy, 1991). Determination of vitamin E requirements is controversial because high vitamin E levels may be necessary to prevent peroxidative damage. The current recommended dietary allowance for vitamin E in the USA is 10 mg/d, which falls into the range of acceptable intakes according to the COMA report (3.5–19.5 mg/d). However, although this vitamin E intake prevents the clinical deficiency syndrome, it fails to maintain optimal host defence especially in older subjects or in disease states (Beharka *et al.* 1997). Recent research provides evidence that a vitamin E intake much higher than the current recommendations can contribute to improved human health (Meydani *et al.* 1997; Weber *et al.* 1997). Results of several studies suggest that increased vitamin E intake is associated with a decreased risk of certain types of cancer (D'Avanzo *et al.* 1997; Peng *et al.* 1998) and CHD (Kushi *et al.* 1996). In fact, this antioxidant is involved in atherogenesis, inhibiting the proliferation of vascular smooth muscle cells (Azzi

et al. 1995) and reducing the susceptibility of LDL to oxidation (Simons *et al.* 1996). Moreover, on the basis of recent data it can be assured that vitamin E is safe and well tolerated at much higher than the recommended daily intakes and over long periods of time (Weber *et al.* 1997).

The important role of α -tocopherol in the defence against oxidative damage is especially relevant in leucocytes, because immune function and particularly phagocytic function is linked to the release of O_2 radicals that participate in the microbicidal activity of macrophages. Thus, the immune system has been shown to be more sensitive than other systems to antioxidant deficiencies in the diet (Meydani, 1998). Several authors have suggested that impaired host defence can act as a very early and sensitive marker of marginal deficiency of antioxidant micronutrients and thus, assessment of immune functions could serve as an important preventive diagnostic tool in the detection of marginal but functionally relevant micronutrient deficiencies (Schmidt, 1997).

Although it is known that the immune response is impaired when antioxidant vitamins are not present in the diet (Bendich, 1989), few reports deal with vitamin E effects

* Corresponding author: Professor M. De la Fuente, fax +341 394 4935, email mondelaf@eucmax.sim.ucm.es

on immune function. Stimulation of the lymphoproliferative response (Sakai & Moriguchi, 1997) and increased phagocytic activity (Moriguchi *et al.* 1990) have been shown. More recently, an inhibition of macrophage migration inhibitory factor was reported (Sakamoto *et al.* 1998). Our group has also carried out recent work on the effect of vitamin E on functions of murine leucocytes *in vitro* (Del Río *et al.* 1998) and on the immune response in a group of elderly women to whom a supplemented diet was administered (De la Fuente *et al.* 1998).

Considering the increasing interest on the beneficial effects of vitamin E intake, especially on the immune response, the aim of the present work was to study several immune functions in an animal model, namely guinea-pigs that were fed on diets containing three different amounts of vitamin E.

Animals and methods

Animals and diets

Dunkin-Hartley male guinea-pigs of 3 weeks of age were obtained from Iffa-Credo (Lyon, France). The animals were randomly divided into three experimental groups, each containing seven individuals, which received three diets differing in the vitamin E content for 5 weeks, i.e. low diet (15 mg vitamin E/kg basal diet), medium diet (150 mg vitamin E/kg basal diet) and high diet (1500 mg vitamin E/kg basal diet). The same basal diet (U.A.R., Perpignan, France) was administered to the three groups, which contained (g/kg): protein 185, fat 29, carbohydrate 469, mineral mix 84, vitamin mix 14, moisture 11, non-nutritive bulk 109. The content of minerals and vitamins was (/kg diet): P 8.6 g, Ca 10.6 g, K 12.0 g, Na 3.45 g, Mg 3.13 g, Mn 100 mg, Fe 320 mg, Cu 26 mg, Zn 85 mg, Co 1.61 mg, vitamin A 19 000 IU, vitamin D₃ 2031 IU, thiamine 22.5 mg, riboflavin 21 mg, pantothenic acid 1243 mg, pyridoxine 10.7 mg, menadione 55 mg, niacin 193 mg, folic acid 7.3 mg, biotin 0.275 mg, choline 1.74 g, myoinositol 250 mg, vitamin B₁₂ 0.054 mg, *p*-aminobenzoic acid 10 mg, vitamin C 660 mg. Guinea-pigs were housed in air-positive pressure animal cabinets (A 130 SP, Flufrance, Cachan, France) with an HEPA air-filter at the inlet (99.999 % for particles > 0.03 µm at the inlet).

Collection of leucocyte suspensions

The animals were killed by decapitation according to the guidelines of the European Community Council Directives 86/6091 EEC. Peritoneal suspensions were obtained from each animal following a method previously described (Ortega *et al.* 1992). Briefly, after intraperitoneal injection of 10 ml Hank's medium (Gibco Canada Ltd., Burlington, Ontario, Canada), the abdomen was massaged and peritoneal resident cells, containing macrophages and lymphocytes, were removed, allowing the recovery of 90–95 % of the injected volume. The macrophages, identified by morphology and non-specific esterase staining, and the lymphocytes were counted in Neubauer chambers and their concentrations were adjusted in the same medium at 5×10^5 cells/ml. The spleen was removed aseptically, freed of fat, minced with scissors and gently pressed through a mesh screen (Sigma,

St. Louis, MO, USA). The cell suspension was centrifuged in a gradient of Ficoll-Hypaque (Sigma) with a density of 1.070 g/ml. The material in the interface was resuspended in RPMI 1640 enriched with L-glutamine (Gibco Canada Ltd.) and supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum (Gibco Canada Ltd.) and gentamicin (100 µg/ml, Gibco Canada Ltd.), washed and the number of lymphocytes adjusted to 1×10^6 cells/ml. Cellular viability was routinely measured before and after each experiment by the Trypan-Blue exclusion test and was higher than 95 % in all experiments.

Chemotaxis, phagocytosis and superoxide production assays

These assays were carried out following methods previously described (De la Fuente *et al.* 1991). Chemotaxis was evaluated using chambers with two compartments separated by a filter (Millipore, Mildford, MA, USA) of 3 µm pore diameter. Aliquots of 300 µl of the peritoneal suspension were deposited in the upper compartment, and aliquots of 400 µl of the chemoattractant fMet-Leu-Phe (Sigma) at a concentration of 10^{-8} M in the lower compartment. The chambers were incubated for 3 h, the filters fixed and stained and the number of macrophages and lymphocytes in the lower face of the filter were counted and recorded as the chemotaxis index.

Phagocytosis of inert particles (latex beads (1.09 µm) diluted to 1 % in PBS) was carried out incubating aliquots of 200 µl of the peritoneal suspension in migratory inhibitory factor plates (Sterilin, Teddington, London, UK) for 30 min. The adhered monolayer was washed with PBS at 37°C, and 200 µl Hank's medium and latex (20 µl) were added. After 30 min of incubation, the plates were washed with PBS, fixed and stained, and the number of latex beads ingested per 100 macrophages were counted and recorded as phagocytosis index.

Superoxide production was determined by the Nitroblue Tetrazolium (Sigma) reduction test, based on an equimolecular reaction between Nitroblue Tetrazolium and superoxide anion (Bagasra *et al.* 1988). Aliquots of 250 µl of peritoneal suspension were mixed with 250 µl of Nitroblue Tetrazolium solution (1 mg/ml) and 50 µl latex beads were added to one sample set (stimulated samples) and 50 µl Hank's medium to the other set (non-stimulated samples). After 60 min of incubation in a bath at 37°C, the reaction was stopped, and following centrifugation, the supernatants were discarded and the reduced Nitroblue Tetrazolium was extracted with dioxan. The absorbance of supernatants was determined in a spectrophotometer at 525 nm.

Lymphocyte proliferative response assay

Proliferation of lymphocytes, spontaneous and induced by phytohaemagglutinin as mitogen, was determined in 72 h cultures. Aliquots of 200 µl of spleen lymphocyte suspension were seeded in ninety-six well flat-bottomed microtiter plates (Costar, Cambridge, MA, USA), and incubated in the absence or in the presence of phytohaemagglutinin (25 µg/ml) for 48 h at 37°C in an atmosphere of 5 % CO₂. To measure proliferation a BrdU labelling and detection

commercial kit (Roche Diagnostics, Basilea, Switzerland) was used. Briefly, it consisted of the addition to the culture medium of BrdU that is incorporated into freshly synthesized DNA. Following fixation of cells, cellular DNA is partially digested by nuclease treatment. A peroxidase-labelled antibody to BrdU is then added. At the final step, the peroxidase substrate is added, yielding a coloured reaction product as a result of peroxidase enzyme activity. The absorbance of the sample (measured at 405 nm) is directly correlated with the level of BrdU incorporated into cellular DNA.

Statistical analysis

The data are expressed as the mean and standard deviation of the values from seven animals, each value being the mean of duplicate assays. In the statistical study, the normality of the samples was confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test and the homogeneity of variances by the Levene test. When the variances were homogeneous, the one-way ANOVA and Scheffe F test were used for the comparison of parametric samples. Conversely, when the variances were not homogeneous, the one-way ANOVA and Tamhane test were used.

Results

The results are shown in Table 1. Chemotaxis of peritoneal macrophages shows a significant increase with the diet high in vitamin E in comparison with the medium ($P < 0.01$) and low ($P < 0.001$) diets, and also a significant ($P < 0.01$) decrease with the low diet as compared with the medium one. With respect to the effects observed in lymphocytes, animals fed on the high vitamin E diet showed higher chemotaxis indexes ($P < 0.05$) than those fed on the low vitamin E diet. Phagocytosis of latex beads was significantly ($P < 0.001$) stimulated with the low vitamin E diet with respect to the others, while no significant difference was observed between the medium and high diets. The production of superoxide anion was significantly ($P < 0.001$)

reduced in guinea-pigs fed on the low vitamin E diet with respect to the others. Again no significant difference was observed between the medium and high diets.

A statistically significant increase was found in spontaneous lymphoproliferation with the high vitamin E diet with respect to the medium ($P < 0.01$) and low ($P < 0.001$) diets. The proliferation in response to the mitogen phytohaemagglutinin showed the same pattern with significant differences found for the high vitamin E diet with respect to the control ($P < 0.001$) and low ($P < 0.01$) diets.

Discussion

The effects of three different amounts of vitamin E in the diet of guinea-pigs have been studied. Animals in the low-vitamin-E-diet group ingested 0.6–0.75 mg/d, a dose very close to the minimum daily requirement for long-term maintenance of the growing guinea-pig, i.e. 1 mg/d (National Research Council, 1978). Animals in the medium-diet group ingested vitamin E in the normal range used for routine maintenance of guinea-pigs, 6-fold higher than the minimum daily requirement. Finally, the high-diet group was designed to clarify the effects of supplementing the diet with amounts of vitamin E 65-fold higher than the minimum daily requirement.

In the present work, an increase in the migration capacity of macrophages, which is an early step of the phagocytic process, was found with the high vitamin E diet. Recently it has been reported that vitamin E inhibits the secretion of macrophage migration inhibitory factor (Sakamoto *et al.* 1998), which provides a possible explanation for our results. The decreased chemotaxis of macrophages found in the guinea-pigs fed on the low vitamin E diet could indicate an oxidative state in these animals. Peritoneal macrophages from mice with oxidative stress caused by endotoxin have shown a decreased chemotaxis capacity (VÍctor *et al.* 1998), which seems to be due to a high production of migration inhibitory factor (Calandra & Bucala, 1997).

The phagocytic activity of macrophages was increased

Table 1. Effect of different vitamin E contents in the diet on variables of macrophages and lymphocytes function in guinea-pigs (Mean values and standard deviations for duplicate determination for seven guinea-pigs per group)

	Dietary vitamin E					
	Low (15 mg/kg diet)		Medium (150 mg/kg diet)		High (1500 mg/kg diet)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Macrophage functions						
Chemotaxis index‡	108**	16	151	18	205**†††	23
Phagocytosis index§	827***	58	407	59	325†††	36
Non-stimulated O ₂ ⁻ production (A ₅₂₅)	0.017***	0.003	0.043	0.007	0.045†††	0.01
Stimulated O ₂ ⁻ production (A ₅₂₅)	0.028***	0.007	0.066	0.007	0.064†††	0.011
Lymphocyte functions						
Chemotaxis	50	6	59	8	62†	6
Spontaneous proliferation (A ₄₀₅)	0.172	0.008	0.179	0.028	0.231**†††	0.049
Proliferative response to mitogen (A ₄₀₅)	0.235	0.022	0.211	0.014	0.286***††	0.032

A, absorbance measured at the wavelength (nm) shown as subscript.

Mean values were significantly different from those of the medium vitamin E diet group (control): ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Mean values were significantly different from those of low vitamin E diet group: † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, ††† $P < 0.001$.

‡ The chemotaxis index was the number of cells in the lower face of the filter. For details of procedures, see p. 26.

§ The phagocytosis index was the number of latex beads ingested per 100 macrophages. For details of procedures, see p. 26.

for the cells from guinea-pigs that ingested the low vitamin E diet, a fact seen also by other authors in alveolar macrophages of rats (Moriguchi *et al.* 1990). Thus, these phagocytic cells exhibit in vitamin E deficient guinea-pigs a behaviour similar to that seen in mice with oxidative stress by endotoxic shock (V́ctor *et al.* 1998) or ageing (McArthur *et al.* 1998). With the diet high in vitamin E, a lower index of phagocytosis was obtained without significant differences between the medium and high vitamin E diets, which is in agreement with other authors (Hogan *et al.* 1992). Again, as in phagocytosis, we observed the same levels of superoxide anion production with the medium and high vitamin E diets, significantly higher than the corresponding values with low vitamin E doses. This supports the idea that the observed increment in phagocytosis found in response to the low vitamin E diet is not favourable from an immunological viewpoint since it does not result in an increase in microbicidal capacity.

The lymphoproliferative response is one of the most widely studied functions of lymphocytes. There are several reports on the effect of vitamin E supplementation on this pivotal immune activity, most of them showing a positive role of this antioxidant (Sakai & Moriguchi, 1997; McArthur, 1998). Accordingly, we also found an increased proliferation in response to phytohaemagglutinin mitogen in the animals that received the high dose of vitamin E. This action might be explained by a vitamin E induced decrement of prostaglandin E₂ production, which has been correlated with an increase in interleukin 2 production and concomitant raised proliferation (Beharka *et al.* 1997).

In conclusion, recent data support the idea that high ingestion of vitamin E is safe (Weber *et al.* 1997). In addition, our results indicate that a greater than recommended intake of vitamin E in the diet improves the immune response of adult guinea-pigs. Therefore, supplementation of the diet with higher amounts of this vitamin should be considered in order to improve human health.

Acknowledgements

We thank S. Burgos, B. De la Cuadra and M. D. Ferrández for their technical assistance. We also thank Dr A. Hernanz and Dr J. Miquel for their critical reading of the manuscript. This work was supported by a Grant from FISs (no. 97/2078).

References

- Azzi A, Boscoboinik D, Marilley D, Ozer NK, Stauble E & Tasinato A (1995) Vascular smooth muscle cell proliferation is controlled by α -tocopherol at the level of protein kinase C and of the transcriptional factors AP1. In *Oxidative Stress and Ageing* [R Cutler, L Packer, J Bertram and A Mori, editors]. Basel and Boston, MA; Birkhauser.
- Bagasra O, Howedy A & Kajdacsy-balla A (1988) Macrophage function in chronic experimental alcoholism. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunology* **65**, 405–409.
- Beharka AA, Wu DY, Han SN & Meydani SN (1997) Macrophage prostaglandin production contributes to the age-associated decrease in T cell function which is reversed by the dietary antioxidant vitamin E. *Mechanisms of Ageing and Development* **93**, 56–77.
- Bendich A (1989) Interaction between antioxidant vitamins C and E and their effect on immune responses. In *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine II*, pp. 153–160 [J Miquel, AT Quintanilla and H Weber, editors]. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Calandra T & Bucala R (1997) Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Critical Reviews of Immunology* **17**, 77–88.
- D'Avanzo B, Ron E, La Vecchia C, Franceschi S, Negri E & Ziegler R (1997) Selected micronutrient intake and thyroid carcinoma risk. *Cancer* **79**, 2186–2192.
- De la Fuente M, Del Río M, Ferrandez MD & Hernanz A (1991) Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology* **73**, 205–211.
- De la Fuente M, Ferrandez MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A & Miquel J (1998) Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamin C and E. *Canadian Journal of Pharmacology* **76**, 373–380.
- Del Río M, Ruedas G, Medina S, Víctor VM & De la Fuente M (1998) Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Science* **63**, 871–881.
- Hogan JS, Weiss WP, Todhunter DA, Smith KL & Schoenberger PS (1992) Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. *Journal of Dairy Science* **75**, 399–405.
- Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y & Bostick RM (1996) Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine* **334**, 1156–1162.
- McArthur WP (1998) Effect of aging on immunocompetent and inflammatory cells. *Periodontology 2000* **16**, 53–79.
- Meydani M, Lipman RD, Han SN, Wu D, Beharka A, Martin KR, Bronson R, Cao G, Smith D & Meydani SN (1998) The effect of long-term dietary supplementation with antioxidants. *Annals of the New York Academy of Science* **854**, 352–360.
- Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS, Siber G, Loszewski R, Thompson C, Pedrosa MC, Diamond RD & Stollar BD (1997) Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* **277**, 1380–1386.
- Moriguchi S, Kobayashi N & Kishino Y (1990) High dietary intakes of vitamin E and cellular immune functions in rats. *Journal of Nutrition* **120**, 1096–1102.
- National Research Council (1978) Nutrient requirements of laboratory animals. Washington, DC: National Academy Press.
- Ortega E, Collazos ME, Barriga C & De la Fuente M (1992) Stimulation of the phagocytic function in guinea pig peritoneal macrophages by physical activity stress. *European Journal of Applied Physiology* **64**, 323–327.
- Peng YM, Peng YS, Childers JM, Hatch KD, Roe DJ, Lin Y & Lin P (1998) Concentrations of carotenoids, tocopherols and retinol in paired plasma and cervical tissues of patients with cervical cancer, precancer and noncancerous disease. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* **7**, 347–350.
- Sakai S & Moriguchi S (1997) Long-term feeding of high vitamin E diet improves the decreased mitogen response of rat splenic lymphocytes with aging. *Journal of Nutritional Sciences Vitaminology* **43**, 113–122.
- Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Handa H, Ozaki M & Yukawa S (1998) Inhibition of macrophage migration inhibitory factor secretion from macrophages by vitamin E. *Biochimica et Biophysica Acta* **1404**, 427–434.
- Schmidt K (1997) Interaction of antioxidative micronutrients with host defense mechanisms. A critical review. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research* **67**, 307–311.

- Sies H & Murphy ME (1991) Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **8**, 211–224.
- Simons LA, Von Konigsmark M & Balasubramaniam S (1996) What dose of vitamin E is required to reduce susceptibility of LDL to oxidation? *Australian and New Zealand Journal of Medicine* **26**, 496–503.
- Víctor VM, Miñano M, Guayerbas N, Del Río M, Medina S & De la Fuente M (1998) Effects of endotoxic shock in several functions of murine peritoneal macrophages. *Molecular and Cellular Biology* **189**, 25–31.
- Weber P, Bendich A & Machlin LJ (1997) Vitamin E and human health: rationale for determining recommended intake levels. *Nutrition* **13**, 450–460.



Original report

Changes in several functions of murine peritoneal macrophages by N-acetylcysteine and thioproline ingestion. Comparative effect between two strains of mice

B. Blanco^a, M.D. Ferrández^a, R. Correa^a, M. Del Rio^a, C. Guaza^b, A. Hernanz^c and M. De la Fuente^{a,*}

^a *Department of Animal Physiology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain*

^b *Cajal Institute, CSIC, Madrid, Spain*

^c *Biochemistry Service, Hospital La Paz, Madrid, Spain*

Received 3 July 1998

Revised 8 October 1998

Accepted 12 October 1998

Abstract. The administration of the thiol compounds, N-acetylcysteine (NAC) and in particular thioproline (thiazolidine-4-carboxylic acid) at 0.1% w/w concentration in the diet, improves lymphocyte functions in old female Swiss mice, as has been shown in our previous studies. In the present work, adult mice from two different strains, namely BALB/c (an inbred strain) and OF1-Swiss (noninbred strain), were fed a diet supplemented with the above dose of each thiol compound jointly for five weeks. At 28 weeks of age, peritoneal cell suspensions were obtained and different steps of the phagocytic process, the most representative activity of macrophages, as well as interleukin-1 β (IL-1 β) production, were studied. Thus, adherence to substrate, mobility directed to a chemoattractant gradient (chemotaxis), ingestion of inert particles and superoxide anion production were analysed. The results show that diet supplementation with NAC plus thioproline increased all macrophage functions studied with the exception of superoxide anion production, which was decreased. These effects were more evident in macrophages from Swiss mice, whereas in BALB/c mice the stimulation of phagocytosis and IL-1 β production was lower and no differences were seen after treatment in adherence and superoxide anion production. These data suggest that immune function can be improved in adult mice by administration of the above thiol compounds, especially in the noninbred strain of OF1-Swiss mice.

Keywords: Thioproline, N-acetylcysteine, macrophages, phagocytic function, interleukin-1 β

1. Introduction

The production of oxygen radicals by immune cells, specially by phagocytes, is necessary to carry out their functions, and it is one example of the useful role of reactive oxygen species. However, they can become a source of tissue damage if their production is not localised or lasts too long, resulting

* Address correspondence to: Mónica De la Fuente, Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

in oxidative stress. For this reason, the organism, and specially the immunocompetent cells, must have available antioxidant defences to maintain the oxidant-antioxidant balance. Moreover, phagocytes, such as macrophages, use antioxidant molecules in their functions [10]. Therefore, therapeutic action aimed at increasing antioxidant defence mechanisms is still a clinical challenge.

Reduced glutathione (GSH) is essential for many biological processes because of the reducing power due to the sulfhydryl group of cysteine and, as pointed out by Saez et al. [15], "it is considered, in fact, one of the most important and efficient antioxidative defence mechanism occurring in living cells". As further summarized by Saez et al., GSH contributes to the reduction of hydrogen peroxide and lipid peroxides catalyzed by GSH peroxidase, thus serving as an inhibitor of peroxidation-induced damage, and it may play a key role in controlling excessive free-radical production during oxidative stress.

In agreement with the above, not only GSH [14] but also two thiol compounds, which act as glutathione precursors in cells, i.e.: thiazolidine-4-carboxylic acid (thioprolin) and N-acetylcysteine (NAC) [2], exert a favourable effect on immune cells, the functions of which depend to a large degree on redox reactions of thiol compounds [11]. Thus, GSH has been shown to increase lymphoproliferation in response to mitogens [14] as well as mobilization of neutrophils [1], and we have observed a stimulation of murine lymphocyte proliferation and migration after ingestion of a diet supplemented with thioproline for 36 weeks [4]. Even a short-term ingestion of this compound (5 weeks) by old mice showed a stimulant effect on proliferation and mobility of lymphocytes, as well as on cytotoxic activities such as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and natural killer (NK) activity [5]. In a recent study, Urban et al. [16] have shown that ingestion of NAC (600 mg daily) by healthy individuals for a period of two weeks optimizes phagocytosis of neutrophils. We have also observed that thioproline, NAC and GSH increase, *in vitro*, several functions of murine peritoneal macrophages [7].

The aim of the present work was, on the one hand, to study in adult mice the effect of a diet supplemented with both NAC and thioproline for five weeks on several functions of a fundamental immune cell, the macrophage. On the other hand, since there are differences between inbred strains of laboratory rodents in parameters such as life span and neuroendocrine response to stressful stimuli [9], and it has been proposed that several strains should be compared for valid extrapolation of data obtained in inbreeding strain to normal heterogeneous populations such as humans [13], the present study has been carried out on two strains of mice, BALB/c (an inbred strain with a mean life span of 16.2 months) and OF1-Swiss mice (a noninbred strain with an 18 month mean life span).

2. Experimental procedure

Female BALB/c and OF1 Swiss mice (Iffa-Credo, France) 20 week old were maintained at a constant temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ on a 12 hour light/dark reversed cycle and fed Sander Mus pellets (Panlab L.S. Barcelona, Spain) and water *ad libitum*. At 23 weeks of age, animals of each strain were divided into control and treated groups, with 12 animals in each group. The treated groups received a diet supplemented with 0.1% w/w of both thioproline and N-acetylcysteine (NAC) during five weeks.

At 28 weeks old mice were sacrificed by cervical dislocation according to the guidelines of the European Community Council Directives 86/6091 EEC, and peritoneal suspensions were obtained following the method previously described by De la Fuente et al. [3]. The peritoneal resident cells, containing 40% macrophages and 60% lymphocytes, were removed and the macrophages, identified by morphological and non-specific esterase staining, were counted and adjusted at 5×10^5 cells/ml of Hank's medium.

The assay of phagocytic function (adherence, chemotaxis, phagocytosis and superoxide anion production) was carried out following methods previously described [6]. Briefly, for the adherence capacity

assay, aliquots of peritoneal macrophage suspensions were placed in eppendorf tubes and incubated for 10, 20, 30 and 60 min at 37°C. The adherence index (A.I.) was calculated according to the following equation: $AI = (1 - (\text{macrophages per ml supernatant} / \text{macrophages per ml original sample})) \times 100$. For the chemotaxis assay, aliquots of macrophage suspensions were deposited in the upper compartment of Boyden's chambers and a chemoattractant (f-Met-Leu-Phe, 10^{-8} M, Sigma) in the lower compartment separated by a filter of 3 μm pore (Millipore). After 3 hours of incubation, the filter was stained and the number of macrophages in its lower face was counted (chemotaxis index: C.I.). Phagocytosis of inert particles was carried out incubating aliquots of peritoneal suspension in plates for 30 min with latex beads (1.09 μm , Sigma), and after this time the cells were stained and the number of particles ingested by 100 macrophages was counted and expressed as phagocytosis index (P.I). The percentage of macrophages that phagocytosed was also determined and expressed as phagocytosis efficiency index (P.E.I.). The superoxide anion production by macrophages was evaluated by the capacity of this anion to reduce nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma) forming a formazan measured spectrophotometrically at 525 nm. The macrophage suspensions were incubated for 60 min in the presence of NBT and latex beads (stimulated samples) or in the absence of latex beads (nonstimulated samples). Both, intracellular and extracellular superoxide anion production were evaluated and expressed as $\text{nmol}/10^6$ cells.

For determination of interleukin-1 β (IL-1 β) levels in the supernatants of macrophage cultures, peritoneal suspension samples were incubated on plates during 1 hour, and after this time lipopolysaccharide (LPS, *E. coli*, 055:B5, Sigma, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to the macrophage monolayer. After 24 hours of incubation the supernatants were collected and the concentration of IL-1 β was measured using an ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) and the results expressed as pg/ml .

The data are expressed as the mean \pm SD of the values obtained from 12 experiments and evaluated statistically by the Student's *t*-test, $p < 0.05$ being the minimum significant level. The normality of the samples was confirmed by the Kolmogorov–Smirnov test.

3. Results and discussion

The results of the present study show that the ingestion of a supplemented diet with both thioproline and NAC (0.1% w/w) for five weeks in two strains of mice increases several macrophage functions and decreases superoxide anion production.

Adherence and chemotaxis are the first steps in the immune response [8]. An increase of adherence is positive if it is followed by increased chemotaxis. Thioproline and NAC ingestion causes an activation of macrophages, since it stimulates adherence ($p < 0.001$) in Swiss mice (although the treatment does not affect it in BALB/c mice) (Fig. 1), and increases significantly ($p < 0.001$) the chemotaxis in both strains (Fig. 2). The absence of effect on adherence of macrophages from BALB/c mice could be due to the high values of this capacity found in control animals from this strain, an adherence significantly ($p < 0.001$) higher than that from Swiss control animals. Moreover, a recent study *in vitro* with macrophages from BALB/c mice showed that neither NAC nor thioproline had any effect on the adherence capacity of these cells, but both NAC and thioproline increased chemotaxis [7]. Thus, the effects observed after treatment in these two activities of macrophages seem to be due to a direct action of the two thiol compounds on immune cells. In addition, it has also been shown that thioproline ingestion increases the chemotaxis of lymphocytes from old Swiss mice [4].

A proper chemotaxis capacity, which allows phagocytes to reach the inflammation sites, is essential for ensuring phagocytosis of foreign or damaged material. The ingestion of the two compounds seems to

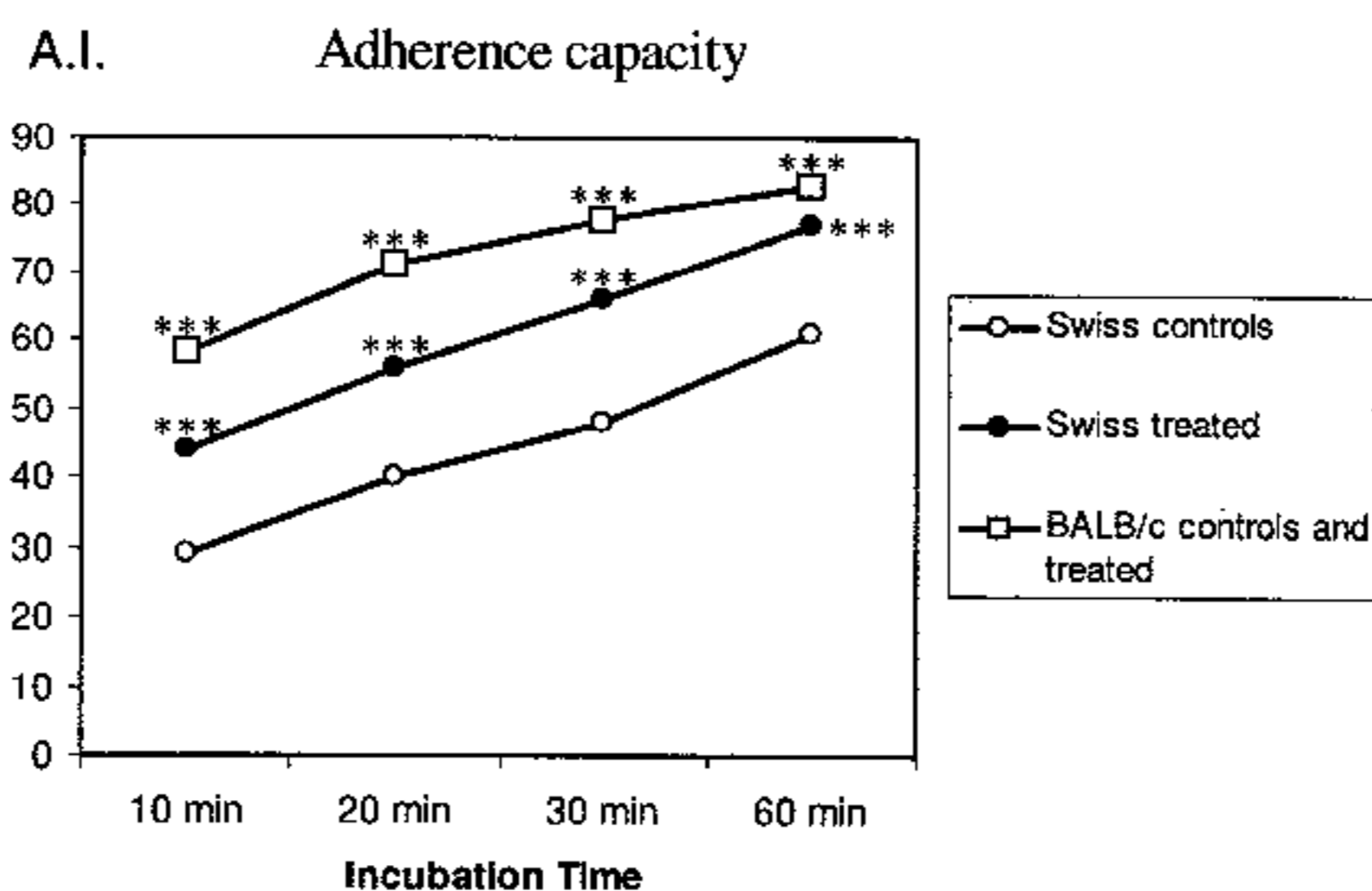


Fig. 1. Adherence index (A.I.) of peritoneal macrophages from adult Swiss and BALB/c mice at 10, 20, 30, and 60 min of incubation. Each data represent the mean \pm SD of 12 experiments, corresponding to control and thiol treated groups. *** $p < 0.001$ with respect to the values of the Swiss control group.

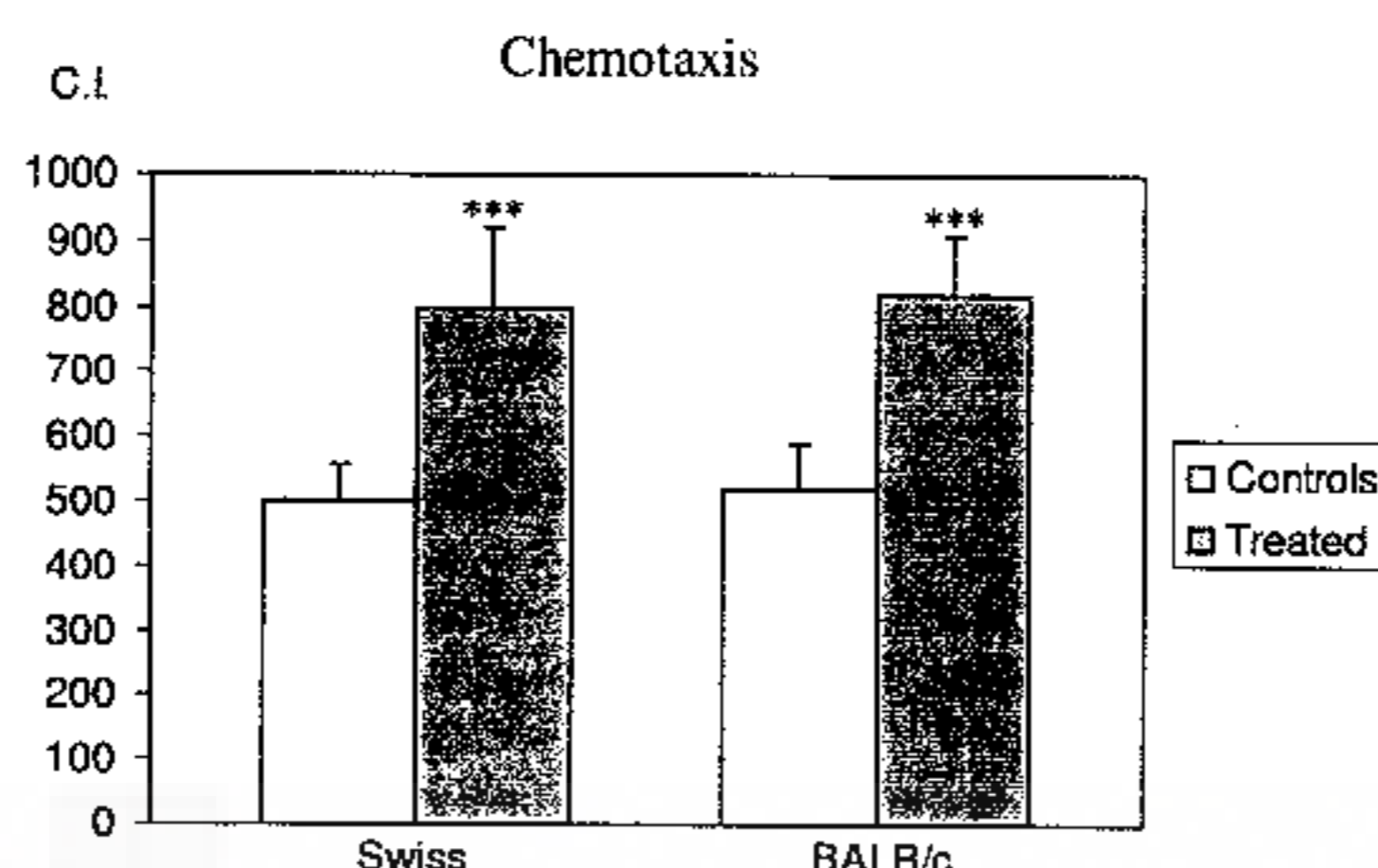


Fig. 2. Chemotaxis index (C.I.) of peritoneal macrophages from adult Swiss and BALB/c mice. Each column represents the mean \pm SD of 12 experiments, corresponding to control and thiol treated groups. *** $p < 0.001$ with respect to the values of the respective control.

improve this function of macrophages as it actually happened since the number of latex beads ingested by 100 macrophages (P.I.) (Fig. 3) was increased in both BALB/c ($p < 0.05$) and Swiss mice ($p < 0.001$). This effect was more relevant in macrophages from Swiss mice, which showed higher values ($p < 0.05$) in this capacity than in the cells from BALB/c mice. The percentages of macrophages phagocytosing, (phagocytic efficiency index) were not modified after the treatment, and both strains showed similar values ($39 \pm 7\%$).

In the presence of a phagocytic stimulus, macrophages initiate what is known as respiratory burst, in which a membrane-associated enzyme, NADPH oxidase, is activated catalyzing a reaction that produces superoxide anion (O_2^-) that is a precursor of active microbicidal oxidants. Although, *in vitro*, an increase of superoxide anion production by these thiol compounds has been observed in macrophages from BALB/c mice [7], the present results indicate that the ingestion of both NAC and thioproline induces no effect in the extracellular production of superoxide anion by macrophages from both Swiss (23 ± 6 nmol/ 10^6 cells in nonstimulated samples and 40 ± 10 nmol/ 10^6 in stimulated samples) and BALB/c mice (2 ± 1 nmol/ 10^6 in nonstimulated samples and 7 ± 2 nmol/ 10^6 in stimulated samples), the production being significantly ($p < 0.001$) smaller in BALB/c mice. Intracellular superoxide anion production (Fig. 4) did not change in cells from BALB/c mice, but a decrease in this production was observed in

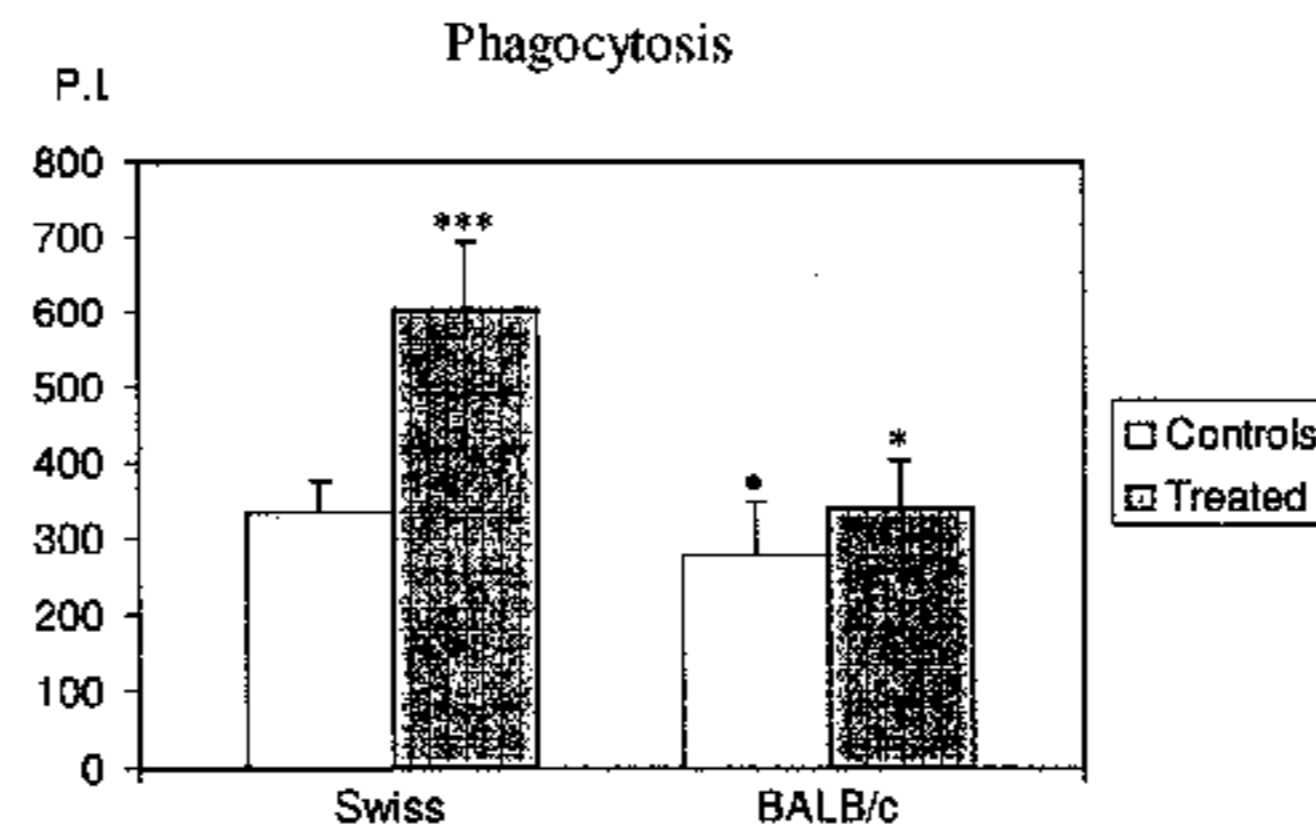


Fig. 3. Phagocytic index (P.I.) of peritoneal macrophages from adult Swiss and BALB/c mice. Each column represents the mean \pm SD of 12 experiments, corresponding to control and thiol treated groups. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ with respect to the values of the respective control. • $p < 0.05$ with respect to the values of the Swiss control group.

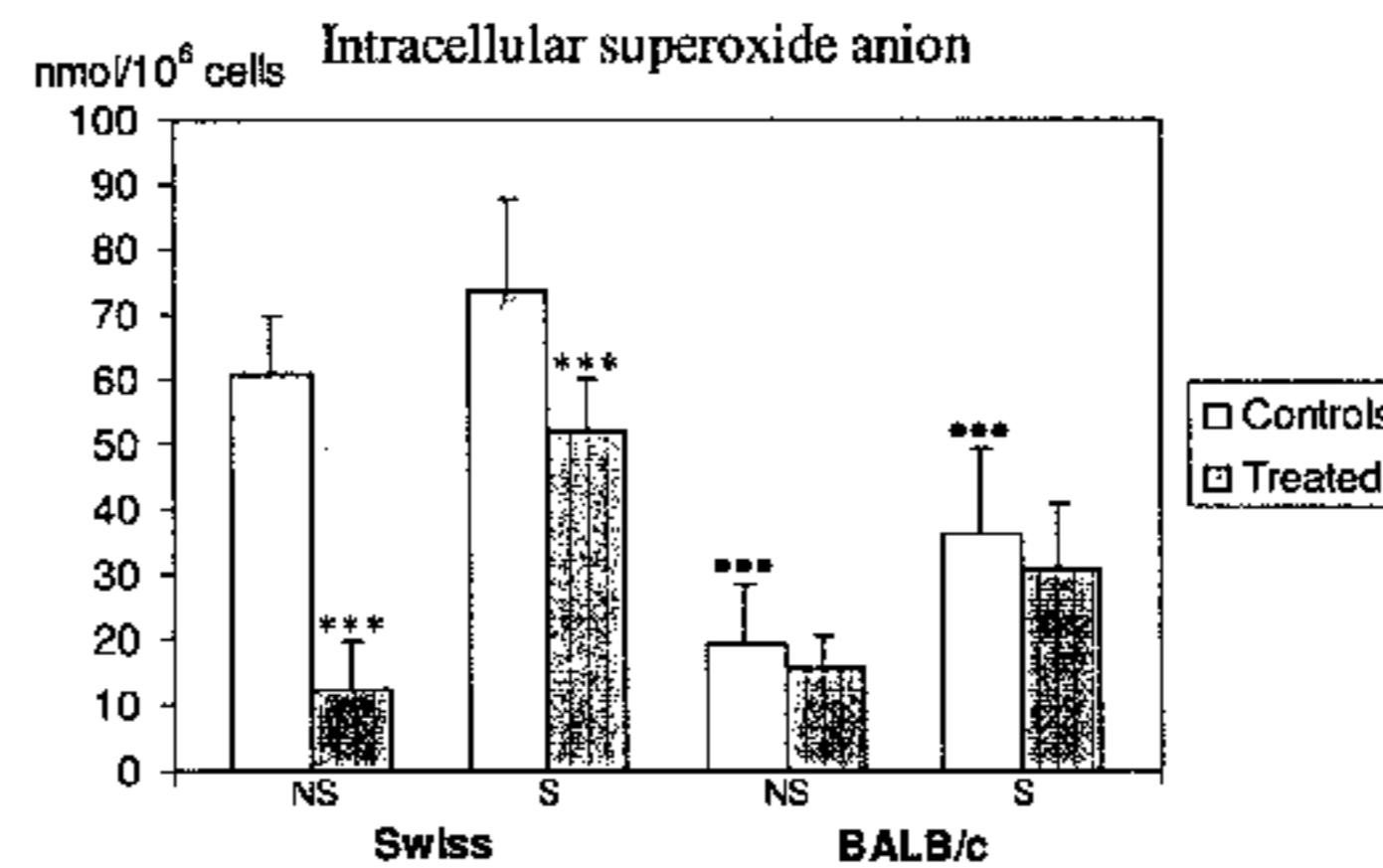


Fig. 4. Intracellular superoxide anion production (nmol/10⁶ cells) by stimulated and non stimulated samples of peritoneal macrophages from adult Swiss and BALB/c mice. Each column represents the mean \pm SD of 12 experiments, corresponding to control and thiol treated groups. *** $p < 0.001$ with respect to the values of the respective control. *** $p < 0.001$ with respect to the values of the Swiss control group.

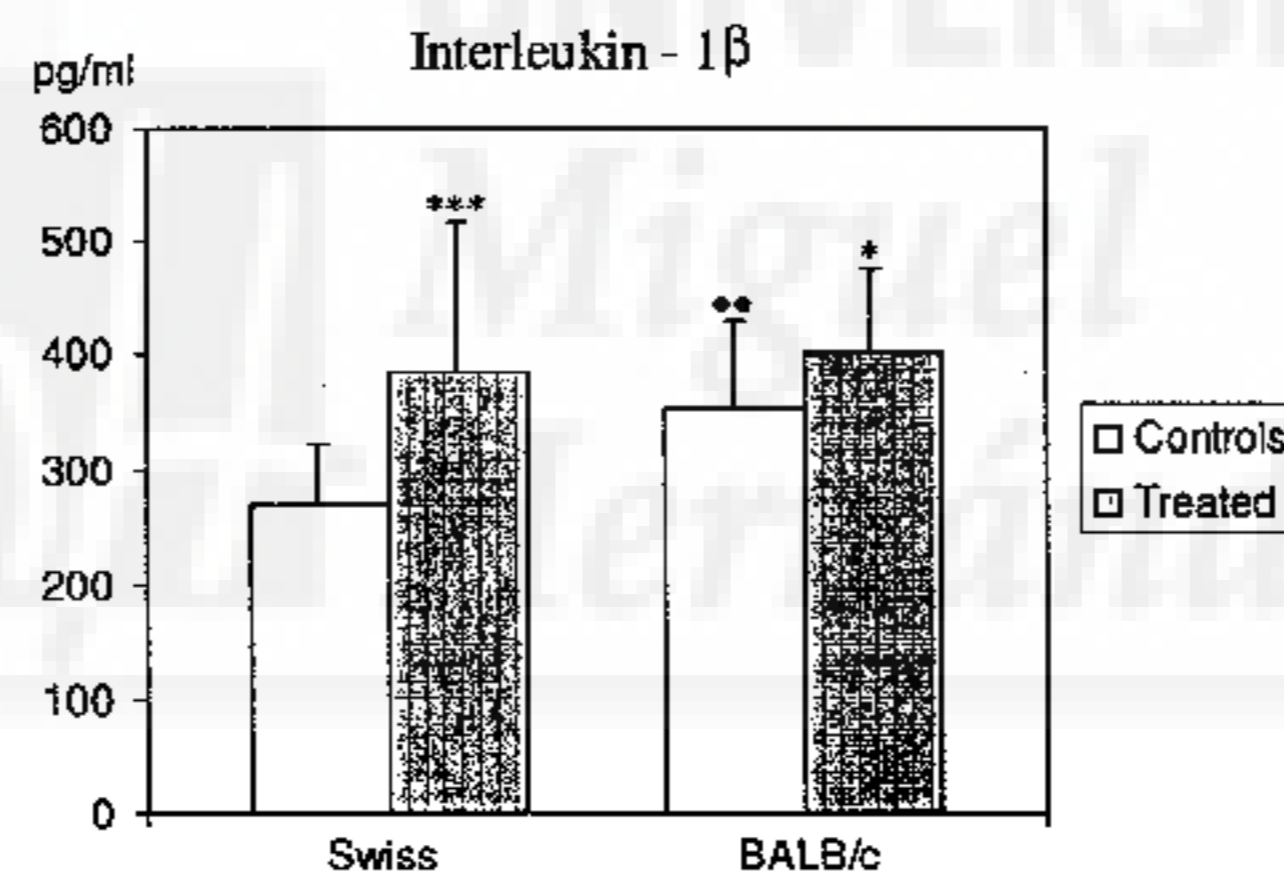


Fig. 5. Interleukin-1 β production (pg/ml) by peritoneal macrophages from adult Swiss and BALB/c mice. Each column represents the mean \pm SD of 12 experiments, corresponding to control and thiol treated groups. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ with respect to the values of the respective control. ** $p < 0.001$ with respect to the values of the Swiss control group.

macrophages from Swiss mice in both stimulated and nonstimulated samples ($p < 0.001$). Thus, NAC and thioproline play *in vivo* a role as free radical scavengers in Swiss mice. Comparing control values in both strains, macrophages from BALB/c mice produced lower superoxide anion levels ($p < 0.001$) than those cells from Swiss mice.

In regard to the IL-1 β (Fig. 5), macrophages produced significantly higher levels of this cytokine after treatment with thioproline and NAC in both Swiss ($p < 0.001$) and BALB/c mice ($p < 0.05$). IL-1 β

production is necessary to stimulate T lymphocytes in the antigenic presentation and plays important roles in many biological responses to infection and trauma. In the present study a clear increase in this cytokine production by LPS-stimulated macrophages has been observed after ingestion of NAC and thioproline in both strains, principally in Swiss mice. The ingestion of NAC, did not modify serum IL-1 β levels [12], so the increase observed by us after the treatment with both thiol compounds is probably due to a stimulant effect of thioproline.

4. Conclusions

The supplementation of the diet with thiol compounds such as NAC and thioproline may represent an advantage for the immunological state, which has been studied in such a pivotal immune cell, as it is the macrophage. This improvement of macrophage functions is more evident in cells from OF1-Swiss mice, a noninbred strain, than in macrophages from BALB/c mice, an inbred strain. These results give hope for the use of thiol compounds for stimulation of immune function in humans.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from CAM (07/090/96).

References

- [1] M. Atalay, P. Marnila, E.M. Lilius, O. Hänninen and K.S. Chandan, Glutathione-dependent modulation of exhausting exercise-induced changes in neutrophil function of rats, *European Journal of Applied Physiology* **74** (1996), 342–347.
- [2] J.V. Castell, A. Larrauri, T. Donato and J. Gómez-Lechón, Glutathione levels in human hepatocytes exposed to paracetamol, in: *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*, J. Viña, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, pp. 263–277.
- [3] M. De la Fuente, Changes in the macrophage function with aging, *Comparative Biochemistry and Physiology* **81A** (1985), 935–938.
- [4] M. De la Fuente, D. Ferrández, F. Muñoz, E. De Juan and J. Miquel, Stimulation by the antioxidant thioproline of the lymphocyte functions of old mice, *Mechanisms of Ageing and Development* **68** (1993), 27–36.
- [5] M. De la Fuente, M.D. Ferrández, M. Del Rio, M.S. Burgos and J. Miquel, Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline, *Mechanisms of Ageing and Development* **104** (1998), 213–225.
- [6] M. De la Fuente, M. Miñano, V.M. Victor, M. Del Rio, M.D. Ferrández, A. Díez and J. Miquel, Relation between exploratory activity and immune function in aged mice: a preliminary study, *Mechanisms of Ageing and Development* **102** (1998), 263–277.
- [7] M. Del Rio, G. Ruedas, S. Medina, V.M. Victor and M. De la Fuente, Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro, *Life Science* **63** (1998), 871–881.
- [8] D. E. Doherty, C. Haslett, M.G. Tonnesen and P.M. Henson, Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium, *Journal of Immunology* **138** (1987), 1762–1771.
- [9] G.M. Gilad and V.H. Gilad, Strain, stress, neurodegeneration and longevity, *Mechanisms of Ageing and Development* **78** (1995), 75–83.
- [10] A. Hernanz, M.E. Collazos and M. De la Fuente, Effect of age, culture medium and lymphocyte presence on ascorbate content of peritoneal macrophages from mice and guinea pigs during phagocytosis, *International Archives of Allergy and Applied Immunology* **91** (1991), 166–170.
- [11] J. Miquel and H. Weber, *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*, J. Viña, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, pp. 187–192.
- [12] P. Peristeris, B.D. Clark, S. Gatti, R. Faggione, A. Mantovani, M. Mengozzi, S.F. Orencole, M. Sironi and P. Ghezzi, N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production, *Cellular Immunology* **140** (1992), 390–399.
- [13] J.P. Phelan, Genetic variability and rodent models of human aging, *Experimental Gerontology* **27** (1992), 147–159.

- [14] C. Pieri, F. Moroni and R. Recchioni, Glutathione influences the proliferation as well as the extent of mitochondrial activation in rat splenocytes, *Cellular Immunology* **145** (1992), 210–217.
- [15] G.T. Saez, W.H. Bannister and J.V. Bannister, Free radicals and thiol compounds – the role of glutathione against free radical toxicity, in: *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*, J. Viña, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, pp. 237–254.
- [16] T. Urban, B. Akerlund, C. Jarstrand and B. Lindeke, Neutrophil function and glutathione-peroxidase (GSH-px) activity in healthy individuals after treatment with N-acetyl-L-cysteine, *Biomedical Pharmacotherapy* **51** (1997), 388–390.



Original report

Changes in several functions of murine peritoneal macrophages by N-acetylcysteine and thioproline ingestion. Comparative effect between two strains of mice

B. Blanco^a, M.D. Ferrández^a, R. Correa^a, M. Del Rio^a, C. Guaza^b, A. Hernanz^c and M. De la Fuente^{a,*}

^a *Department of Animal Physiology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain*

^b *Cajal Institute, CSIC, Madrid, Spain*

^c *Biochemistry Service, Hospital La Paz, Madrid, Spain*

Received 3 July 1998

Revised 8 October 1998

Accepted 12 October 1998

Abstract. The administration of the thiol compounds, N-acetylcysteine (NAC) and in particular thioproline (thiazolidine-4-carboxylic acid) at 0.1% w/w concentration in the diet, improves lymphocyte functions in old female Swiss mice, as has been shown in our previous studies. In the present work, adult mice from two different strains, namely BALB/c (an inbred strain) and OF1-Swiss (noninbred strain), were fed a diet supplemented with the above dose of each thiol compound jointly for five weeks. At 28 weeks of age, peritoneal cell suspensions were obtained and different steps of the phagocytic process, the most representative activity of macrophages, as well as interleukin-1 β (IL-1 β) production, were studied. Thus, adherence to substrate, mobility directed to a chemoattractant gradient (chemotaxis), ingestion of inert particles and superoxide anion production were analysed. The results show that diet supplementation with NAC plus thioproline increased all macrophage functions studied with the exception of superoxide anion production, which was decreased. These effects were more evident in macrophages from Swiss mice, whereas in BALB/c mice the stimulation of phagocytosis and IL-1 β production was lower and no differences were seen after treatment in adherence and superoxide anion production. These data suggest that immune function can be improved in adult mice by administration of the above thiol compounds, especially in the noninbred strain of OF1-Swiss mice.

Keywords: Thioproline, N-acetylcysteine, macrophages, phagocytic function, interleukin-1 β

1. Introduction

The production of oxygen radicals by immune cells, specially by phagocytes, is necessary to carry out their functions, and it is one example of the useful role of reactive oxygen species. However, they can become a source of tissue damage if their production is not localised or lasts too long, resulting

* Address correspondence to: Mónica De la Fuente, Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

in oxidative stress. For this reason, the organism, and specially the immunocompetent cells, must have available antioxidant defences to maintain the oxidant-antioxidant balance. Moreover, phagocytes, such as macrophages, use antioxidant molecules in their functions [10]. Therefore, therapeutic action aimed at increasing antioxidant defence mechanisms is still a clinical challenge.

Reduced glutathione (GSH) is essential for many biological processes because of the reducing power due to the sulfhydryl group of cysteine and, as pointed out by Saez et al. [15], "it is considered, in fact, one of the most important and efficient antioxidative defence mechanism occurring in living cells". As further summarized by Saez et al., GSH contributes to the reduction of hydrogen peroxide and lipid peroxides catalyzed by GSH peroxidase, thus serving as an inhibitor of peroxidation-induced damage, and it may play a key role in controlling excessive free-radical production during oxidative stress.

In agreement with the above, not only GSH [14] but also two thiol compounds, which act as glutathione precursors in cells, i.e.: thiazolidine-4-carboxylic acid (thioprolin) and N-acetylcysteine (NAC) [2], exert a favourable effect on immune cells, the functions of which depend to a large degree on redox reactions of thiol compounds [11]. Thus, GSH has been shown to increase lymphoproliferation in response to mitogens [14] as well as mobilization of neutrophils [1], and we have observed a stimulation of murine lymphocyte proliferation and migration after ingestion of a diet supplemented with thioproline for 36 weeks [4]. Even a short-term ingestion of this compound (5 weeks) by old mice showed a stimulant effect on proliferation and mobility of lymphocytes, as well as on cytotoxic activities such as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and natural killer (NK) activity [5]. In a recent study, Urban et al. [16] have shown that ingestion of NAC (600 mg daily) by healthy individuals for a period of two weeks optimizes phagocytosis of neutrophils. We have also observed that thioproline, NAC and GSH increase, *in vitro*, several functions of murine peritoneal macrophages [7].

The aim of the present work was, on the one hand, to study in adult mice the effect of a diet supplemented with both NAC and thioproline for five weeks on several functions of a fundamental immune cell, the macrophage. On the other hand, since there are differences between inbred strains of laboratory rodents in parameters such as life span and neuroendocrine response to stressful stimuli [9], and it has been proposed that several strains should be compared for valid extrapolation of data obtained in inbreeding strain to normal heterogeneous populations such as humans [13], the present study has been carried out on two strains of mice, BALB/c (an inbred strain with a mean life span of 16.2 months) and OF1-Swiss mice (a noninbred strain with an 18 month mean life span).

2. Experimental procedure

Female BALB/c and OF1 Swiss mice (Iffa-Credo, France) 20 week old were maintained at a constant temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ on a 12 hour light/dark reversed cycle and fed Sander Mus pellets (Panlab L.S. Barcelona, Spain) and water *ad libitum*. At 23 weeks of age, animals of each strain were divided into control and treated groups, with 12 animals in each group. The treated groups received a diet supplemented with 0.1% w/w of both thioproline and N-acetylcysteine (NAC) during five weeks.

At 28 weeks old mice were sacrificed by cervical dislocation according to the guidelines of the European Community Council Directives 86/6091 EEC, and peritoneal suspensions were obtained following the method previously described by De la Fuente et al. [3]. The peritoneal resident cells, containing 40% macrophages and 60% lymphocytes, were removed and the macrophages, identified by morphological and non-specific esterase staining, were counted and adjusted at 5×10^5 cells/ml of Hank's medium.

The assay of phagocytic function (adherence, chemotaxis, phagocytosis and superoxide anion production) was carried out following methods previously described [6]. Briefly, for the adherence capacity

assay, aliquots of peritoneal macrophage suspensions were placed in eppendorf tubes and incubated for 10, 20, 30 and 60 min at 37°C. The adherence index (A.I.) was calculated according to the following equation: $AI = (1 - (\text{macrophages per ml supernatant} / \text{macrophages per ml original sample})) \times 100$. For the chemotaxis assay, aliquots of macrophage suspensions were deposited in the upper compartment of Boyden's chambers and a chemoattractant (f-Met-Leu-Phe, 10^{-8} M, Sigma) in the lower compartment separated by a filter of 3 μm pore (Millipore). After 3 hours of incubation, the filter was stained and the number of macrophages in its lower face was counted (chemotaxis index: C.I.). Phagocytosis of inert particles was carried out incubating aliquots of peritoneal suspension in plates for 30 min with latex beads (1.09 μm , Sigma), and after this time the cells were stained and the number of particles ingested by 100 macrophages was counted and expressed as phagocytosis index (P.I.). The percentage of macrophages that phagocytosed was also determined and expressed as phagocytosis efficiency index (P.E.I.). The superoxide anion production by macrophages was evaluated by the capacity of this anion to reduce nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma) forming a formazan measured spectrophotometrically at 525 nm. The macrophage suspensions were incubated for 60 min in the presence of NBT and latex beads (stimulated samples) or in the absence of latex beads (nonstimulated samples). Both, intracellular and extracellular superoxide anion production were evaluated and expressed as nmol/ 10^6 cells.

For determination of interleukin-1 β (IL-1 β) levels in the supernatants of macrophage cultures, peritoneal suspension samples were incubated on plates during 1 hour, and after this time lipopolysaccharide (LPS, *E. coli*, 055:B5, Sigma, 10 $\mu\text{g/ml}$) was added to the macrophage monolayer. After 24 hours of incubation the supernatants were collected and the concentration of IL-1 β was measured using an ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) and the results expressed as pg/ml.

The data are expressed as the mean \pm SD of the values obtained from 12 experiments and evaluated statistically by the Student's *t*-test, $p < 0.05$ being the minimum significant level. The normality of the samples was confirmed by the Kolmogorov–Smirnov test.

3. Results and discussion

The results of the present study show that the ingestion of a supplemented diet with both thioproline and NAC (0.1% w/w) for five weeks in two strains of mice increases several macrophage functions and decreases superoxide anion production.

Adherence and chemotaxis are the first steps in the immune response [8]. An increase of adherence is positive if it is followed by increased chemotaxis. Thioproline and NAC ingestion causes an activation of macrophages, since it stimulates adherence ($p < 0.001$) in Swiss mice (although the treatment does not affect it in BALB/c mice) (Fig. 1), and increases significantly ($p < 0.001$) the chemotaxis in both strains (Fig. 2). The absence of effect on adherence of macrophages from BALB/c mice could be due to the high values of this capacity found in control animals from this strain, an adherence significantly ($p < 0.001$) higher than that from Swiss control animals. Moreover, a recent study *in vitro* with macrophages from BALB/c mice showed that neither NAC nor thioproline had any effect on the adherence capacity of these cells, but both NAC and thioproline increased chemotaxis [7]. Thus, the effects observed after treatment in these two activities of macrophages seem to be due to a direct action of the two thiol compounds on immune cells. In addition, it has also been shown that thioproline ingestion increases the chemotaxis of lymphocytes from old Swiss mice [4].

A proper chemotaxis capacity, which allows phagocytes to reach the inflammation sites, is essential for ensuring phagocytosis of foreign or damaged material. The ingestion of the two compounds seems to

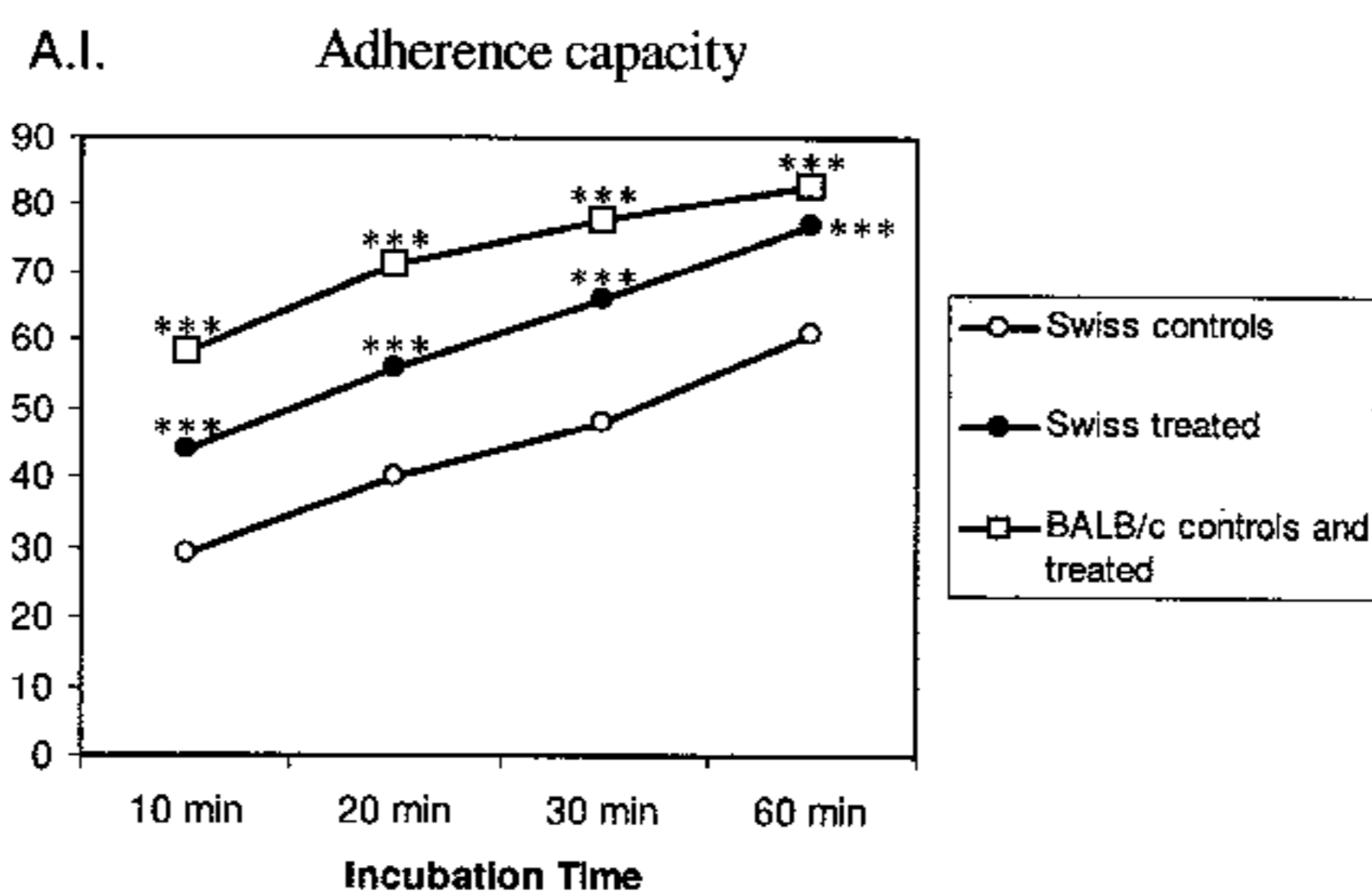


Fig. 1. Adherence index (A.I.) of peritoneal macrophages from adult Swiss and BALB/c mice at 10, 20, 30, and 60 min of incubation. Each data represent the mean \pm SD of 12 experiments, corresponding to control and thiol treated groups. *** $p < 0.001$ with respect to the values of the Swiss control group.

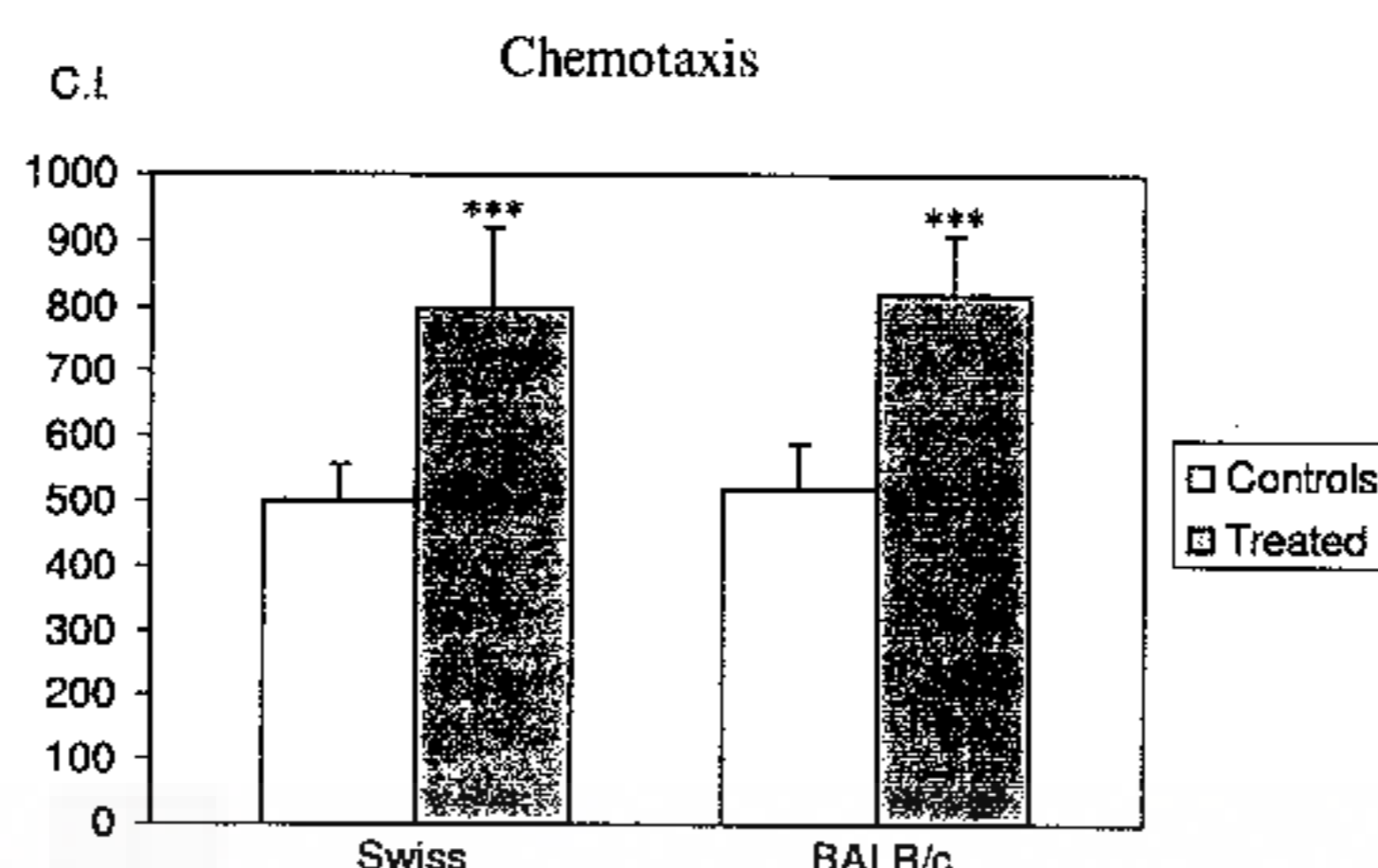


Fig. 2. Chemotaxis index (C.I.) of peritoneal macrophages from adult Swiss and BALB/c mice. Each column represents the mean \pm SD of 12 experiments, corresponding to control and thiol treated groups. *** $p < 0.001$ with respect to the values of the respective control.

improve this function of macrophages as it actually happened since the number of latex beads ingested by 100 macrophages (P.I.) (Fig. 3) was increased in both BALB/c ($p < 0.05$) and Swiss mice ($p < 0.001$). This effect was more relevant in macrophages from Swiss mice, which showed higher values ($p < 0.05$) in this capacity than in the cells from BALB/c mice. The percentages of macrophages phagocytosing, (phagocytic efficiency index) were not modified after the treatment, and both strains showed similar values ($39 \pm 7\%$).

In the presence of a phagocytic stimulus, macrophages initiate what is known as respiratory burst, in which a membrane-associated enzyme, NADPH oxidase, is activated catalyzing a reaction that produces superoxide anion (O_2^-) that is a precursor of active microbicidal oxidants. Although, *in vitro*, an increase of superoxide anion production by these thiol compounds has been observed in macrophages from BALB/c mice [7], the present results indicate that the ingestion of both NAC and thioproline induces no effect in the extracellular production of superoxide anion by macrophages from both Swiss (23 ± 6 nmol/ 10^6 cells in nonstimulated samples and 40 ± 10 nmol/ 10^6 in stimulated samples) and BALB/c mice (2 ± 1 nmol/ 10^6 in nonstimulated samples and 7 ± 2 nmol/ 10^6 in stimulated samples), the production being significantly ($p < 0.001$) smaller in BALB/c mice. Intracellular superoxide anion production (Fig. 4) did not change in cells from BALB/c mice, but a decrease in this production was observed in

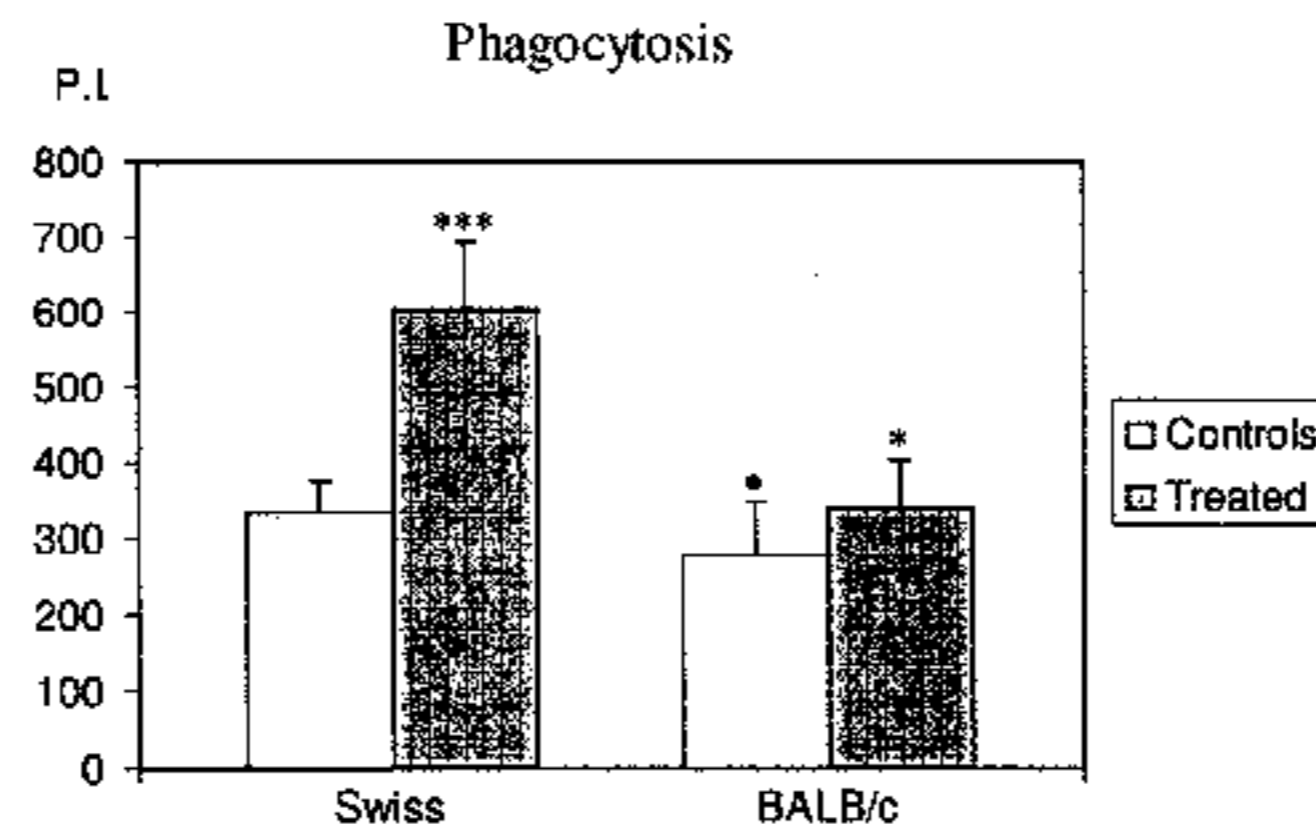


Fig. 3. Phagocytic index (P.I.) of peritoneal macrophages from adult Swiss and BALB/c mice. Each column represents the mean \pm SD of 12 experiments, corresponding to control and thiol treated groups. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ with respect to the values of the respective control. • $p < 0.05$ with respect to the values of the Swiss control group.

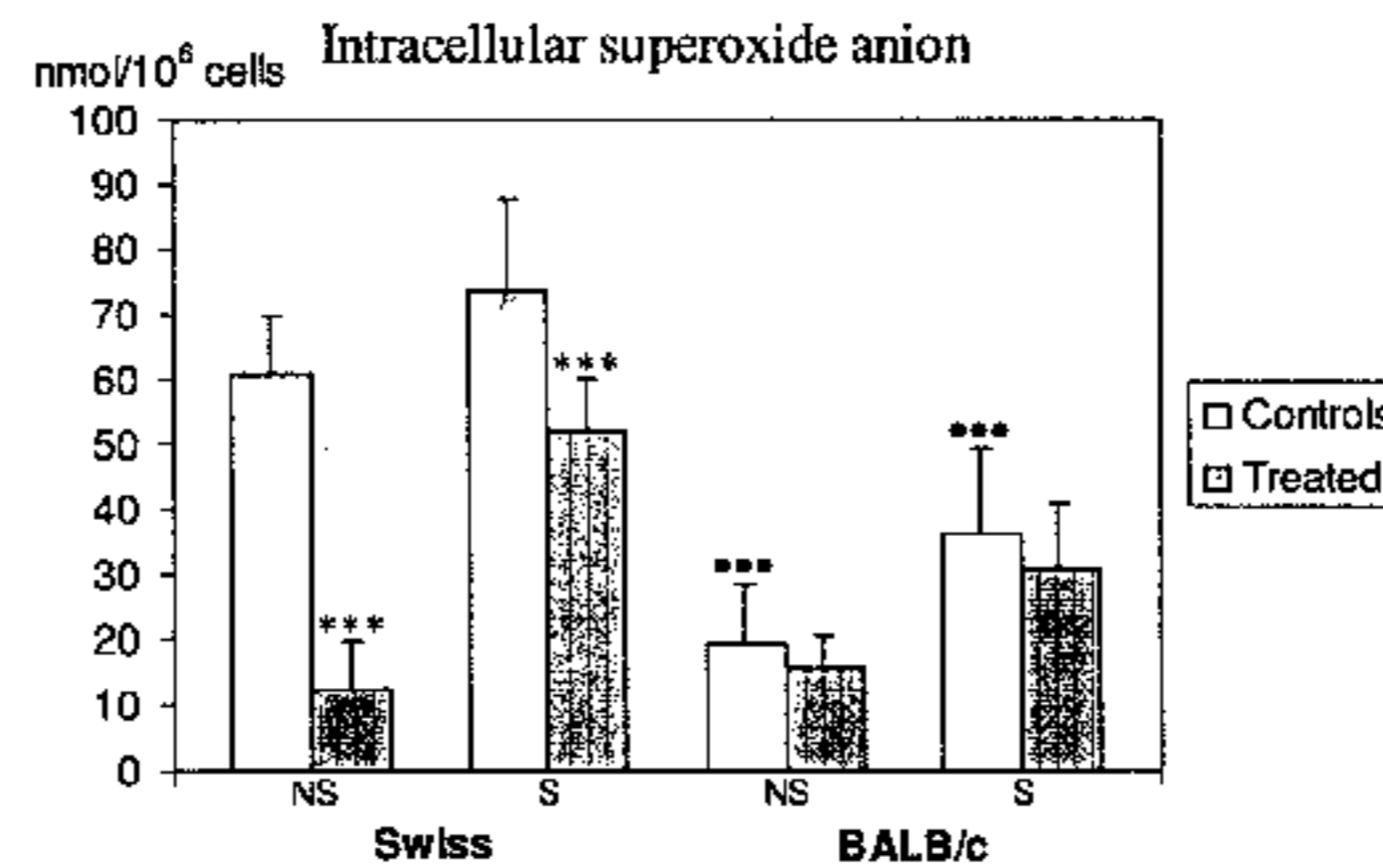


Fig. 4. Intracellular superoxide anion production (nmol/10⁶ cells) by stimulated and non stimulated samples of peritoneal macrophages from adult Swiss and BALB/c mice. Each column represents the mean \pm SD of 12 experiments, corresponding to control and thiol treated groups. *** $p < 0.001$ with respect to the values of the respective control. ••• $p < 0.001$ with respect to the values of the Swiss control group.

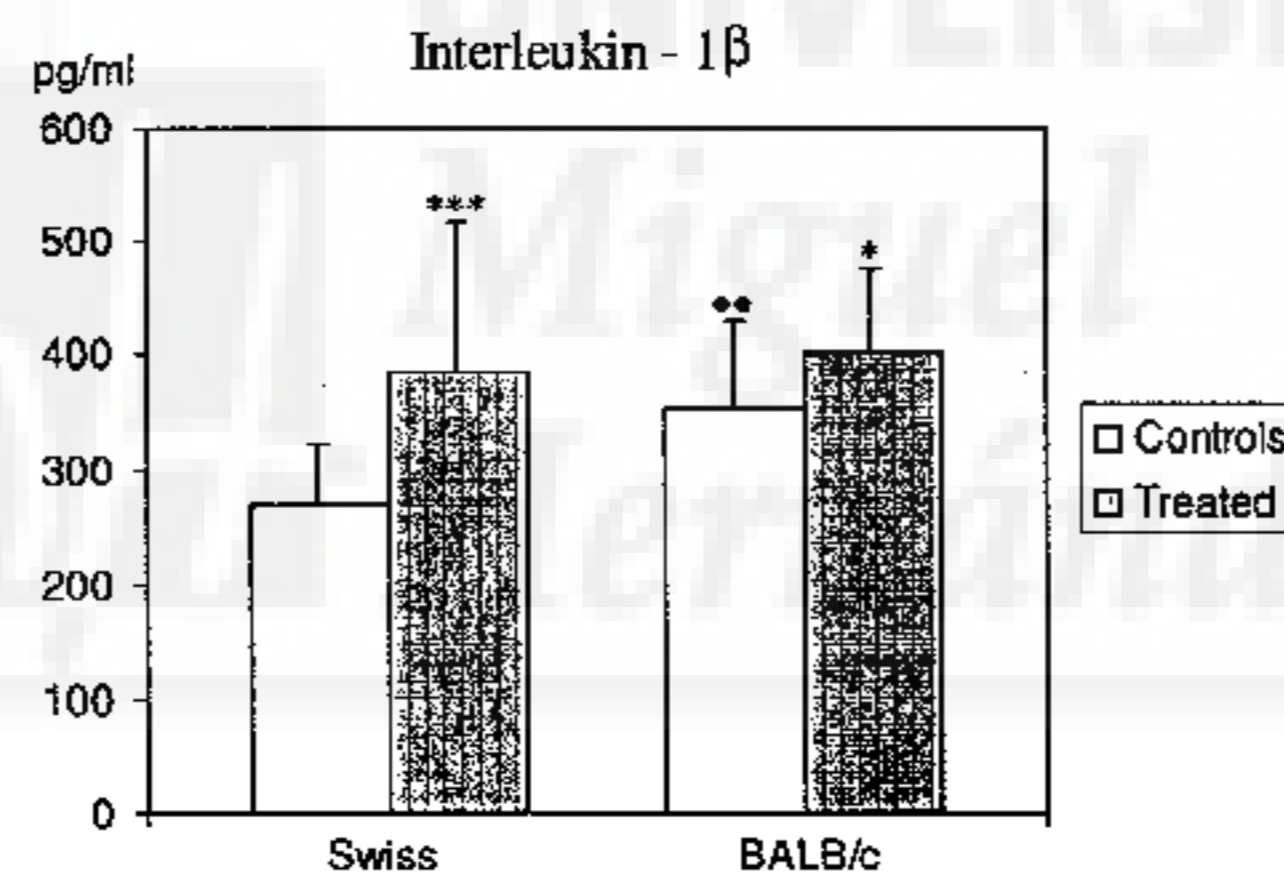


Fig. 5. Interleukin-1 β production (pg/ml) by peritoneal macrophages from adult Swiss and BALB/c mice. Each column represents the mean \pm SD of 12 experiments, corresponding to control and thiol treated groups. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ with respect to the values of the respective control. •• $p < 0.001$ with respect to the values of the Swiss control group.

macrophages from Swiss mice in both stimulated and nonstimulated samples ($p < 0.001$). Thus, NAC and thioproline play *in vivo* a role as free radical scavengers in Swiss mice. Comparing control values in both strains, macrophages from BALB/c mice produced lower superoxide anion levels ($p < 0.001$) than those cells from Swiss mice.

In regard to the IL-1 β (Fig. 5), macrophages produced significantly higher levels of this cytokine after treatment with thioproline and NAC in both Swiss ($p < 0.001$) and BALB/c mice ($p < 0.05$). IL-1 β

production is necessary to stimulate T lymphocytes in the antigenic presentation and plays important roles in many biological responses to infection and trauma. In the present study a clear increase in this cytokine production by LPS-stimulated macrophages has been observed after ingestion of NAC and thioproline in both strains, principally in Swiss mice. The ingestion of NAC, did not modify serum IL-1 β levels [12], so the increase observed by us after the treatment with both thiol compounds is probably due to a stimulant effect of thioproline.

4. Conclusions

The supplementation of the diet with thiol compounds such as NAC and thioproline may represent an advantage for the immunological state, which has been studied in such a pivotal immune cell, as it is the macrophage. This improvement of macrophage functions is more evident in cells from OF1-Swiss mice, a noninbred strain, than in macrophages from BALB/c mice, an inbred strain. These results give hope for the use of thiol compounds for stimulation of immune function in humans.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from CAM (07/090/96).

References

- [1] M. Atalay, P. Marnila, E.M. Lilius, O. Hänninen and K.S. Chandan, Glutathione-dependent modulation of exhausting exercise-induced changes in neutrophil function of rats, *European Journal of Applied Physiology* **74** (1996), 342–347.
- [2] J.V. Castell, A. Larrauri, T. Donato and J. Gómez-Lechón, Glutathione levels in human hepatocytes exposed to paracetamol, in: *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*, J. Viña, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, pp. 263–277.
- [3] M. De la Fuente, Changes in the macrophage function with aging, *Comparative Biochemistry and Physiology* **81A** (1985), 935–938.
- [4] M. De la Fuente, D. Ferrández, F. Muñoz, E. De Juan and J. Miquel, Stimulation by the antioxidant thioproline of the lymphocyte functions of old mice, *Mechanisms of Ageing and Development* **68** (1993), 27–36.
- [5] M. De la Fuente, M.D. Ferrández, M. Del Rio, M.S. Burgos and J. Miquel, Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline, *Mechanisms of Ageing and Development* **104** (1998), 213–225.
- [6] M. De la Fuente, M. Miñano, V.M. Victor, M. Del Rio, M.D. Ferrández, A. Díez and J. Miquel, Relation between exploratory activity and immune function in aged mice: a preliminary study, *Mechanisms of Ageing and Development* **102** (1998), 263–277.
- [7] M. Del Rio, G. Ruedas, S. Medina, V.M. Victor and M. De la Fuente, Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro, *Life Science* **63** (1998), 871–881.
- [8] D. E. Doherty, C. Haslett, M.G. Tonnesen and P.M. Henson, Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium, *Journal of Immunology* **138** (1987), 1762–1771.
- [9] G.M. Gilad and V.H. Gilad, Strain, stress, neurodegeneration and longevity, *Mechanisms of Ageing and Development* **78** (1995), 75–83.
- [10] A. Hernanz, M.E. Collazos and M. De la Fuente, Effect of age, culture medium and lymphocyte presence on ascorbate content of peritoneal macrophages from mice and guinea pigs during phagocytosis, *International Archives of Allergy and Applied Immunology* **91** (1991), 166–170.
- [11] J. Miquel and H. Weber, *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*, J. Viña, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, pp. 187–192.
- [12] P. Peristeris, B.D. Clark, S. Gatti, R. Faggione, A. Mantovani, M. Mengozzi, S.F. Orencole, M. Sironi and P. Ghezzi, N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production, *Cellular Immunology* **140** (1992), 390–399.
- [13] J.P. Phelan, Genetic variability and rodent models of human aging, *Experimental Gerontology* **27** (1992), 147–159.

- [14] C. Pieri, F. Moroni and R. Recchioni, Glutathione influences the proliferation as well as the extent of mitochondrial activation in rat splenocytes, *Cellular Immunology* **145** (1992), 210–217.
- [15] G.T. Saez, W.H. Bannister and J.V. Bannister, Free radicals and thiol compounds – the role of glutathione against free radical toxicity, in: *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*, J. Viña, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, pp. 237–254.
- [16] T. Urban, B. Akerlund, C. Jarstrand and B. Lindeke, Neutrophil function and glutathione-peroxidase (GSH-px) activity in healthy individuals after treatment with N-acetyl-L-cysteine, *Biomedical Pharmacotherapy* **51** (1997), 388–390.



The Amount of Thiolic Antioxidant Ingestion Needed to Improve Several Immune Functions is Higher in Aged than in Adult Mice

M. DE LA FUENTE^{a,*}, J. MIQUEL^b, M.P. CATALÁN^a, V.M. VÍCTOR^a and N. GUAYERBAS^a

^aDepartment of Animal Physiology, Faculty of Biology, Complutense University, Av. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain; ^bDepartment of Biotechnology, University of Alicante, Alicante, Spain

Accepted by Professor H.E. Poulsen

(Received 14 March 2001; In revised form 25 June 2001)

With aging there is an increase of oxidative stress due to an imbalance between the oxidant production and the antioxidant levels in favor of the former. Since immune cell functions are specially linked to reactive oxygen species (ROS) generation, the oxidant/antioxidant balance is essential for these cells. Although low levels of antioxidants cause a decrease in immune function, very high levels of antioxidant compounds could show prooxidant effects. In the present work, we have studied the effect of diet supplementation, for 4 weeks, with two different doses of two thiolic antioxidants, namely thioproline (TP) and *N*-acetylcysteine (NAC), at 0.1% (w/w) and 0.3% (w/w, of each antioxidant) on the main immune system cells, i.e.: macrophages, lymphocytes and natural killer (NK) cells of adult (33 ± 1 week old) and aged (75 ± 1 week old) female Swiss mice. Two groups of animals, adult and aged mice, fed standard diet were used as controls. The results show that the ingestion of 0.1% doses of thiols improves, in the adult mice, several immune functions such as the chemotaxis capacity of both macrophages and lymphocytes, the phagocytosis of macrophages, the lymphoproliferative response to the mitogen Con A and the NK activity. Moreover, no change was observed in adherence capacity of immune cells, and superoxide production was decreased. By contrast, in aged mice the ingestion of these amounts of antioxidants did not change the immune functions studied with the exception of NK activity, which was stimulated. The ingestion of 0.3% of antioxidants by adult mice only increased some immune functions such as adherence and superoxide production, which are markers of oxidative stress. Other functions such as chemotaxis or lymphoproliferative response decreased. However, the ingestion of these very high amounts of thiols by aged animals increased the

phagocytosis, the NK activity and specially the lymphoproliferative response to the mitogen, a function that is very depressed with aging.

Keywords: Ageing; ROS; Thiolic antioxidants; Macrophage; Lymphocyte; Diet

INTRODUCTION

Immune cell competence is specially linked to reactive oxygen species (ROS) generation, which is needed to support such important function as the microbicidal and cytotoxic activities.^[1] However, excessive amounts of ROS are harmful to immune cells, because their attack to cellular components can lead to cell damage or death. For this reason, the organism, and specially the immunocompetent cells, rely on antioxidant mechanisms in order to maintain the oxidant–antioxidant balance required to preserve the integrity and functionality of membrane lipids, cellular proteins, and nucleic acids, as well as to control signal transduction of gene expression.^[2] It seems that immune system cells generally need higher concentrations of antioxidants than other cells.^[3] Therefore, the administration of antioxidants may be a useful therapy to improve immune functions. In fact, previous work by us and other authors, has shown an enhancement of leukocyte

*Corresponding author. Tel.: +34-91-3944989. Fax: +34-91-3944935. E-mail: mondelaf@bio.ucm.es

functions after treatment with several antioxidants *in vivo* or *in vitro*.^[4-7] This is specially relevant to aging, a process accompanied by changes in functions of immune cells such as phagocytes, NK cells and lymphocytes, specially T cells.^[8-11] The deterioration of the immune system with age or "immunosenescence" is believed to contribute to morbidity and mortality, and several studies have suggested a positive association between good immune cell activity, concretely T cell function and longevity.^[12] These age-related alterations of the immune functions seem to result from oxidative stress,^[2] since aging is linked to an increased rate of free radical generation and decline in antioxidant competence.^[8,13,14] For this reason, diet supplementation with antioxidants could prevent or delay the onset of age related immune impairment, and in fact, beneficial effects have been observed in aged subject after that supplementation.^[6,15-17] Reduced glutathione (GSH) is one the most important and effective antioxidant defence mechanisms in cells.^[18] as well as *N*-acetylcysteine (NAC) and thioproline (TP), which act as glutathione precursors,^[19,20] thus exerting a favorable effect on immune functions. GSH has been shown to increase lymphoproliferation in response to mitogens^[21] and improve macrophage functions.^[4] Further, NAC and TP enhance several functions of leukocytes.^[15,22] However, there is some uncertainty on the dose of dietary antioxidants needed to reach an optimal immune function, since high doses of antioxidants, can show prooxidant properties.^[5,23,24] Moreover, the amount of antioxidants required to preserve the homeostatic oxidant/prooxidant balance could vary depending on the oxidative state, which changes with the age of the individuals. In the present study in adult and aged Swiss mice we have investigated the effect of two different amounts of NAC and TP, namely 0.1% (w/w) and 0.3% (w/w), ingested for four weeks on the main immune cell functions because in a previous work we observed the improvement of several functions of peritoneal macrophages in adult Swiss mice after the ingestion of 0.1% (w/w) of those antioxidants over the same time period.^[22]

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female OF1 Swiss mice (*Mus musculus*) (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain), aged 33 ± 1 and 75 ± 1 weeks old, were maintained at a constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) in sterile conditions inside an aseptic air negative-pressure environmental cabinet (FluFrance, Cachan, France) on a 12h light/dark cycle and fed Sander Mus pellets (Panlab L.S. Barcelona, Spain) and water *ad libitum*. The animals

used did not show any sign of malignancy or other pathological processes.

Reagents

Thioprolone and *N*-acetylcysteine were purchased from Sigma (St. Louis, USA), and the following chemicals were also obtained from Sigma: Concanavaline A (Con A) mitogen, formylated peptide (f-Met-Leu-Phe, fMLP), latex beads and nitroblue tetrazolium (NBT). RPMI 1640 medium, fetal calf serum (FCS) and gentamicin were purchased from Gibco (Pasley, Scotland, UK); polycarbonate filters of $3 \mu\text{m}$ from Millipore (Millipore Iberica, Madrid, Spain) and MIF plates from Kartell (Italy). Trypan blue was from Merck (Darmstadt, Germany).

Experimental Procedure

At 28 and 71 weeks of age, animals were divided into control and treated groups, with 10 animals in each group. One treated group received a diet supplemented with 0.1% (w/w) and another group received 0.3% (w/w) of both *N*-acetylcysteine (NAC) and Thioproline (TP) for 4 weeks. The animals were weighted before and after of treatment. Then, the animals were sacrificed by cervical dislocation according to the guidelines of the European Community Council Directives 86/6091 EEC.

Collection of Leukocytes

Peritoneal suspensions were obtained by a procedure previously described.^[25] Briefly, 3 ml of Hank's solution, adjusted to pH 7.4, were injected intraperitoneally, then the abdomen was massaged and the peritoneal exudate cells, consisting of 60% lymphocytes and 40% macrophages, were collected allowing recovery of 90-95% of the injected volume. The cells were counted in Neubauer chambers and then, some samples were adjusted to 5×10^5 macrophages/ml of Hank's medium for the study of phagocytic function, and other samples to 5×10^5 lymphocytes/ml for the assays of adherence and chemotaxis of peritoneal lymphocytes. Then, axillary nodes, spleen, and thymus were removed aseptically and gently pressed through a mesh screen obtaining a cell suspension which was centrifuged to isolate the leukocytes of these organs and then adjusted to 1×10^6 lymphocytes/ml of Hank's medium, in the samples were used for chemotaxis; supplemented medium, RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, previously inactivated by heat (30 min at 56°C) and with gentamicin (1 mg/ml), in the samples were used for proliferation assays; and RPMI 1640 without phenol red for cytotoxicity.

Assay of Adherence

The assay of adherence to substrate was carried out by a method previously described.^[26] Aliquots of 200 μ l of peritoneal, axillary node, spleen or thymus suspensions were placed in eppendorf tubes. At 20 min of incubation, 10 μ l were removed from each sample, after gently shaking to resuspend the sedimented cells, and the number of nonadhered lymphocytes was determined by counting in Neubauer chambers (Blau Brand, Germany) in an optical microscope (40 \times magnification lens). The adherence index, A.I., was calculated as follows:

$$\text{A.I.} = 100 - \frac{[(\text{cells/ml supernatant}) / (\text{cells/ml original sample})] \times 100.}$$

Assay of Chemotaxis

Chemotaxis was evaluated according to a method^[26] consisting basically on the use of chambers with two compartments separated by a filter with a pore diameter of 3 μ m (Millipore, Madrid, Spain). Aliquots of 300 μ l of the different (peritoneal, axillary nodes, spleen or thymus) suspensions were deposited in the upper compartment. Aliquots of 400 μ l of the chemoattractant f-Met-Leu-Phe (10^{-8} M), were put into the lower compartment. The chemotaxis index (C.I.) was determined by counting the number of cells in the lower face of the filter.

Assay of Phagocytosis

The phagocytosis assay was carried out by a method described by us.^[26] Aliquots of 200 μ l of peritoneal suspension in MIF plates, with 20 μ l of latex beads (1.09 μ m diluted to 1% PBS). The number of particles ingested by 100 macrophages was counted, and expressed as phagocytosis index (P.I.).

Assay of Superoxide Anion Production

The nitroblue tetrazolium (NBT) reduction test, based on an equimolar reaction between NBT and superoxide anion,^[27] was carried out for determination of superoxide production according to a method previously described.^[26] Briefly, aliquots of 250 μ l of peritoneal suspension were mixed with 250 μ l of NBT solution (1 mg/ml), and aliquots of 50 μ l of latex beads were added to one sample set (stimulated samples) and 50 μ l of Hank's medium to the other set (non-stimulated samples). Both, intracellular and extracellular superoxide anion production were evaluated and expressed as nmol/ 10^6 cells.

Assay of Lymphoproliferation

The proliferation of lymphocytes induced by Con A (1 μ g/ml) mitogen, was determined in 72 h cultures. A BrdU labeling and detection commercial kit (Roche Diagnostics, Switzerland) following a method previously described^[28] was used. Briefly, it consisted on the addition to the culture medium of BrdU that was incorporated into freshly synthesized DNA. Following fixation of cells, cellular DNA was partially digested by nuclease treatment. Next a peroxidase labeled antibody to BrdU was added and bound to BrdU. At the final step, the peroxidase substrate was added yielding a colored reaction product as the result of peroxidase enzyme activity. The absorbance of the sample (measured at 405 nm) is directly correlated to the level of BrdU incorporated into cellular DNA.

Assay of the Natural Cytotoxicity

The NK activity of the leukocytes from axillary nodes, spleen and thymus was studied, as described by us,^[26] using an enzymatic test (Cytotox96 TM, Promega, USA) based on the determination of lactate dehydrogenase (LDH; using a tetrazolium salt). YAC-1 cells from a murine lymphoma were used as target cells and maintained in a complete medium (RPMI 1640 plus 10% FCS). Target cells were seeded in 96 well U-bottom culture plates at 10^4 cells/well in RPMI 1640 without phenol red, and effector cells from axillary nodes, spleen and thymus were added at 10^5 cells/well. The effector/target rate used, 10/1 was found by us to be responsible for similar results to those obtained in previous work with radioactive techniques.^[29] Four kinds of control measurements were performed: a target spontaneous release; a target maximum release; an effector spontaneous release; and a volume correction control to adjust the volume change caused by the addition of lysis solution to the maximum release control wells. To determine the percent of target cells killed, the following equation was used:

$$\% \text{ lysis} = ((E - ES - TS) / (M - ES - TS)) \times 100$$

where E is the mean of absorbances in the presence of effector cells, ES the mean of absorbances of effector cells incubated alone, TS the mean of the absorbances of target cells incubated with medium alone, and M is the mean of maximum absorbances after incubating target cells with lysis solution and subtracting the value from the volume correction control.

Statistical Analysis

The data are expressed as the mean \pm SD of the values from the number of experiments shown in the

figures and evaluated statistically by the two-way ANOVA and Scheffe *F*-test for the comparison of parametric samples, $p < 0.05$ being the minimum significant level. The normality of the samples was confirmed by the Kolmogorov–Smirnov test.

RESULTS

No significant difference in the weight data after the antioxidant treatment was observed, neither in adult (40 ± 6 g) nor in old (38 ± 5 g) mice.

The effect of the ingestion of antioxidants (*N*-acetylcysteine plus thioproline) on the main steps of the phagocytic process of peritoneal macrophages are shown in Table I. The supplementation of the diet with 0.1% of each of the two antioxidants increased the chemotaxis and ingestion capacity in the adult mice. No change was observed in adherence capacity, and intracellular superoxide anion production decreased in non-stimulated and increased in stimulated samples. The extracellular measurement of superoxide anion levels showed a decrease in both, non-stimulated and stimulated samples. As regards lymphocyte functions, the statistical analysis rendered no differences in adherence capacity, but chemotaxis improved not only in peritoneum, but also in the three organs studied (Table II). The analysis of the results of lymphoproliferation (Fig. 1) showed that the treatment with antioxidants increased this capacity in cells from axillary nodes, spleen and thymus. The NK activity (Fig. 2) was higher in the treated than in the control group. With respect to the results obtained in the old mice, the thiol ingestion did not influence the macrophage functions, but showed an increase on NK activity in cells from axillary nodes and thymus.

As regards the effect of ingestion of 0.3% of each antioxidant, in the adult animals, adherence underwent a significant increase, whereas chemotaxis and

ingestion capacities did not change. On the other hand, the superoxide anion production increased with the treatment, in the intracellular as well as in the extracellular compartment. Lymphocyte functions, such as chemotaxis and lymphoproliferation decreased, but NK of spleen increased significantly after a 0.3% ingestion of thiols. In the old mice, the most evident effect occurred in the ingestion capacity of macrophages, which increased while the other functions of these cells did not change. However, lymphoproliferation and NK activities experimented the main increase as compared to the control group. As regards the other functions, the only change was the significant increase in chemotaxis of cells from axillary nodes.

DISCUSSION

This study shows the beneficial effects of the ingestion of an antioxidant supplemented diet on the immune response, with resulting improvement in several functions of the most relevant immunocompetent cells, namely, macrophages, lymphocytes and cells with natural cytotoxicity. Although it is known that the immune cells need optimal levels of antioxidants for maintenance of their function,^[8] and that supplementation with antioxidants may be beneficial,^[6,7,22] the present work suggests that the requirements of antioxidants are different depending on the age of the animals. Thus, since a progressive oxidant/antioxidant imbalance is involved in the oxidative stress of aging, even under normal physiological conditions,^[8] the amount of antioxidant supplementation required may be higher for the aged than for the adult subjects. In fact, Chandra^[30] had already pointed out that the doses of vitamin E needed to improve immune function are greater in aged than in young subjects.

The migration directed to the antigen focus (chemotaxis), which is one of the first steps of the

TABLE I Changes in several functions of peritoneal macrophages caused by *N*-acetylcysteine and thioproline (0.1 or 0.3%, w/w) ingestion in cells from adult and old mice. The data are the mean \pm SD of eight values corresponding to eight animals, each value being the mean of duplicate assays. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to the corresponding control. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to the corresponding value in adults. NS, non-stimulated samples; S, stimulated samples

	Treatments					
	Adult mice			Old mice		
	Control	0.1%	0.3%	Control	0.1%	0.3%
Adherence (A.I.)	42 \pm 4	43 \pm 6	56 \pm 4**	63 \pm 8***	59 \pm 10	60 \pm 11
Chemotaxis (C.I.)	544 \pm 65	907 \pm 74***	602 \pm 103	131 \pm 29***	132 \pm 25	125 \pm 23
Phagocytosis (P.I.)	259 \pm 45	425 \pm 113***	212 \pm 49	277 \pm 57	289 \pm 66	410 \pm 81***
Superoxide anion production						
Intracellular NS	14 \pm 0.5	7 \pm 0.5**	23 \pm 3**	30 \pm 5***	33 \pm 6	38 \pm 7
Intracellular S	30 \pm 0.8	46 \pm 3***	34 \pm 2	46 \pm 4***	48 \pm 6	50 \pm 7
Extracellular NS	10 \pm 0.5	6 \pm 0.5*	18 \pm 5*	19 \pm 2**	17 \pm 3	20 \pm 2
Extracellular S	18 \pm 2	6 \pm 0.5***	27 \pm 3*	32 \pm 5***	34 \pm 5	26 \pm 4

TABLE II Changes in several functions of lymphocytes caused by N-acetylcysteine and thioproline (0.1 or 0.3%, w/w) ingestion in cells from adult and old mice. The data are the mean ± SD of eight values corresponding to eight animals, each value being the mean of duplicate assays. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 with respect to the corresponding control. **p < 0.01; ***p < 0.001 with respect to the corresponding value in adults

	Treatments					
	Adult mice			Old mice		
	Control	0.1%	0.3%	Control	0.1%	0.3%
Adherence (A.I.)	30 ± 5	36 ± 8	38 ± 4*	60 ± 5***	61 ± 4	58 ± 7
Chemotaxis (C.I.)						
Peritoneum	789 ± 74	1050 ± 121**	805 ± 112	413 ± 55***	425 ± 61	450 ± 60
Axillary nodes	1102 ± 92	1574 ± 338*	958 ± 85*	813 ± 81	1018 ± 168*	1281 ± 179***
Spleen	1352 ± 189	1755 ± 373*	655 ± 75***	923 ± 152**	983 ± 174	1033 ± 182
Thymus	2204 ± 280	3003 ± 557**	1436 ± 196**	1099 ± 182***	1120 ± 223	951 ± 153

immune response,^[31] was increased in both, macrophages and lymphocytes from adult mice after ingestion of 0.1% of NAC and TP. These observations are in agreement with the results of previous studies *in vivo*^[22,32] showing the immunostimulant action which allows immune cells to reach the infectious focus and to carry out the immune response. However, this dose of 0.1% failed to improve the chemotaxis of our old mice, which was significantly decreased. Previous reports have shown that in oxidative stress conditions such as endotoxic shock^[33] or in states with deficient levels of antioxidants,^[7] there is a lower chemotaxis. Senescence which shows an oxidative condition,^[14] is also accompanied by decreased chemotaxis,^[11] and in the

present study, the higher dose used, namely 0.3% of both thiolic antioxidants, was needed to improve significantly this function in the aged mice.

Adherence is a key function of immune cells, because in addition to allowing their migration towards inflammatory foci, an adequate adherence is necessary for the cells to reach the immunocompetent organs where the antigens are recognized.^[34] Adherence is a function which increases both in oxidative stress situations^[33] and in aging.^[6,11] This fact is also observed in the present research. Accordingly, recent work shows that free radicals can induce the expression of adhesion molecules.^[35] This function was increased by the 0.3% dose of antioxidants in adult mice, which agrees with

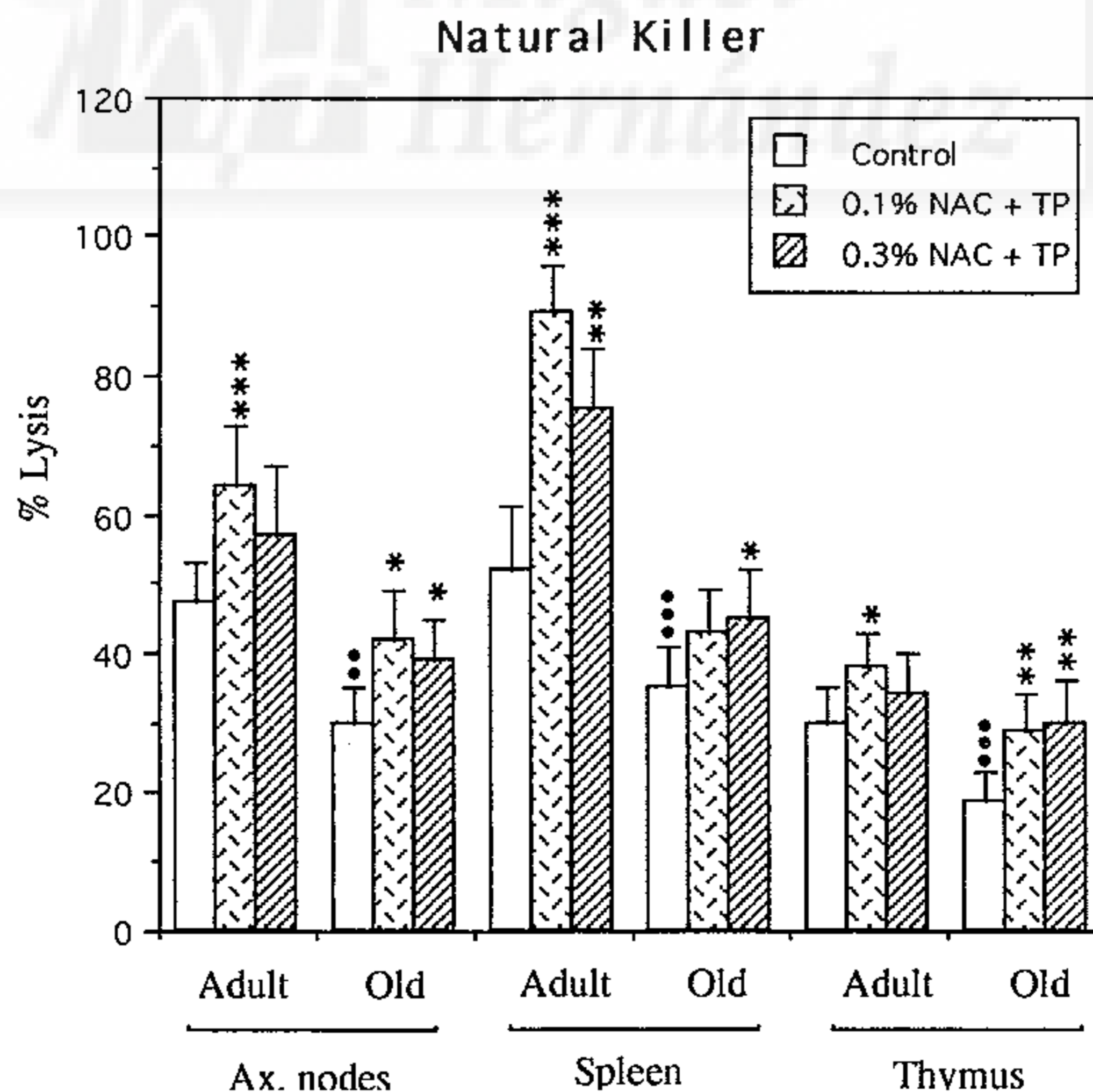


FIGURE 1 Proliferative response of axillary nodes, spleen and thymus lymphocytes to Concanavaline A mitogen of control mice and treated with a diet supplemented with 0.1 or 0.3% of NAC (N-acetylcysteine) plus TP (thioproline). The data are the mean ± SD of eight values, being each value the mean of duplicate assays. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 with respect to control. **p < 0.01; ***p < 0.001 with respect to control adult.

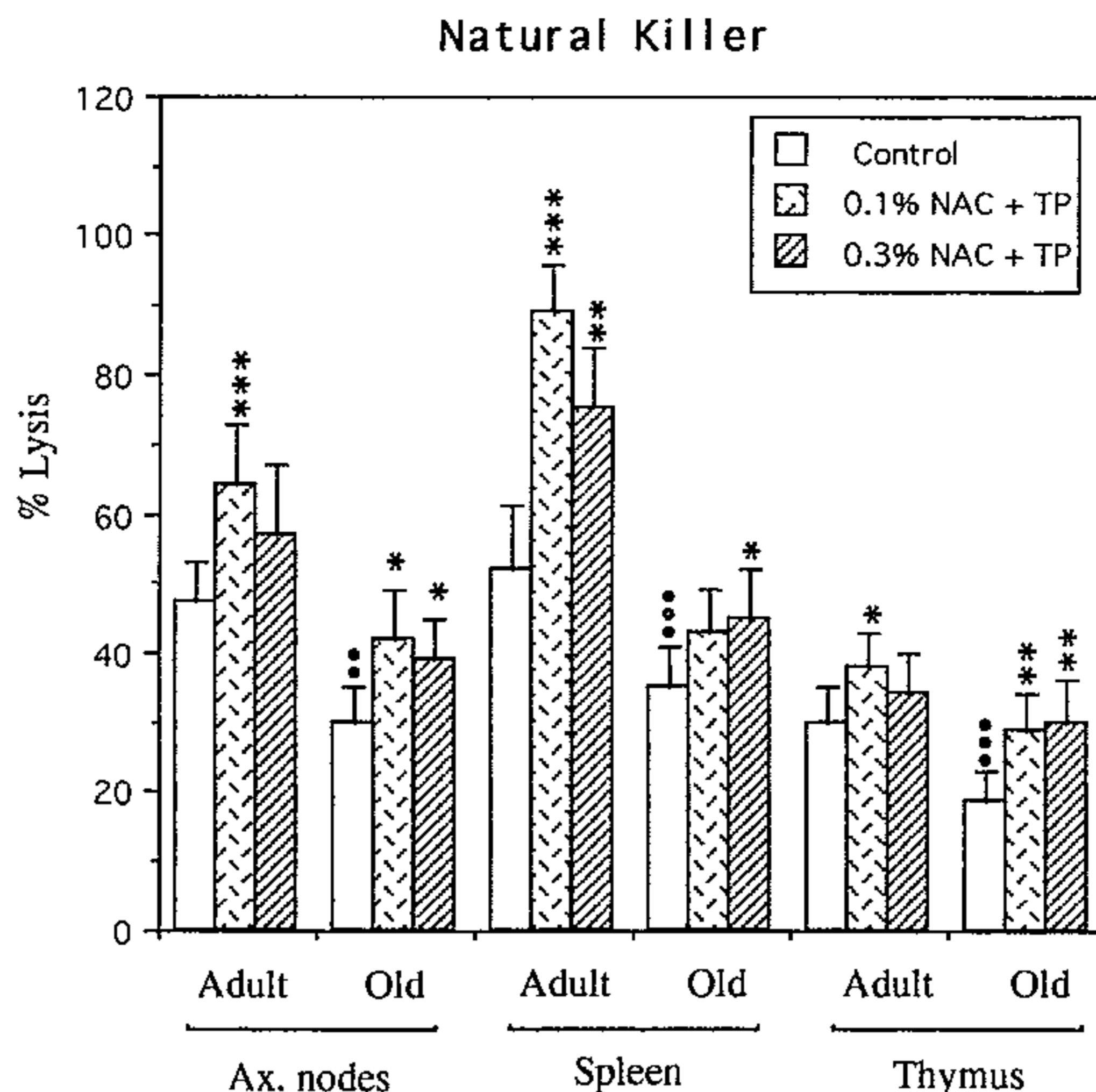


FIGURE 2 Percentage of natural killer (NK) activity of axillary nodes, spleen and thymus lymphocytes from control mice and treated with a diet supplemented with 0.1 or 0.3% of NAC (*N*-acetylcysteine) plus TP (thioprolin). The data are the mean \pm SD of eight values, being each value the mean of duplicate assays. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to control. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ with respect to control adult.

previous work showing that antioxidants, such as ascorbic acid^[23] and b-carotenes^[24] are prooxidants at high concentrations. However, in old animals the high dose of antioxidants did not show any effect.

Particle ingestion (phagocytosis) was significantly stimulated by 0.1% of the thiolic antioxidants in adult mice, as observed in previous studies by using this same supplementation.^[22] However, the high dose of 0.3% was not optimal for the adult but it was adequate for restoring the phagocytosis in old mice.

In the present experiments, the thiol compounds at 0.1% caused a decrease in the basal intracellular superoxide anion production in the adult mice. However, in the presence of a phagocytic stimulus there was an increase in that production, which may be considered a favorable response since it raises the microbicidal activity of phagocytes. By contrast, the extracellular production of superoxide, which may be harmful to the organism, was significantly depressed by the thiol compounds in non-stimulated as well as in stimulated samples. Thus, it appears that at the 0.1% concentration these antioxidants improve immune function by raising the cellular microbicidal activity and preventing the production of tissue-damaging oxidants. In these adult mice, at the 0.3% concentration, thiolic compounds increased the basal intracellular as well as extracellular superoxide production, which suggests that at this higher concentration these compounds had a prooxidant effect, thus increasing the formation of

free radicals instead of neutralizing them. This observation is in agreement with previous research showing the prooxidant action of high doses of antioxidants.^[5,23,24] Interestingly, in old animals, with a higher production of superoxide anion than adult mice, in agreement with previous work,^[11] the 0.3% dose of the thiolic compounds did not show any significant effect on the intracellular nor extracellular production of superoxide when administered to the aged mice. This suggests that a marked senescence related disturbance in their oxidant/antioxidant ratio renders the oxygen radical production of immune cells quite insensitive to the influence of the dietary administration of thiols.

The lymphoproliferative response, one of the most important and representative function of lymphocytes, is stimulated by administration of the thiolic antioxidants at 0.1% to the adult mice, which agrees with previous findings on the positive effects of antioxidants on mitogen induced lymphoproliferation.^[2,7,8,15,16] On the other hand, in the present study this function experimented a decrease following the 0.3% thiolic antioxidant administration, probably due to a prooxidant effect of the compound at this high concentration. One of the most important immunological age-related changes is the decrease in mitogen-induced lymphocyte proliferation,^[9] which probably results from senescent decrease in the level of reduced glutathione,^[36] which is needed for lymphocyte proliferation and activation.^[37]

According to our present data, the ingestion of the glutathione precursors, NAC and TP,^[19,20] at 0.1% of each could not restore the depressed lymphoproliferation of old mice, but the higher dose (0.3%) reversed the senescent decline in lymphoproliferation. Likewise, our previous work has shown that ingestion of 200 mg/day of vitamin E by aged human subjects improves their depressed lymphoproliferation,^[6] and similar results were found in aged women administered supplements of vitamin C and E for 16 weeks^[16] and in mice receiving thioproline.^[15]

There is senescent decline in the cytotoxic capacity of immune cells, specially of the NK activity,^[38] which plays a key role in immune surveillance against tumors, in addition to its important regulatory function.^[39] Therefore, it is important that, according to our present results, 0.1% thiol antioxidant supplementation of the diet stimulates the NK activity in both adult and aged mice, but in the aged the most marked improvement is found at the 0.3% dose. In conclusion, the dietary administration of NAC plus TP resulted in an improvement of the immune functions of mice, with the 0.1% dose being the most effective for the adult animals. On the other hand, probably because of their more severely impaired oxidant/antioxidant balance, the aged mice required a 0.3% in order to show optimal immune functions.

Acknowledgements

This work was supported by the FISs Grants Nos. 97/2078, 99/1264 and 99/0815.

References

- [1] Knight, J.A. (2000) "Review: free radicals, antioxidants, and the immune system", *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30, 145–158.
- [2] Meydani, S.N., Wu, D., Santos, M.S. and Hayek, M.G. (1995) "Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence", *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1462S–1476S.
- [3] Coquette, A., Vray, B. and Vanderpas, J. (1986) "Role of vitamin E in the protection of the resident macrophage against oxidative damage", *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 94, 529–534.
- [4] Del Río, M., Ruedas, G., Medina, S., Víctor, V.M. and De la Fuente, M. (1998) "Improvement by several antioxidants of macrophage function *in vitro*", *Life Sci.* 63, 871–881.
- [5] Correa, R., Del Río, M. and De la Fuente, M. (1999) "Improvement of murine immune functions *in vitro* by thioproline", *Immunopharmacology* 44, 281–291.
- [6] De la Fuente, M. and Víctor, V.M. (2000) "Anti-oxidants as modulators of immune function", *Immunol. Cell Biol.* 78, 49–54.
- [7] De la Fuente, M., Carazo, M., Correa, R. and Del Río, M. (2000) "Changes in macrophage and lymphocyte functions in guinea-pigs after different amounts of vitamin E ingestion", *Br. J. Nutr.* 84, 25–29.
- [8] McArthur, W.P. (1998) "Effect of aging on immunocompetent and inflammatory cells", *Periodontol.* 2000 16, 53–79.
- [9] Ginaldi, L., De Martinis, M., D'Ostilio, A., Marina, L., Loreto, M.F. and Quaglino, D. (1999) "The immune system in the elderly II. Specific cellular immunity", *Immunol. Res.* 20, 109–115.
- [10] Pawelec, G., Effros, C., Caruso, C., Remarque, E., Barnett, Y. and Solana, R. (1999) "T cells and aging", *Frontiers Biosci.* 4, 216–269.
- [11] Ortega, E., García, J.J. and De la Fuente, M. (2000) "Ageing modulates some aspects of the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes", *Exp. Physiol.* 85.5, 519–525.
- [12] Wayne, S.J., Rhyne, R.L., Garry, P.J. and Goodwin, J.S. (1990) "Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60", *J. Gerontol.* 45, M45–M48.
- [13] Meydani, M. (1999) "Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction", *Mech. Ageing Dev.* 111, 123–132.
- [14] Sastre, J., Pallardó, F.V., García de la Asunción, J. and Viña, J. (2000) "Mitochondria, oxidative stress and aging", *Free Radic. Res.* 32, 189–198.
- [15] De la Fuente, M., Ferrández, M.D., Del Río, M., Burgos, M.S. and Miquel, J. (1998) "Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline", *Mech. Ageing Dev.* 104, 213–225.
- [16] De la Fuente, M., Ferrández, M.D., Burgos, M.S., Soler, A., Prieto, A. and Miquel, J. (1998) "Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E", *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76, 373–380.
- [17] Meydani, M. (2000) "Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly", *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1665S–1668S.
- [18] Saez, G.T., Bannister, W.H. and Bannister, J.V. (1990) "Free radicals and thiol compounds—the role of glutathione against free radical toxicity", In: Viña, J., ed, *Glutathione: Metabolism and Physiological Function* (CRC press, Boca Raton), pp 237–254.
- [19] Weber, H.W., Fleming, J.F. and Miquel, J. (1982) "Thiazolidine-4-carboxylic acid, a physiologic sulfhydryl antioxidant with potential value in geriatric medicine", *Arch. Gerontol. Geriatr.* 1, 299–310.
- [20] Miquel, J. and Weber, H.W. (1990) "Aging and increased oxidation of the sulfur pool", In: Viña, J., ed, *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions* (CRC press, Boca Raton), pp 187–192.
- [21] Pieri, C., Moroni, F. and Recchioni, R. (1992) "Glutathione influences the proliferation well as the extent of mitochondrial activation in rat splenocytes", *Cell. Immunol.* 145, 210–217.
- [22] Blanco, B., Ferrández, M.D., Correa, R., Del Río, M., Guaza, C. and De la Fuente, M. (1999) "Changes in several function of murine peritoneal macrophages by N-acetylcysteine and thioproline ingestion. Comparative effect between two strains of mice", *BioFactors* 10, 179–185.
- [23] Otero, P., Viana, M., Herrera, E. and Bonet, B. (1997) "Antioxidant and prooxidant effects of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and flavonoids on LDL submitted to different degrees of oxidation", *Free Radic. Res.* 27, 619–626.
- [24] Bowen, H.T. and Omaye, S.T. (1998) "Oxidative changes associated with beta-carotene and alpha-tocopherol enrichment of human low-density lipoproteins", *J. Am. Coll. Nutr.* 17, 171–179.
- [25] De la Fuente, M. (1985) "Changes in the macrophage function with aging", *Comp. Biochem. Physiol.* 81A, 935–938.
- [26] De la Fuente, M., Miñano, M., Víctor, V.M., Del Río, M., Ferrández, M.D. and Miquel, J. (1998) "Relation between exploratory activity and immune function in Aged mice: a preliminary study", *Mech. Ageing Dev.* 102, 263–277.
- [27] Bagasra, O., Howedy, A. and Kajdacsy-Balla, A. (1988) "Macrophage function in chronic experimental alcoholism. Modulation of surface receptors and phagocytosis", *Immunology* 65, 405–409.
- [28] Medina, S., Del Río, M., Hernanz, A. and De la Fuente, M. (2000) "Age-related changes in the neuropeptide Y effects on murine lymphoproliferation and interleukine-2 production", *Peptides* 21, 1403–1409.
- [29] De la Fuente, M., Ferrández, D., Muñoz, F., De Juan, E. and Miquel, J. (1993) "Stimulation by the antioxidant thioproline

- of the lymphocyte functions of old mice", *Mech. Ageing Dev.* **104**, 213–225.
- [30] Chandra, R.K. (1997) "Graying of the immune system. Can nutrient supplements improve immunity in the elderly?", *JAMA* **277**, 1398–1399.
- [31] Doherty, D.E., Haslett, C., Tonnesen, M.G. and Henson, P.M. (1987) "Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium", *J. Immunol.* **138**, 1762–1771.
- [32] Correa, R., Blanco, B., Del Río, M., Víctor, V., Guayerbas, N., Medina, S. and De la Fuente, M. (1999) "Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature aging", *BioFactors* **10**, 195–200.
- [33] Víctor, V.M., Miñano, M., Guayerbas, N., Del Río, M., Medina, S. and De la Fuente, M. (1998) "Effects of endotoxic shock in several functions of murine peritoneal macrophage", *Mol. Cell. Biochem.* **189**, 25–31.
- [34] Mackay, C.R. and Imhof, B.A. (1993) "Cell adhesion in the immune system", *Immunol. Today* **14**, 99–102.
- [35] Cheng, J.J., Wung, B.S., Chao, Y.J. and Wang, D.L. (1998) "Cyclic strain-induced reactive oxygen species involved in ICAM-1 gene induction in endothelial cells", *Hypertension* **31**, 125–130.
- [36] Stohs, S.J., El-Rashidy, F.H., Lawson, T., Kobayashi, R.H., Wulf, B.J. and Potter, J.F. (1984) "Changes in glutathione and glutathione metabolizing enzymes in human erythrocytes and lymphocytes as a function of age of donor", *Age* **7**, 3–7.
- [37] Franklin, R.A., Li, Y.M., Arkins, S. and Kelley, K.W. (1990) "Glutathione arguments *in vitro* proliferative responses of lymphocytes to concanavalin to a greater degree in old than in young rats", *J. Nutr.* **120**, 1710–1717.
- [38] Ferrández, M.D., Correa, R., Del Río, M. and De la Fuente, M. (1999) "Effects *in vitro* of several antioxidants on the natural killer function of aging mice", *Exp. Gerontol.* **34**, 675–685.
- [39] O'Shea, S.R. and Ortaldo, F. (1992) The biology of natural killer cells insights into the molecular basis of function *The Natural Killer Cell*, (IRL Press, Oxford).



Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline

Mónica De la Fuente ^{a,*}, María Dolores Ferrández ^a,
Mónica Del Río ^a, María Sol Burgos ^a, Jaime Miquel ^b

^a *Department of Animal Physiology, Faculty of Biological Science, Complutense University, 28040 Madrid, Spain*

^b *Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, University of Alicante, 03080 Alicante, Spain*

Received 14 March 1998; received in revised form 8 June 1998; accepted 10 June 1998

Abstract

Previous research has shown that supplementation of the diet with thioproline (thiazolidine-4-carboxylic acid), an intracellular sulfhydryl antioxidant and free radical scavenger, increases mouse life span and stimulates the immune system. In the present study aged Swiss mice (20 month old) fed thioproline (0.07%,w/w) for 5 weeks were used. Twelve month and 20 month old mice fed standard diet were used as controls. The lymphoproliferative response to the mitogen Concanavalin A (Con A) and the mobility of lymphocytes, both spontaneous and directed to a chemoattractant gradient (chemotaxis), as well as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and natural killer (NK) activity of leukocytes, were measured in cells from spleen and thymus. All of the above functions showed a significant decrease in aged (20 months) in comparison to adult mice (12 months). In aged animals, the ingestion of thioproline stimulated significantly the functions studied. Moreover, the age-related stress, revealed by the high corticosterone levels, was significantly decreased in animals fed this antioxidant. These data suggest that thioproline enhances immune response in the aged. © 1998 Published by Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Thioproline; Aging; Mice; Lymphocytes; NK; ADCC; Proliferation; Mobility

* Corresponding author. Tel: + 34 91 3944989; fax: + 34 91 3944935.

1. Introduction

Aging has been shown to be accompanied by changes in some aspects of immune function in human subjects as well as in other mammalian species (Solana et al., 1991; Miller, 1996). Moreover, Walford (1969) proposed that immune system dysfunction is one of the fundamental biological changes associated with aging. The immunological decline occurs mainly in T cell-dependent immune functions (Hirokawa et al., 1994; Globerson, 1995; Pawelec, 1995), and the T lymphocytes have been proposed to be the best experimental model to investigate immune cell vulnerability to ageing (Globerson, 1995). The age-related immunological decline is manifested mainly by an impairment in the lymphoproliferative response to mitogens (Solana et al., 1991), which is one of the principal functions of lymphocytes. An adequate lymphoproliferation requires that these immune cells be able to migrate to the suitable anatomical sites. Thus, the initiation of the immune response depends critically on the mobility of lymphocytes (Janeway and Goldstein, 1991). It is also known that the cytotoxic capacity of immune cells, especially natural killer (NK) activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), play a role in immune surveillance against neoplastic growth, in addition to having an important regulatory function (O'Shea and Ortaldo, 1992). There are contradictory reports on age-related changes in cytotoxic activity, especially as regards NK function that has been reported to increase (Krishnaraj and Blandorf, 1988) or to remain unchanged (Ligthart et al., 1989) with age. Nevertheless, most data show a senescent decrease in NK function, mainly in murine cells (Bocchieri et al., 1988; Hirokawa et al., 1994) and in ADCC (Mysliwska et al., 1985).

The above mentioned immune changes may be linked to an age related decline in antioxidant competence and, more specifically, to a progressive oxidation of glutathione and other thiolic compounds in the tissues of vertebrates and invertebrates (Miquel and Weber, 1990). In our opinion, this justifies the attempts to modulate the rate of aging by dietary administration of thiolic antioxidants that have been shown to prevent an excessive oxidation of the sulfur pool (Kohen et al., 1997), and slow down senescent change, in particular as regards immune-decline (Franklin et al., 1990; Meydani et al., 1995). Thioproline (thiazolidine-4-carboxylic acid), a cyclic sulfur amino acid similar in structure to proline (Schubert, 1936) seems advantageous because it is a natural liver metabolite (Carvallini et al., 1956), that acts as an antioxidant and free radical scavenger (Weber et al., 1982), protecting cellular membranes and mitochondrial DNA against the damaging action of free radicals and lipid peroxides. These beneficial effects, in addition to the relatively low toxicity of thioproline, recommends the use of this antioxidant in pharmaceutical preparations for the treatment of various liver diseases and gastrointestinal disorders in which oxyradicals and thiol deficiency play a pathogenetic role (Weber et al., 1982). Further, according to our previous work (De la Fuente et al., 1993a), dietary administration of thioproline to aged mice (0.07%, w/w) for 36 weeks stimulates two functions of lymphocytes, namely lymphoproliferation and mobility. In our opinion, this find-

ing, in addition to the above research from other laboratories, justifies the present study of the effects of a short-term treatment with thioproline on the aging process of mouse lymphocytes. The favorable effect of thiol antioxidants on immune cell aging could have important implications for preventive geriatrics in view of the central role that the immune system plays in the preservation of homeostasis and health.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Thioprolone (thiazolidine-4-carboxylic acid) and f-met-leu-phe were purchased from Sigma (St Louis, MO), methanol and ethanol from Merck (Darmstadt, Germany), transparent filters of $3\mu\text{m}$ of pore diameter from Millipore (Madrid, Spain), Diff-Quick pack for filter staining from Dade Grifols (Düdingen, Switzerland), Concanavalin A (ConA) from Flow Laboratories (McLean, VA), RPMI 1640 cell culture medium with HEPES buffer and L-glutamine, fetal calf serum and gentamicin from Gibco (Paysley, Scotland, UK), Urograph-Ficoll lymphocyte separation medium from Schering (Madrid, Spain) for Urograph and Sigma for Ficoll, plates of 96 wells from Sterilin (Teddington Middlesex, UK), and ^3H -thymidine from CEA (Gif-sur-Yvette, France).

2.2. Culture medium and incubation conditions

The culture medium used in the lymphoproliferative assays was composed of RPMI, containing gentamicin (1%) and fetal calf serum (previously heat inactivated) to a final concentration of 10%. All incubations were performed at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 .

2.3. Animals and treatment

Female Swiss mice (*Mus musculus*) (Iffa Credo, Saint Germain sur L'Arbresse, France), which were 7 week old on arrival to our laboratory, were used. They were randomly divided in groups of ten, and each group was housed in polyurethane boxes and maintained at a constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) in sterile conditions inside an aseptic air negative-pressure environmental cabinet (Flufrance, Cachan, France) on 12 h light/dark cycle and fed pellets of Sander Mus (A.04 diet from Panlab L.S. Barcelona, Spain) and water ad libitum. The mice were examined, and only those without macroscopic signs of malignancy or other diseases were used in the experiments. At 76 ± 2 weeks of age, the mice were divided into control and antioxidant supplemented populations, and the cages containing the last were supplied with A.04 pellets containing 0.07% (w/w) of thioproline. One cage with eight control mice and other with eight thioproline treated mice were assigned to the present immune aging study. At 81 ± 2 weeks of age and five after initiation of

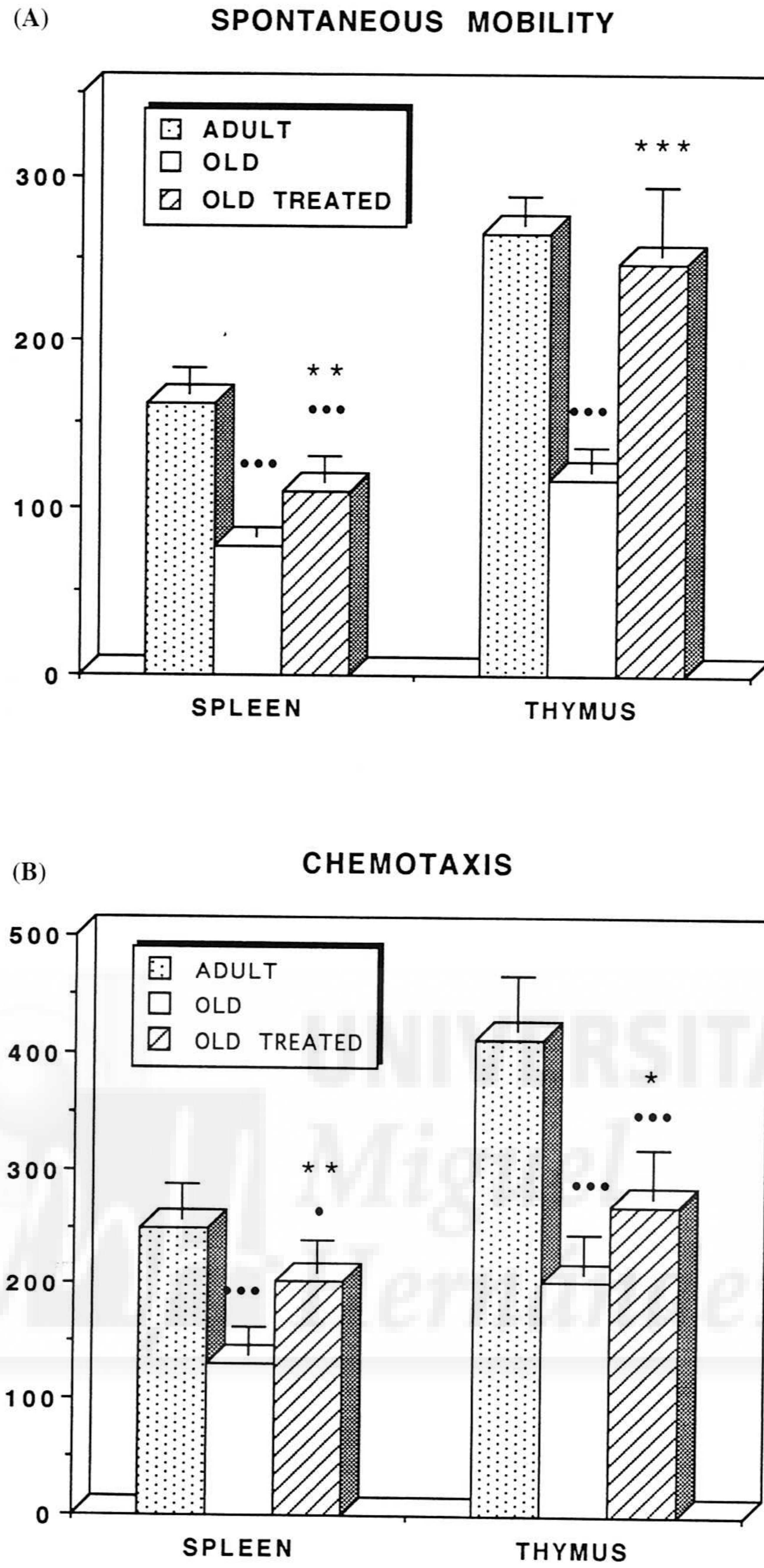


Fig. 1. Spontaneous mobility (upper graphic) and chemotaxis (bottom graphic) indexes of spleen and thymus lymphocytes from adult (12 month old) and aged (20 month old) control mice and from aged mice treated with thioprolone for 5 weeks. The data are the mean \pm S.D. of 8 values corresponding to eight animals, being each value the mean of duplicate assays. $\cdot P < 0.05$; $\cdot\cdot\cdot P < 0.001$ with respect to adult controls. $* P < 0.05$; $** P < 0.01$; $*** P < 0.001$ with respect to aged controls.

Table 1
Stimulation index (%) in response to Concanavalin A (1µg/ml) of spleen and thymus lymphocytes from old mice treated with thioproline during 5 weeks

	Spleen	Thymus
Adult mice	853 ± 54	648 ± 66
<i>P</i>	<0.001	<0.001
Old mice	184 ± 30	193 ± 26
<i>P</i>	<0.01	<0.05
Treated old mice	224 ± 39*	237 ± 37*

The results are the mean ± SD of 8 values corresponding to eight animals, being each value the mean of triplicate assays.

* *P* < 0.001 with respect to adult mice. The data have been calculated giving the 100 value to the cpm obtained on basal samples: incubated without the mitogen, i.e: 806 ± 157 and 429 ± 80 in adult mice (12 month old); 600 ± 137 and 315 ± 77 in the controls; and 754 ± 154 and 367 ± 71 in treated aged mice (20 month old), respectively. For each group the first data correspond to spleen and the second to thymus.

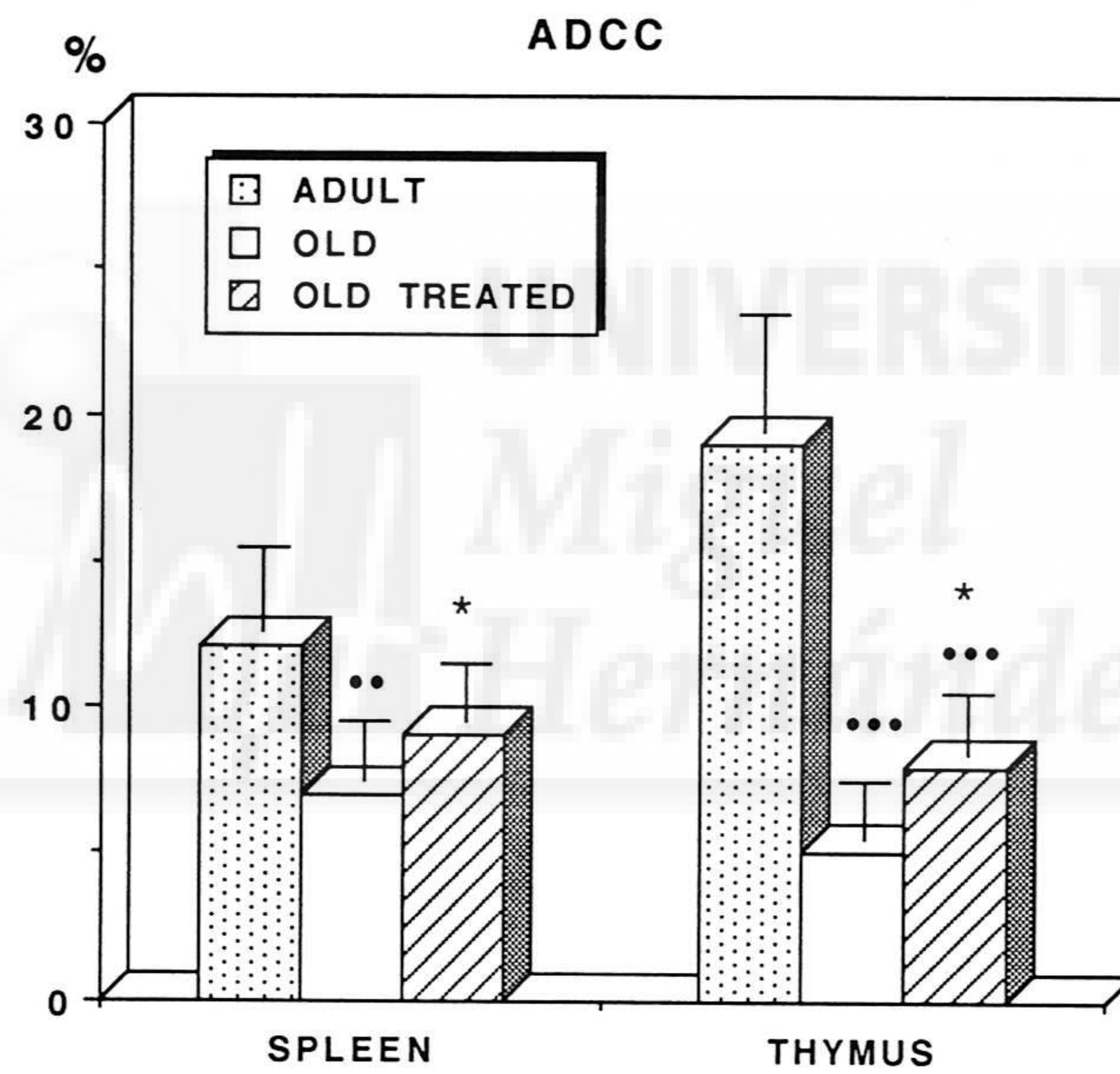


Fig. 2. Percentage of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of lymphocytes from spleen and thymus of adult (12 month old) and aged (20 month old) control mice and of aged mice treated with thioproline for 5 weeks. The data are the mean ± S.D. of eight animals, being each value the mean of duplicate assays. • • *P* < 0.01; • • • *P* < 0.001 with respect to adult controls. * *P* < 0.05 with respect to old controls.

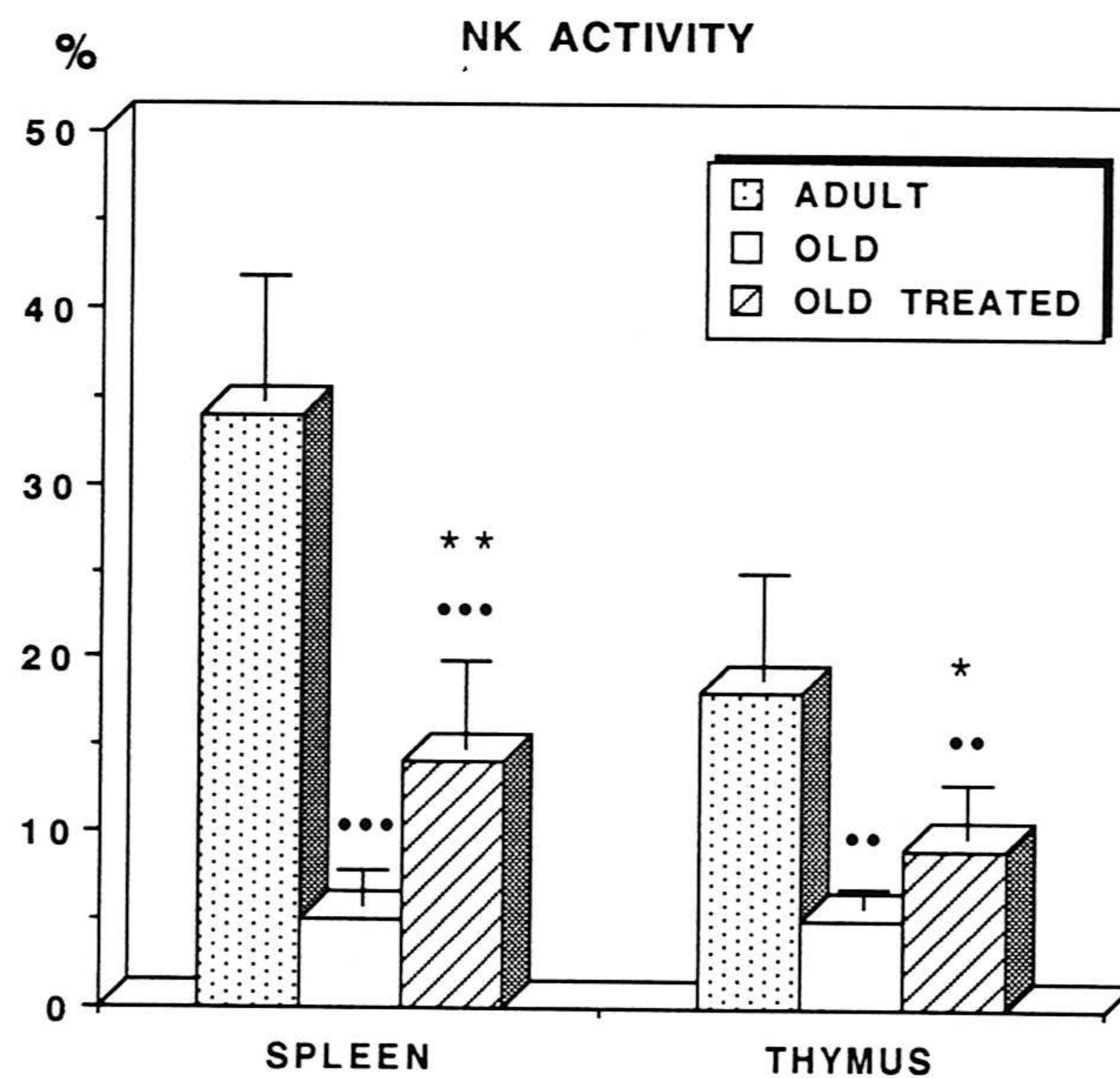


Fig. 3. Percentage of natural killer (NK) activity of lymphocytes from spleen and thymus of adult (12 month old) and aged (20 month old) control mice and of old mice treated with thioprolone for 5 weeks. The data are the mean \pm S.D. of eight animals, being each value the mean of duplicate assays. $\cdot\cdot P < 0.01$; $\cdot\cdot\cdot P < 0.001$ with respect to adult controls. $* P < 0.05$; $** P < 0.01$ with respect to old controls.

the treatment, the animals were sacrificed by cervical dislocation. An additional cage with eight control animals 52 ± 1 weeks of age was used as control adult population.

2.4. Collection of leukocytes

Immune cells were obtained from spleen and thymus of mice. These organs were removed aseptically, freed of fat, minced with scissors and gently pressed through a mesh screen (Sigma) to obtain a cell suspension. The cellular suspension of spleen was centrifuged in a gradient of Urograph-Ficoll with a density of 1.070. The halo was resuspended in phosphate buffered saline (PBS) solution and washed three times. The cell suspensions of thymus were also washed three times. Each one of the cell suspensions obtained was separated in three aliquots for the mobility study, proliferation and cytotoxic assays respectively.

2.5. Mobility assays

Spontaneous mobility and directed mobility (chemotaxis) were determined according to a modification of the original technique described by Boyden (De la Fuente et al., 1993a), which consists basically in the use of chambers with two

compartments separated by a filter with a pore diameter of 3 μm . The lymphocyte suspension (0.3 ml, 106 cells/ml) was deposited in the upper compartment of the Boyden chambers. F-met-leu-phe (a positive chemotactic peptide in vitro), at 10⁻⁸M, was placed in the lower compartment in order to determine chemotaxis. For spontaneous mobility, a medium free of chemotactic factor was used. The chambers were incubated for 3 h and after this time the filters were fixed, stained and both the chemotaxis and mobility indexes were calculated. These indexes represent the total number of lymphocytes counted in the lower face of the filters.

2.6. Proliferation assay

A previously described method was used as in De la Fuente et al. (1993a). Briefly, the lymphocytes were adjusted to 106 cells/ml of RPMI medium. Aliquots of 200 μl were dispensed in plates of 96 wells and 20 μl of Con A (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or 20 μl of PBS (controls) were added. After 48 h of incubation, 0.5 μCi ³H-thymidine was added to each well, followed by 24 h of incubation. The cells were harvested in a semiautomatic microharvester and thymidine uptake was measured in a β counter (LKB) for one minute. The results were expressed as the percentage of stimulation index (³H-thymidine uptake, cpm, in presence of mitogen/cpm of basal, without mitogen, uptake) \times 100

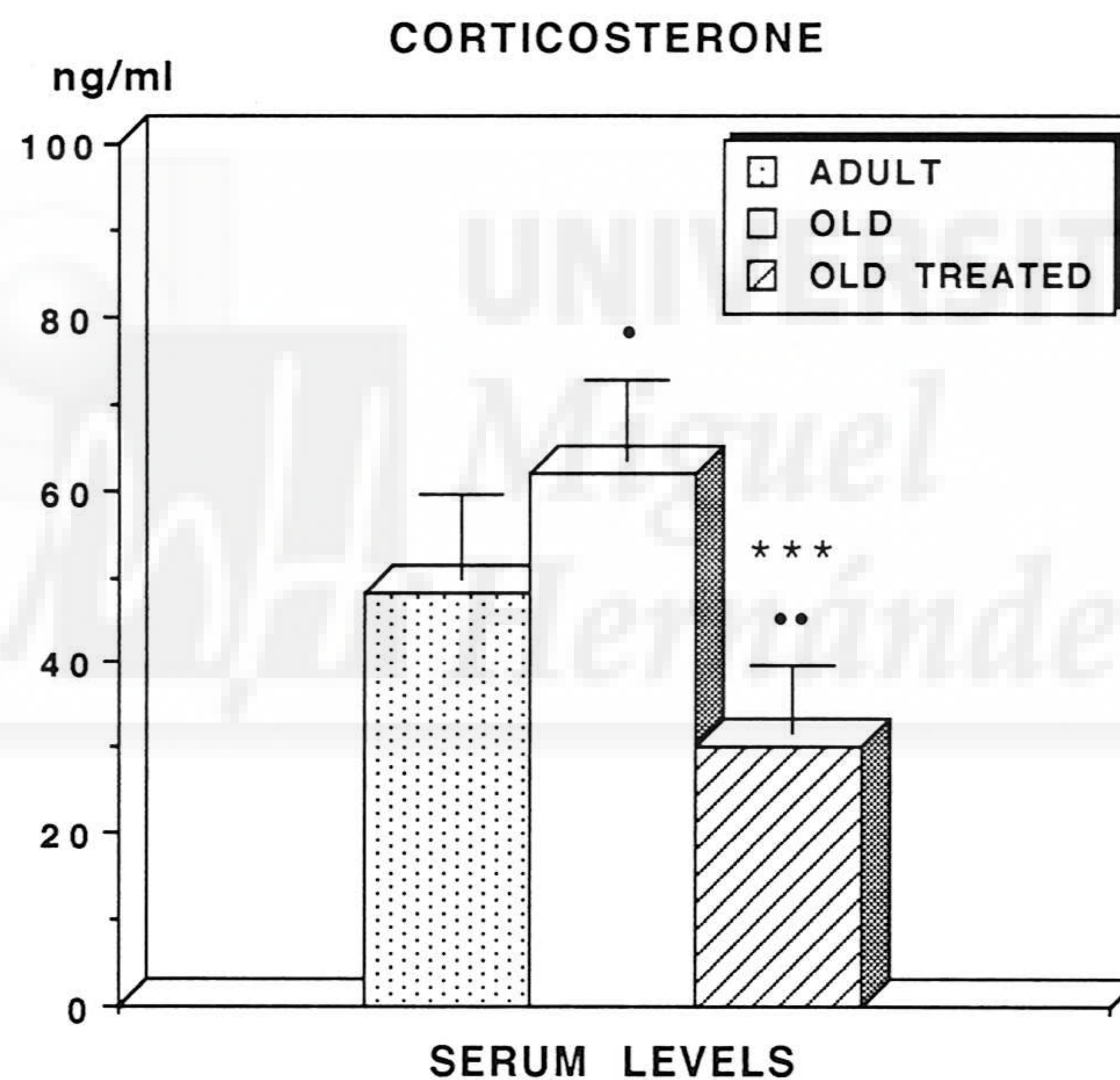


Fig. 4. Serum corticosterone levels in adult (12 month old) and old (20 month old) controls and in old mice treated with thioprolone for 5 weeks. The data are the mean \pm S.D. of eight animals, being each value the mean of duplicate assays. • $P < 0.05$; •• $P < 0.01$ with respect to adult controls. *** $P < 0.001$ with respect to old controls.

2.7. ADCC and NK assays

Target cells were K-562, a human myeloid erithroleukemia cell line, in the ADCC assay, and YAC-1, a murine lymphoma cell line, in the NK assay. These cells were maintained in complete medium (RPMI 1640 plus 10% FCS). According to previously described methods by Ferrández and De la Fuente (1996), both kinds of target cells were labelled separately with ^{51}Cr ($100 \mu\text{Ci}/5 \times 10^6$ cells, New England Nuclear, Boston, MA) for 90–120 min at 37°C and adjusted to $2.5 \times 10^4/\text{ml}$ medium. In the ADCC assay, aliquots of tumoral cell suspensions were previously incubated for 15 min with an anti-CD15 monoclonal antibody (DAKO, Dakopatts, Denmark) at the dilution of 1:125. Effector cells (leukocytes from spleen and thymus adjusted to 2.5×10^6 cells/ml medium) were added at the following optimum effector cells/target cells ratios: 100/1 for K-562 cells and 50/1 for YAC-1 cells, as found in these assays and in the previous studies indicated above. U-bottomed microtiter plates (Costar) with the three components of the ADCC assay (target cells, antibody and effector cells), or with only the two components of the NK assay (target and effector cells) were incubated for 4 h and then centrifuged for 10 min at $400 \times g$. One Hundred Microliters ($100 \mu\text{l}$) of supernatants were counted in triplicate in a gamma-counter (LKB, Uppsala, Sweden). The percentage of lysis was calculated as follows: $\% \text{ lysis} = (E - S) \times 100 / (T - E)$, where E , mean of experimental cpm released in the presence of effector cells; S , mean of cpm spontaneously released by target cells incubated with medium alone; and T , mean of total cpm released after incubating target cells with 1:100 dilution of Triton X-100 (Sigma).

2.8. Serum corticosterone assay

Serum corticosterone levels were measured using a commercial radioimmunoassay kit (Immunodiagnostic Systems, IDS, Boldon, UK) with a sensibility of 0.39 ng/ml.

2.9. Statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm S.D. of eight values corresponding to eight animals, being each value the mean of duplicate or triplicate assays. In the statistical study, the ANOVA and Scheffe F -tests were used for the comparison of parametric samples. The normality of the samples was confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test.

3. Results

As indicated in Fig. 1, the spontaneous mobility (Fig. 1A) and the chemotaxis (Fig. 1B) of lymphocytes decreased in old mice, showing values significantly lower ($P < 0.001$) than those of adult mice in the cells of the two immunocompetent organs studied (spleen and thymus). On the other hand, aged mice fed thioprolin

during 5 weeks showed mobility indexes significantly higher than those found in old control mice, ($P < 0.01$ in spleen and $P < 0.001$ or $P < 0.05$ in thymus for spontaneous mobility and chemotaxis respectively), and similar to adult control mice in the case of spontaneous mobility in the thymus.

Another important and often investigated property of lymphocytes is the lymphoproliferative response to antigens or mitogens. This function, which has been widely studied in old animals, is known to decrease with age. Table 1 shows the stimulation index ($\times 100$) found in lymphocytes from spleen and thymus in response to a T lymphocyte mitogen concentration of Con A ($1 \mu\text{g/ml}$). In the two organs a significant decrease ($P < 0.001$) with aging in the proliferative response was found. In the lymphocytes from old mice fed thioprolone the percentage of proliferation was significantly higher ($P < 0.01$ in spleen and $P < 0.05$ in thymus) than in the organs of old control mice. However, the values from old mice fed thioprolone were lower than those from adult mice ($P < 0.001$).

The results for the percentage of ADCC are shown in Fig. 2. In a way similar to the above effects on the functions of leukocytes, the percentage of ADCC in spleen and thymus from old mice was significantly less ($P < 0.01$ in spleen and $P < 0.001$ in thymus) than that found in adult animals. When mice were fed thioprolone, these percentages were significantly increased ($P < 0.05$) in relation to the old control values.

Fig. 3 shows the results obtained for NK activity. The percentage of lysis was significantly decreased ($P < 0.001$ in spleen and $P < 0.01$ in thymus) in the leukocytes of both organs from aged animals compared to that of adult controls. Animals supplemented with thioprolone had higher percentages ($P < 0.01$ in spleen and $P < 0.05$ in thymus) than old mice fed control diet, although they did not raise to the adult values.

Serum corticosterone values (Fig. 4) were higher in aged animals ($P < 0.05$) compared to adult mice. Thioprolone-supplemented mice showed lower serum corticosterone levels than old ($P < 0.001$) and adult control mice ($P < 0.01$).

4. Discussion

In vitro studies of the effects of age on cell-mediated immunity have mainly focused on the response of T lymphocytes to mitogenic stimuli. The decrease in mitogen-induced lymphocyte proliferation in aged animals shown here is in agreement with our previous work (Solana et al., 1991; De la Fuente et al., 1992) and that of others (Verity et al., 1983; Song et al., 1993). The observed decrease in the in vitro response of T cells agrees with the lower responses in vivo, and it appears to be due to the fact that fewer T cells are activated in the aged individuals in response to mitogens, due to accumulation of memory T cells with age (Pawelec, 1995; Lohmiller et al., 1996). This senescent disturbance is linked to several defects or changes in T cell properties such as expression of surface receptors and intracellular mechanisms (Lustyik et al., 1990; Song et al., 1993; Lohmiller et al., 1996). Because the cytoplasmic membrane plays a key role in the early events of

signal transduction after mitogenic stimulation, changes in both membrane properties and signal transduction could be an important factor in the diminished T cell response to mitogens. In fact, membrane microviscosity, which is increased in lymphocytes from old donors compared to young adults, may affect the proliferative response of these cells contributing to the lowered immune responsiveness of the elderly (Lustyik et al., 1990).

The migration ability is one important property of lymphocytes, crucial for their accumulation at sites of injury or inflammation. We have reported an age related decrease in the mobility response of lymphocytes, both spontaneous and directed or chemotaxis (De la Fuente et al., 1993a). The anti-tumor activity of NK cells or ADCC has been clearly established. An age-associated decline in NK activity has been found by many investigators, especially in rodents (Bocchieri et al., 1988; Hirokawa et al., 1994). Since there is an association between neoplastic disease and advancing age, an impaired NK activity could contribute to those findings. The published work on age-related changes in murine adrenocortical function presents contradictory data. Thus, some authors maintain that the basal level of plasma corticosterone does not change with age (Sonntag et al., 1987) while others report an age-related increase of this hormone (Sapolsky, 1992). On the other hand, there is a growing body of evidence on the interactions between the immune and neuroendocrine systems. Corticosterone, the principal glucocorticoid released in rodents, was one of the first neuroendocrine components implicated in the immunoregulation. Although there are contradictory results about the role of corticosterone in the immune functions, this hormone is usually considered to induce immunosuppression (Madden and Felten, 1995). In the present work we have found a relation between the increased levels of corticosterone found in old animals and their decreased immune functions. These results are in agreement with the finding that lymphoid and NK activity are decreased by administration of corticosterone (Callewaert et al., 1991).

One of the most important biological effects of age is an increase in the rate of free radical formation, accompanied by oxidative damage to cellular structure and function. Cell membrane polyunsaturated fatty acids are primary targets for the injurious effects of free radicals and, since immune cells have a high content of these lipids, they are especially vulnerable to oxygen stress. An additional pathogenic mechanism of age-related immune dysfunction may be the senescent decline in antioxidant defenses, since these exert a considerable influence on immune response (Meydani et al., 1995) and may even increase life span owing to their modulation of that response (Harman, 1982).

It is very interesting that usually, aging results in a decrease in the level of glutathione (GSH) in cells, including lymphocytes (Stohs et al., 1984). This may contribute to immune depression, since GSH is required for T lymphocyte proliferation and activation (Franklin et al., 1990). Moreover, diet supplementation with 0.5% GSH prevents the age-associated decline in the immune responsiveness of adult and aged C57BL/6Nia male mice (Furukawa et al., 1990).

In agreement with the above, our present data show an immune-stimulating effect of thioproline, the mechanisms of which have not been elucidated. The

response of the lymphocyte GSH to GSSG ratio to mouse treatment with thiopropine was not determined. However, it is reasonable to assume that the treatment increases that balance, in view of previous studies showing a replenishment of the glutathione pool in cells maintained in medium supplemented with that thiol (Castell et al., 1990). As previously discussed, this will preserve the sulfhydryl enzymes, which are very sensitive to oxidative inactivation. Further, the raised GSH levels may result in a more efficient mitochondrial protection against senescence-causing oxygen stress. As pointed out by Miquel (1991), cell aging is probably accompanied by peroxidative mitochondrial disorganization and, according to Verity et al. (1983), mitochondrial bioenergetic damage may play a role in immunosenescence. These views are supported by the finding of changes in the fine structure and transmembrane potential (Beregy et al., 1991) in lymphocyte mitochondria of aged humans and mice. Since thiol groups are involved in the intramitochondrial detoxification of oxy-radicals and lipid peroxides (Miquel and Weber, 1990), the immunoprotective action of thiopropine may be related to a favorable effect of this compound on mitochondrial homeostasis. Accordingly, we have observed a good preservation of mitochondrial structure in lymphocyte cultures from old mice in medium supplemented with GSH and thiopropine (unpublished observation). Surprisingly, although in the T-lymphocytes from aged mice a lower GSH content has been found, this cell population shows more resistance to oxygen stress in comparison to T-lymphocytes from young mice (Lohmiller et al., 1996). This finding suggests that thiols may stimulate immune function through mechanisms unrelated to their free radical detoxification. One of these may be the changes in the redox potential needed for initiation and progression of lymphocyte signalling (Suthanthiran et al., 1990).

Since a dysfunction of the immune system has been proposed to contribute significantly to morbidity and mortality in the elderly (Pawelec, 1995), the finding that administration of thiopropine to mice during only 5 weeks improves several immune functions recommends this compound for future clinical investigation of the potential of antioxidants to delay and/or reverse age-related immune decline.

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to M. Carazo and R. Correa for their technical support and to Dr Angel Hernanz for his valuable advice during the realization of this study. This work was supported by the CAM and by FISs grants no. 97/ 2078, 95/ 1623, and 94/1348 and by a grant from the DANONE Institute.

References

- Beregy, E., Regius, O., Rajczy, K., 1991. The lymphocytes in elderly individuals and centenarians. *Arch. Gerontol. Geriatr. suppl.* 2, 515–518.

- Bocchieri, M.H., Sabol, J.L., O'Neill, D.K., 1988. Age-related decline in cell-mediated immunity in C58 leukemic mouse strain. *Gerontology* 34, 221–230.
- Callewaert, D.M., Moudgil, V.T., Radcliff, G., Waite, R., 1991. Hormone specific regulation of natural killer cells by cortisol: Direct inactivation of the cytotoxic function of cloned human natural killer cells without an effect on cellular proliferation. *FEBS Lett.* 1, 108–110.
- Carvallini, D., De Marco, C., Mondovi, B., Trasanti, F., 1956. Studies of the metabolism of thiazolidine carboxylic acid by rat liver homogenate. *Biochem. Biophys. Acta* 22, 558–564.
- Castell, J.V., Larrauri, A., Donato, T., Gomez-Lechon, M.J., 1990. Glutathione levels in human hepatocytes exposed to paracetamol. In: Viña, J. (Ed.), *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 263–277.
- De la Fuente, M., Ferrández, M.D., Miquel, J., Hernanz, A., 1992. Changes with aging and physical exercise in ascorbic acid content and proliferative response of murine lymphocytes. *Mech. Ageing Dev.* 65, 177–186.
- De la Fuente, M., Ferrández, M.D., Muñoz, F., De Juan, E., Miquel, J., 1993a. Stimulation by the antioxidant thioproline of the lymphocyte functions of old mice. *Mech. Ageing Dev.* 68, 27–36.
- Ferrández, M.D., De la Fuente, M., 1996. Changes with aging, sex and physical exercise in murine natural killer activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mech. Ageing Dev.* 86, 83–94.
- Franklin, R.A., Li, Y.M., Arkins, S., Kelley, K.W., 1990. Glutathione augments in vitro proliferative responses of lymphocytes to concanavalin to a greater degree in old than in young rats. *J. Nutr.* 120, 1710–1717.
- Furukawa, T., Meydani, S.N., Blumberg, J.B., 1990. The potential benefits of dietary glutathione on immune function and other practical implications. In: Viña, J. (Ed.), *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 351–366.
- Globerson, A., 1995. T lymphocytes and aging. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107, 491–497.
- Harman, D., 1982. The free-radical theory of aging. In: Pryor, W.A. (Ed.), *Free Radicals in Biology*. Academic Press, New York, NY.
- Hirokawa, K., Utsuyama, M., Zeng, Y-X, Kurashima, C., Kasai, M., 1994. Immunological alterations with ageing-laying stress on recent progress in Japan. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 19, 171–183.
- Janeway, C.A., Goldstein, P., 1991. Lymphocyte activation and effector functions. *Curr. Opin. Immunol.* 3, 283–286.
- Kohen, R., Fanberstein, D., Tirosh, O., 1997. Reducing equivalents in the aging process. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 24, 103–123.
- Krishnaraj, R., Blandorf, G., 1988. Age-associated alterations in human natural killer cells 2. Increased frequency of selective natural killer subsets. *Cell Immunol.* 114, 137–148.
- Ligthart, G.J., Schuit, H.R., Hijmans, W., 1989. Natural killer cell function is not diminished in the healthy aged and is proportional to the number of NK cells in the peripheral blood. *Immunology* 68, 396–402.
- Lohmiller, J.J., Roellich, K.M., Toledano, A., Rabinovitch, P.S., Wolf, N.S., Grossmann, A., 1996. Aged murine T-lymphocytes are more resistant to oxidative damage due to the predominance of the cells possessing the memory phenotype. *J. Gerontol: Biol. Sci.* 51A, 132A–140A.
- Lustyik, G., Hallgren, H.M., Bergh, N., O'Leary, J.J., 1990. Effects of preliminary culture on the membrane microviscosity of lymphocytes from young and old donors. Microviscosity correlates with mitogenic response. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 10, 77–87.
- Madden, K.S., Felten, D.L., 1995. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol. Rev.* 75, 77–106.
- Meydani, S.N., Wu, D., Santos, M.S., Hayek, M.G., 1995. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1462S–1476.
- Miller, R.A., 1996. Aging and the immune response. In: Schneider, E., Rowe, J. (Eds.), *Handbook of the Biology of Aging*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 355–392.
- Miquel, J., Weber, H.U., 1990. Aging and increased oxidation of the sulfur pool. In: Viña, J. (Ed.), *Glutathione Metabolism and Physiological Functions*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 187–192.
- Miquel, J., 1991. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 12, 99–117.

- Mysliwska, J., Mysliwski, A., Witkowski, J., 1985. Age-dependent decline of natural killer and ADCC activity of human lymphocytes is connected with decrease of their acid phosphatase activity. *Mech. Ageing Dev.* 31, 1–11.
- O'Shea, S.R., Ortaldo, F., 1992. The biology of natural killer cells: insights into the molecular basis of function. In: Lewis, C.E., Mc Gee, J.O'D. (Eds.), *The natural killer cell*. IRL Press, Oxford.
- Pawelec, G., 1995. Molecular and cell biological studies of ageing and their application to considerations of T lymphocyte immunosenescence. *Mech. Ageing Dev.* 79, 1232.
- Sapolsky, R.M., 1992. Glucocorticoid concentrations in the aged rat: a problem of hypersecretion. In: Sapolsky, R.M. (Ed.), *Stress, the ageing brain and the mechanisms of neuronal death*. The MIT Press, Cambridge, MA or London, UK.
- Schubert, M.P., 1936. Compounds of thiol acids with aldehydes. *J. Biol. Chem.* 114, 341–350.
- Solana, R., Villanueva, J.L., Peña, J., De la Fuente, M., 1991. Cell mediated immunity in ageing. *Comp. Biochem. Physiol.* 99A, 1–4.
- Song, L., Kim, Y.H., Chopra, R.K., Proust, J.J., Nagel, J.E., Nordin, A.A., Adler, W.E., 1993. Age-related effects in T cell activation and proliferation. *Exp. Gerontol.* 28, 313–321.
- Sonntag, W.E., Goloszek, A.G., Brodish, A., Eldrige, J.C., 1987. Diminished diurnal secretion of adrenocorticotropin (ACTH) but not corticoesterone in old male rats: possible relation to increased adrenal sensitivity to ACTH in vivo. *Endocrinology* 120, 2308–2315.
- Stohs, S.J., El-Rashidy, F.H., Lawson, T., Kobayashi, R.H., Wulf, B.J., Potter, J.F., 1984. Changes in glutathione and glutathione metabolizing enzymes in human erythrocytes and lymphocytes as a function of age of donor. *Age* 7, 3–7.
- Suthanthiran, M., Anderson, M.E., Sharma, U.K., Meister, A., 1990. Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via CD2 and CD3 antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3343–3347.
- Verity, M.A., Tam, C.F., Cheung, C., Mock, D.C., Walford, R.L., 1983. Delayed phytohemagglutinin-stimulated production of adenosine triphosphate by aged human lymphocytes: possible relation to mitochondrial dysfunction. *Mech. Ageing Dev.* 23, 53–65.
- Walford, R.L., 1969. *The Immunological Theory of Aging*. Munksgaard, Copenhagen, pp. 1–248.
- Weber, H.U., Fleming, J.E., Miquel, J., 1982. Thiazolidine-4-carboxylic acid, a physiologic sulphhydryl antioxidant with potential value in geriatric medicine. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 1, 299–310.





Relation between exploratory activity and immune function in aged mice: a preliminary study

Mónica De la Fuente ^{a,*}, Marta Miñano ^a, Victor Manuel Victor ^a,
Mónica Del Rio ^a, Maria Dolores Ferrández ^a, Araceli Díez ^b,
Jaime Miquel ^b

^a *Department of Animal Physiology, Faculty of Biological Sciences, Complutense University,
E-28040 Madrid, Spain*

^b *Department of Pharmacology, University of Alicante, Alicante, Spain*

Received 19 June 1997; received in revised form 23 October 1997; accepted 27 October 1997

Abstract

Previous studies show that fast exploration of a T-shaped maze by mature mice may predict an above average longevity. Since the nervous and the immune systems work in a coordinated fashion, and it seems that these two homeostatic systems both influence organismic aging and suffer a senescent decline, we have performed a comparative study of the above behavioral parameter and different functions of three representative immune cells: lymphocytes, macrophages and natural killer (NK) cells obtained from old (76 ± 1 weeks of age) female OF1-Swiss mice. At 70 weeks of age the mice were divided into a 'fast' and a 'slow' group, containing 100 and 0%, respectively, of animals able to explore the 50 cm-long first arm of the maze in 20 s or less. At 76 ± 1 weeks of age the animals were sacrificed, the peritoneal cell suspensions were obtained and the immune organs (axillary nodes, spleen and thymus) were isolated. The following leukocyte functions were studied in peritoneal macrophages: adherence to substrate, mobility (spontaneous and chemotaxis), ingestion of particles and superoxide anion production whereas mobility, lymphoproliferative response to the mitogen Con A and NK activity were studied in the immune-organ leukocyte suspen-

* Corresponding author. Tel.: +34 1 3944989 fax: +34 1 3944935; e-mail: mondelaf@eucmax.sim.ucm.es

sions. The results show that the aged fast mice have better immune functions than the aged slow mice. © 1998 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Aging; Immune function; Leukocytes; Exploratory behavior; Mice

1. Introduction

An increasing amount of data supports the concept that the nervous and immune systems are closely interconnected and they mutually influence their respective functions through common mediators and receptors (Ader et al., 1990; Blalock, 1994; Madden and Felten, 1995). Furthermore, it seems that these two regulatory systems suffer an intrinsic senescent decline (Solana et al., 1991; Ortega et al., 1993; Ferrandiz et al., 1994; Pawelec, 1995; Pawelec et al., 1995; Saransaari and Oka, 1995; Zhang et al., 1995) that may play a central role in most age-related dysfunctions (Fabris, 1986, 1991).

In aging humans and animals there is a relation between performance in certain behavioral tests and expected life span. Thus, in the longitudinal human aging study of the Baltimore Gerontological Center (Borkan and Norris, 1976) male subjects showing low scores (as compared to men of the same age) in a 'tapping' test (that measured reaction time) tended to die earlier than those showing a faster performance. On the other hand, rat and mouse studies, more closely related to the present study, show a correlation between behavioral reactions to novel environmental stimuli in an exploration test and longevity. The data indicate that the life span of the Brown Norway (BN) and Wistar Kyoto (WKY) strains is inversely related to the intensity of their response to a new environment. Moreover, the shorter-lived WYK rats exhibited higher basal activity of the peripheral sympathoadrenal catecholaminergic system in comparison to the longer-lived BN rats (Gilad and Gilad, 1995).

In agreement with the above, unpublished studies from our laboratories suggest that interindividual differences in life span among members of Swiss outbred mouse populations may be related to their behavior in a simple T-maze test. Our data indicate that most mice which quickly explore the maze reach a longer life span than mice that take longer to accomplish this task. This agrees with the previous finding that animals which exhibit immobility or 'freezing behavior' (i.e. high levels of anxiety) when placed in a new environment usually show a short life span (Gilad and Gilad, 1995).

In order to obtain additional information relevant to above, the present work offers a preliminary exploration of the relations between immune system function and T-maze performance. We have investigated three representative immune cells, i.e. lymphocytes, phagocytes and natural killer (NK) cells from two different populations of aged mice: those which explore the above maze in less than 20 s and those which take longer.

2. Materials and methods

2.1. Animals

We have used female outbred Swiss (Iffa-Credo, France) mice (*Mus musculus*) which were 7 weeks old on arrival at our laboratory. The animals were randomly divided in groups of 10, and each group was housed in polyurethane boxes, maintained in cages containing 10 mice each, at a constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) in sterile conditions inside an aseptic air negative-pressure environmental cabinet (FluFrance, Cachan, France) on a 12/12 h reversed light/dark cycle. All animals were fed water and standard Sander Mus (A.04 diet from Panlab L.S. Barcelona, Spain) pellets ad libitum. The diet was in accordance with the recommendations of the American Institute of Nutrition for laboratory animals.

2.2. Experimental groups

At 11 months of age, the spontaneous exploratory behavior of each mouse was tested in a T-shaped maze (with arms 50 cm in length), in order to sort out the 'fast' mice (which completed the exploration of the first arm of the maze in 20 s or less) from the 'slow' mice (which required over 20 s). Then, 20 mice were regrouped in two groups. One group contained the 'fast population' and the other the 'slow population', with a fast/slow mouse ratio of 100/0 and 0/100, respectively. Every 2 weeks all animals were subjected to the T-maze test. At 17 months of age, 16 surviving mice (8 from each group) not showing pathological processes were sacrificed by cervical dislocation.

2.3. Collection of leukocytes

The mice were killed by cervical dislocation according to the guidelines of the European Community Council Directives 86/6091 EEC, and peritoneal suspensions were obtained following a method previously described (De la Fuente, 1985). The abdomen was cleaned with 70% ethanol, the abdominal skin was carefully dissected without opening the peritoneum, and 4 ml of Hank's medium (Sigma) adjusted to pH 7.4 were injected intraperitoneally. The abdomen was massaged and 90–95% of the injected volume was recovered. Flow cytometric analysis showed a proportion of 40% macrophages and 60% lymphocytes in the peritoneal suspension. The resting peritoneal macrophages were quantified and identified by their morphology and non-specific esterase staining. Both kinds of cells were counted and then adjusted to 5×10^5 macrophages/ml or 5×10^5 lymphocytes/ml of Hank's medium. Cellular viability, routinely determined before and after each experiment using the Trypan-blue exclusion test, was in all cases higher than 95%.

For collection of immune organ leukocytes, after a peritoneal suspension was obtained from each animal, the axillary nodes, the spleen and the thymus were removed aseptically, freed of fat, minced with scissors and gently pressed through a mesh screen (Sigma). The cell suspension obtained from each organ was cen-

trifuged in a gradient of Ficoll-Hypaque (Sigma) with a density of 1.070 (Boyun, 1968). Each halo of leukocytes was resuspended and washed three times in phosphate buffered saline (PBS) solution. Every cell suspension was separated in three aliquots for the mobility, proliferation and NK assays. The cell viability, measured by the Trypan blue exclusion test, was about 98%.

2.4. Assays of phagocytic function in peritoneal macrophages

The assay of phagocytic function of the macrophages was carried out on the peritoneal suspensions.

For the quantification of adherence capacity to the substrate, we observed the adherence to a smooth plastic surface because it resembles adherence to animal tissue. The method was carried out as previously described by us (De la Fuente et al., 1991). Briefly, aliquots of the peritoneal macrophage suspensions (adjusted to 10^5 cells/ml Hank's medium) were placed in Eppendorf tubes and incubated 10, 20, 30 and 60 min at 37°C, and after gently shaking, the number of non-adhered macrophages was determined in Neubauer chambers. The adherence index, AI, was calculated according to the following equation: $AI = 100 - [(non\text{-}adherent\ cells/ml) / (initial\ cells/ml)] \times 100$.

The mobility assays (spontaneous mobility and directed mobility or chemotaxis) were determined according to a modification (De la Fuente et al., 1991) of the original technique described by Boyden (1962), which consists basically in the use of chambers with two compartments separated by a filter (Millipore) with a pore diameter of 3 μ m. Aliquots of 0.3 ml of the peritoneal suspension (5×10^5 cells/ml) were deposited in the upper compartment of the Boyden chambers. F-met-leu-phe (Sigma) (a positive chemotactic peptide *in vitro*), at 10^{-8} M, was placed in the lower compartment in order to determine chemotaxis. For spontaneous mobility, a Hank's medium free of chemotactic factor was used. The chambers were incubated for 3 h at 37°C and 5% CO₂, and after this time the filters were fixed, stained and both the chemotaxis and mobility indexes were determined by counting in an optical microscope (immersion objective) the total number of macrophages in one third of the lower face of the filters.

The latex phagocytosis assay was carried out following the method described by De la Fuente (1985). Aliquots of 200 μ l of peritoneal suspension were incubated in migration inhibitory factor (MIF) plates (Sterilin, Teddington, Middlesex, UK) for 30 min. To the adherent monolayer, after being washed with PBS, 20 μ l latex bead (1.09 μ m diluted to 1% PBS, Sigma) were added. After 30 min of incubation, the plates were washed, fixed and stained and the number of particles ingested by 100 macrophages was counted.

The superoxide anion production, the first response in the respiratory burst, was evaluated assessing the capacity of this anion, produced by macrophages, to reduce nitroblue tetrazolium (NBT). It was carried out following the method described by De la Fuente et al. (1991) slightly modified as follows: aliquots of 250 μ l of peritoneal suspension were mixed with 250 μ l of NBT (1 mg/ml in PBS, Sigma). Twenty microliters latex bead suspension were added to the stimulated samples and

20 μ l of PBS to the non-stimulated samples. After 60 min of incubation, the reaction was stopped, the samples were centrifuged, and the absorbance of the supernatants determined at 525 nm in a spectrophotometer (extracellular measure of superoxide anion production). The intracellular reduced NBT was extracted with dioxan (Sigma) and, after centrifugation, the supernatant absorbance at 550 nm was determined (intracellular measure of superoxide anion production).

2.5. Assays of lymphocyte functions

Adherence of lymphocytes was studied in peritoneal suspensions (adjusted at 5×10^5 lymphocytes/ml of Hank's solution) following the same method indicated above for macrophages.

Spontaneous mobility and chemotaxis were studied in peritoneal lymphocytes as well as lymphocytes obtained from axillary nodes, spleen and thymus, and in all samples adjusted to 5×10^5 lymphocytes/ml of Hank's solution. The assays were carried out as described above for macrophages.

Lymphoproliferative response to mitogen was measured in the aliquot of the leukocyte suspension resuspended in RPMI 1640 enriched with L-glutamine (Gibco Canada Ltd., Burlington, Ontario) and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco) and gentamicin (100 μ g/ml, Gibco), and adjusted to 10^6 cells/ml medium. We followed a standard method previously described (Del Rio et al., 1994) with slight modifications. Aliquots of 200 μ l of the lymphocyte suspensions were dispensed in 96 well flat-bottomed microtiter plates (Costar, Cambridge, MA) and 20 μ l of Con A (1 μ g/ml) or 20 μ l of Hank's solution (controls) were added for the measurement of spontaneous or mitogen-induced lymphoproliferation, respectively. After 48 h of incubation at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂, 0.5 μ Ci/well [³H]thymidine was added to each well. After another 24 h incubation, lymphocytes were harvested in a semiautomatic microharvester and the thymidine uptake was measured in a β -counter (LKB, Uppsala, Sweden) for 1 min. Results were expressed as percentage of [³H]thymidine uptake (cpm), giving the 100% value to the cpm obtained in samples without mitogen.

2.6. NK activity assay

An enzymatic colorimetric assay was used for cytolysis measurements of target cells (Cytotox 96 TM Promega, Boehringer Ingelheim) based on the determination of lactate dehydrogenase (LDH) using a tetrazolium salt. This technique has been shown to provide identical values (within experimental error) to those obtained by parallel ⁵¹Cr release assays by our group and by other authors (Decker and Lohmann-Matthes, 1988; Del Rio and De la Fuente, 1995). Murine YAC-1 cells were used as target cells. These cells were maintained in complete medium (RPMI 1640 plus 10% FCS, Gibco) at 37°C, 5% CO₂ and saturated humidity, being checked and counted periodically. Target cells were seeded in 96-well U-bottom culture plates (Costar) at 10^4 cells/well in 1640 RPMI without phenol red. Effector cells (leukocytes from axillary nodes, spleen and thymus) were added at 10^5

cells/well. The effector/target rate used, 10/1, was found by us (Del Rio and De la Fuente, 1995) to be responsible for similar results to those obtained in previous work with radioactive techniques (De la Fuente et al., 1993). The plates were centrifuged at $250 \times g$ for 4 min to facilitate cell to cell contacts and then they were incubated for 4 h at 37°C . After the incubation, LDH activity was measured in 50 ml/well of the supernatants by addition of the enzyme substrate and absorbance was recorded at 490 nm. Four kinds of control measurements were performed: a target spontaneous release, a target maximum release, an effector spontaneous release and a volume correction control, in order to adjust the volume change caused by the addition of lysis solution to maximum release control wells. To determine the percentage of target cells killed, the following equation was used: $\% \text{ lysis} = ((E - ES) - TS) / (M - TS) \times 100$ where E = mean of absorbance in the presence of effector cells, ES = mean of absorbance of effector cells incubated alone, TS = mean of absorbance in target cells incubated with medium alone, and M = mean of maximum absorbance after incubating target cells with lysis solution.

2.7. Statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm S.D. of the values from the number of experiments shown in the figures. The data were evaluated statistically by the Student's t -test, $P < 0.05$ being the minimum significant level. The normality of the samples was confirmed by the Kolmogorov–Smirnov test.

3. Results

The percentages of slow and fast mice composing each group along remained about the same throughout the study (i.e. from the 11th to the 17th month of age). Moreover, because of the 'training' effect of the frequent testing, most fast mice became even faster over the course of the investigation.

As regards the macrophage functions (Figs. 1–3), they seemed better in the fast than in the slow mice. Thus, the adherence indexes (Fig. 1) of macrophages from fast mice were higher than those from slow mice, with the differences being statistically significant at 10 ($P < 0.01$), 20 and 30 ($P < 0.05$) min of incubation. Both the spontaneous mobility and the chemotaxis index (Fig. 2) were superior in cells from fast mice, with statistically significant differences ($P < 0.01$) between fast and slow mice. By contrast, the two mouse populations did not differ in their phagocytosis index, which was 313 ± 57 for the fast and 305 ± 39 for the slow animals. Superoxide anion production (Fig. 3) showed higher intracellular values in the macrophages from the fast mice, with significant differences ($P < 0.05$) between fast and slow animals in the stimulated samples. Conversely, the extracellular production of this free radical in both stimulated and non-stimulated samples was significantly decreased ($P < 0.05$) in the macrophages from fast mice.

Lymphocyte functions were also higher in the fast mice, with significant differences between the adherence index of fast and slow animals at 10 ($P < 0.01$) and 20

20 μ l of PBS to the non-stimulated samples. After 60 min of incubation, the reaction was stopped, the samples were centrifuged, and the absorbance of the supernatants determined at 525 nm in a spectrophotometer (extracellular measure of superoxide anion production). The intracellular reduced NBT was extracted with dioxan (Sigma) and, after centrifugation, the supernatant absorbance at 550 nm was determined (intracellular measure of superoxide anion production).

2.5. Assays of lymphocyte functions

Adherence of lymphocytes was studied in peritoneal suspensions (adjusted at 5×10^5 lymphocytes/ml of Hank's solution) following the same method indicated above for macrophages.

Spontaneous mobility and chemotaxis were studied in peritoneal lymphocytes as well as lymphocytes obtained from axillary nodes, spleen and thymus, and in all samples adjusted to 5×10^5 lymphocytes/ml of Hank's solution. The assays were carried out as described above for macrophages.

Lymphoproliferative response to mitogen was measured in the aliquot of the leukocyte suspension resuspended in RPMI 1640 enriched with L-glutamine (Gibco Canada Ltd., Burlington, Ontario) and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco) and gentamicin (100 μ g/ml, Gibco), and adjusted to 10^6 cells/ml medium. We followed a standard method previously described (Del Rio et al., 1994) with slight modifications. Aliquots of 200 μ l of the lymphocyte suspensions were dispensed in 96 well flat-bottomed microtiter plates (Costar, Cambridge, MA) and 20 μ l of Con A (1 μ g/ml) or 20 μ l of Hank's solution (controls) were added for the measurement of spontaneous or mitogen-induced lymphoproliferation, respectively. After 48 h of incubation at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂, 0.5 μ Ci/well [³H]thymidine was added to each well. After another 24 h incubation, lymphocytes were harvested in a semiautomatic microharvester and the thymidine uptake was measured in a β -counter (LKB, Uppsala, Sweden) for 1 min. Results were expressed as percentage of [³H]thymidine uptake (cpm), giving the 100% value to the cpm obtained in samples without mitogen.

2.6. NK activity assay

An enzymatic colorimetric assay was used for cytolysis measurements of target cells (Cytotox 96 TM Promega, Boehringer Ingelheim) based on the determination of lactate dehydrogenase (LDH) using a tetrazolium salt. This technique has been shown to provide identical values (within experimental error) to those obtained by parallel ⁵¹Cr release assays by our group and by other authors (Decker and Lohmann-Matthes, 1988; Del Rio and De la Fuente, 1995). Murine YAC-1 cells were used as target cells. These cells were maintained in complete medium (RPMI 1640 plus 10% FCS, Gibco) at 37°C, 5% CO₂ and saturated humidity, being checked and counted periodically. Target cells were seeded in 96-well U-bottom culture plates (Costar) at 10^4 cells/well in 1640 RPMI without phenol red. Effector cells (leukocytes from axillary nodes, spleen and thymus) were added at 10^5

($P < 0.05$) min of incubation (Fig. 4). Furthermore, the indexes of spontaneous mobility and chemotaxis of lymphocytes from peritoneum, axillary nodes, spleen and thymus were higher in the fast than in the slow animals (Fig. 5). The statistical significance for the differences in lymphocyte spontaneous mobility between fast and slow mice was $P < 0.05$ for all above mentioned locations and $P < 0.01$ for the differences in chemotaxis of cells obtained from peritoneum, axillary nodes and spleen. By contrast, no differences were seen in the chemotaxis of thymus lymphocytes. The proliferative response to Con A (Fig. 6) was significantly ($P < 0.05$) increased in the lymphocytes from fast mice.

NK activity (Fig. 7) showed higher values in the leukocytes from fast mice, although a statistically significant difference was only found in thymus ($P < 0.05$).

4. Discussion

According to our data, most parameters of immune function show lower values in the slow than in the fast mice. Furthermore, since it is well known that mouse

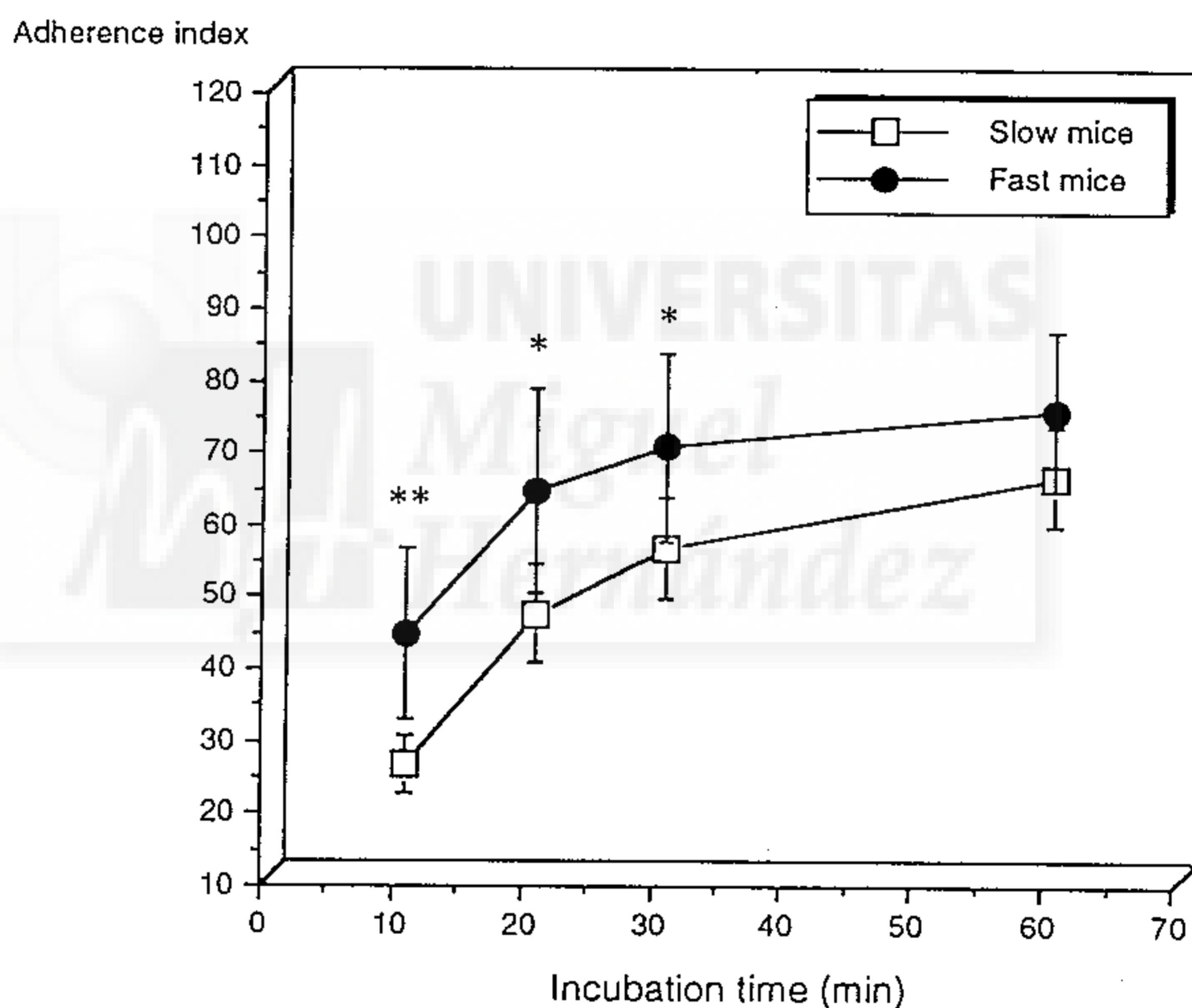


Fig. 1. Adherence capacity of peritoneal macrophages from slow and fast female Swiss mice at 10, 20, 30 and 60 min of incubation. Each data represents the mean \pm S.D. of eight values (adherence indices) corresponding to eight animals, each value being the mean of duplicate assays. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ with respect to values of slow mice.

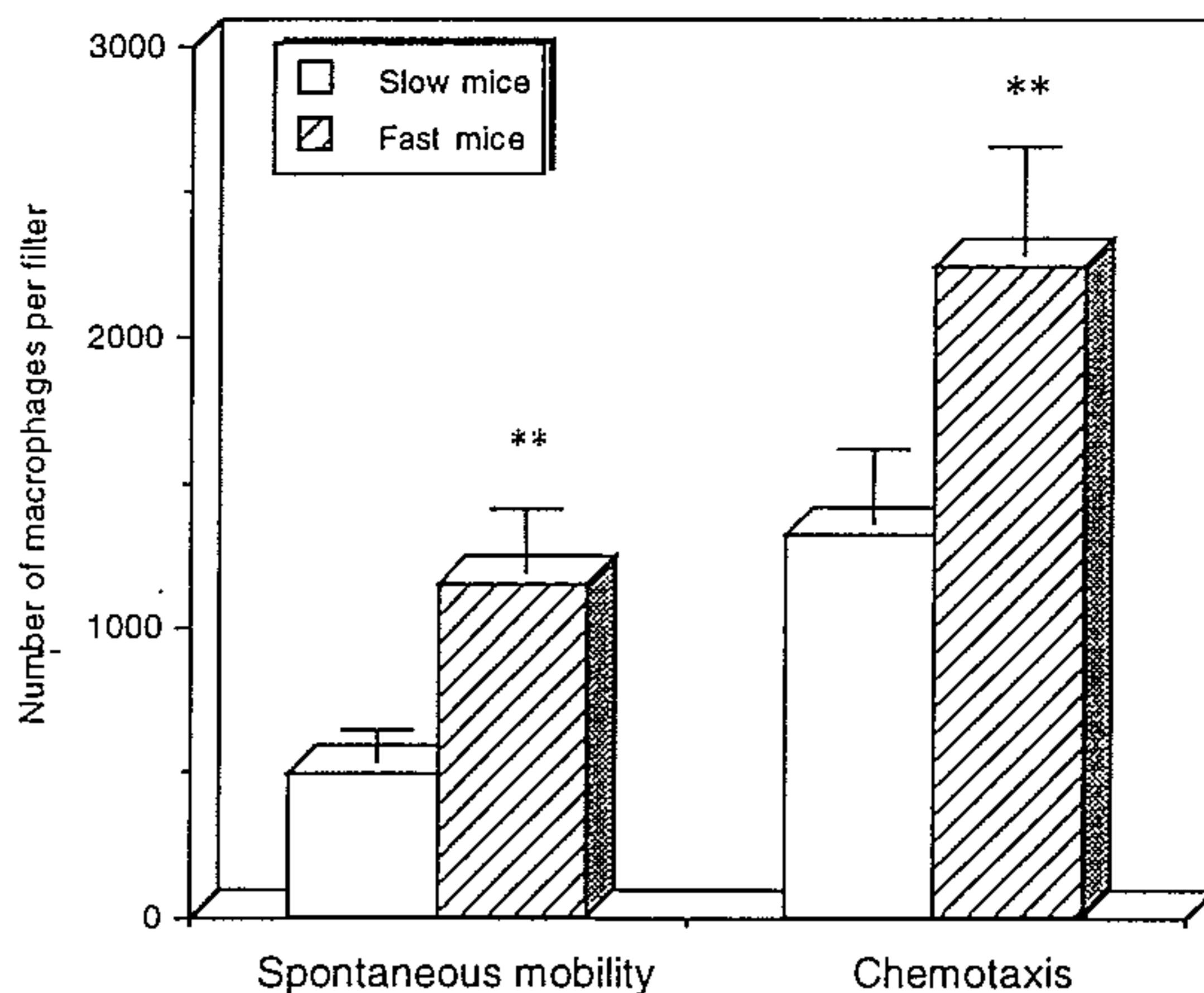


Fig. 2. Spontaneous mobility and chemotaxis of peritoneal macrophages from slow and fast female Swiss mice. Each column represents the mean \pm S.D. of eight values (number of macrophages per filter) corresponding to eight animals, each value being the mean of duplicate assays. ** $P < 0.01$ with respect to values of slow mice.

aging is accompanied by a decreased exploratory drive (Ordy et al., 1964), the slow mice can be considered 'biologically older' than their fast counterparts.

As regards the immune system, while most investigations of age-related changes in this system have focused mainly on lymphoproliferation that is decreased (Makinodan et al., 1969; Walford, 1969; Solana et al., 1991; Pawelec, 1995; Pawelec et al., 1997), whereas less attention has been paid to other immune functions such as lymphocyte adherence and mobility and NK activity and phagocytosis (Ortega et al., 1993; Sansoni et al., 1993; De la Fuente et al., 1995; Ferrández and De la Fuente, 1996). Nevertheless, the extant data justify the view that our aged fast mice have a better preserved immune system than the aged slow mice. A higher activity of NK cells, which lyse tumor cells and have important regulatory functions (Berke, 1989), is a favorable trait of fast animals. Moreover, the high indexes of adherence and mobility, the first and crucial functions involved in the immune and inflammatory responses (Doherty et al., 1987; Springer, 1990) that are shared by lymphocytes

Fig. 3. (see right) Intracellular (upper figure) and extracellular (bottom figure) superoxide anion production in peritoneal macrophages from slow and fast female Swiss mice. Each column represents the mean \pm S.D. of eight values (absorbance of nitroblue tetrazolium reduction) corresponding to eight animals, each value being the mean of duplicate assays. * $P < 0.05$ with respect to values of slow mice.

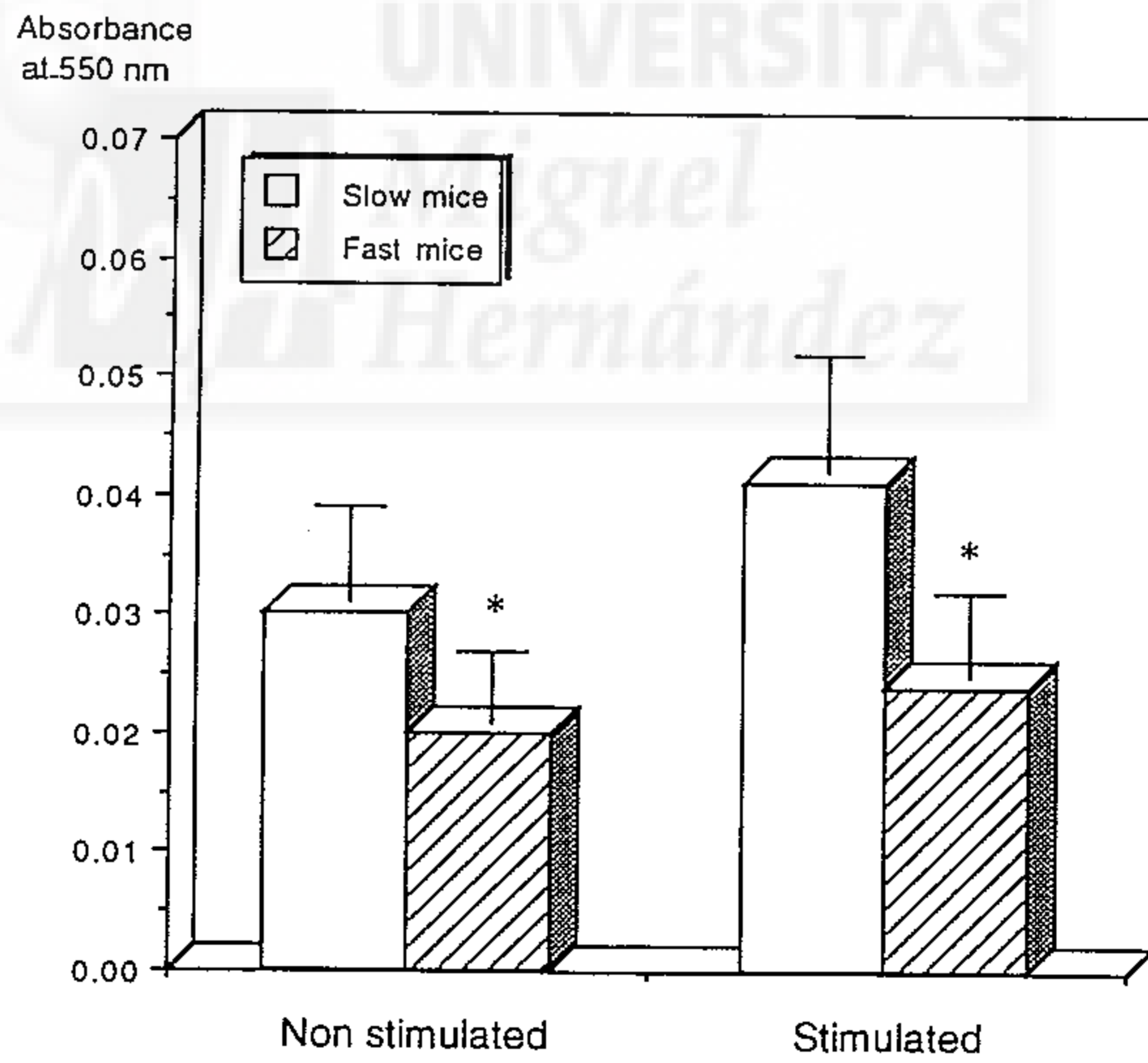
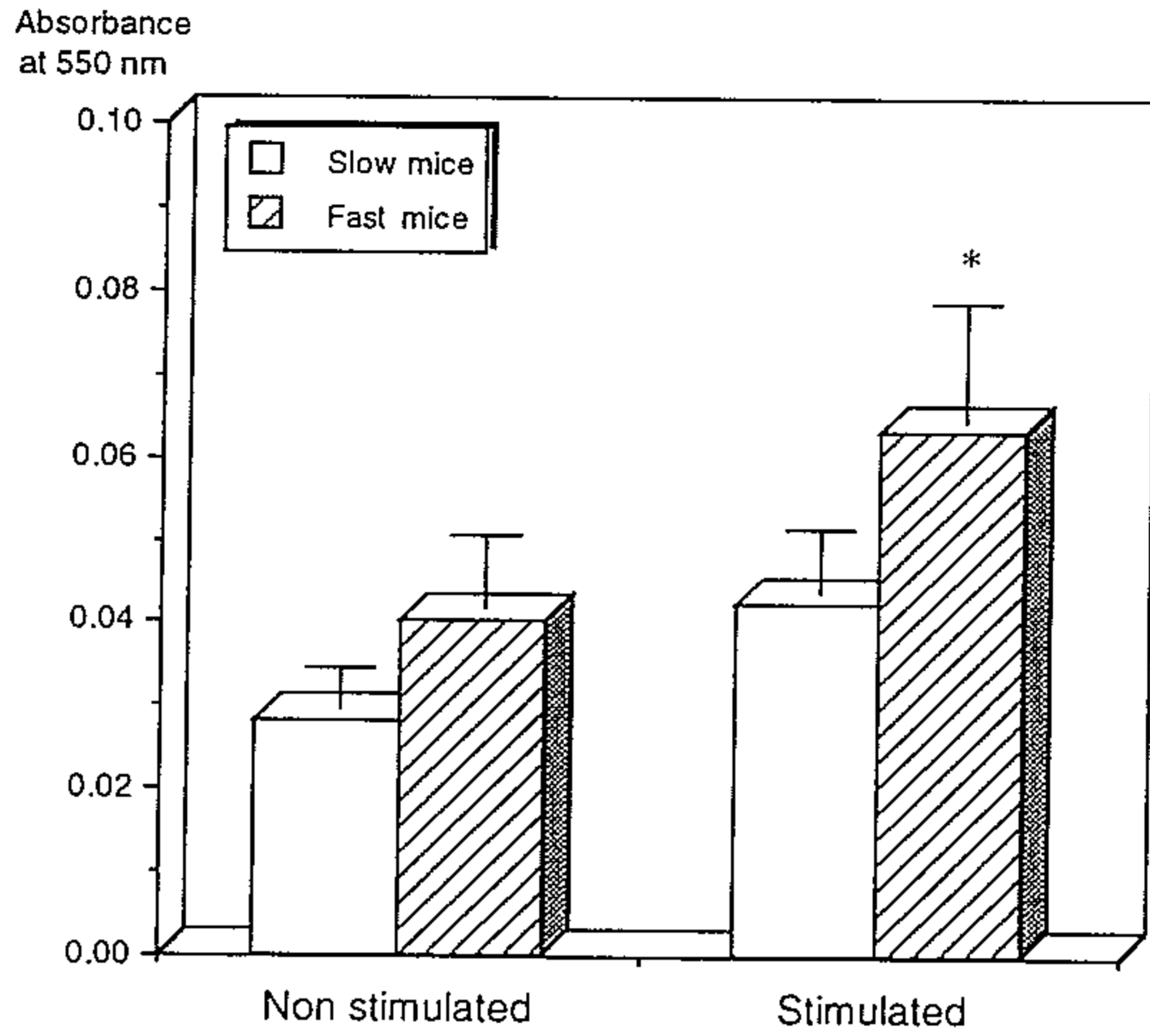


Fig. 3.

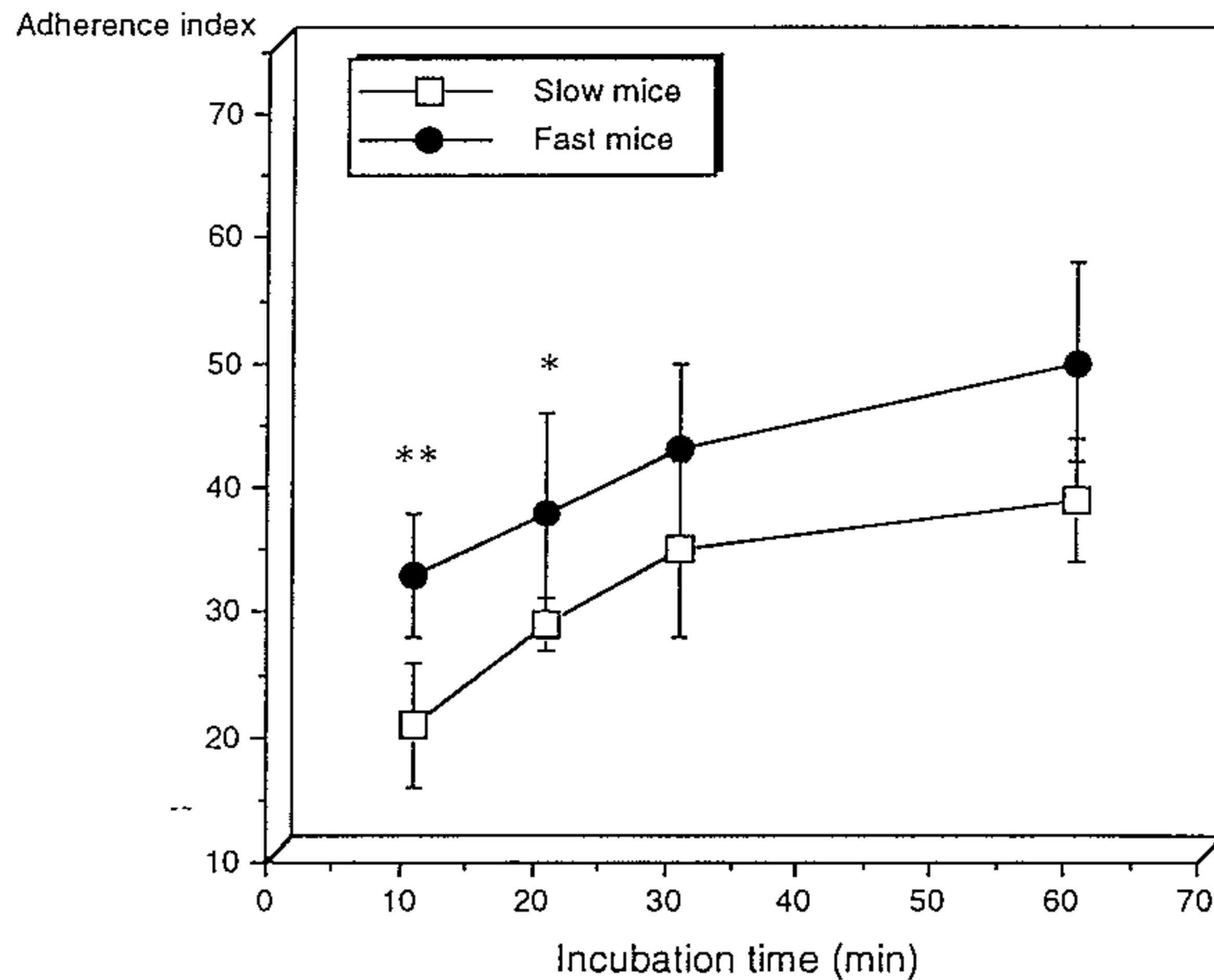


Fig. 4. Adherence capacity of peritoneal lymphocytes from slow and fast female Swiss mice, and at 10, 20, 30 and 60 min of incubation. Each data represents the mean \pm S.D. of eight values (adherence indices) corresponding to eight animals, each value being the mean of duplicate assays. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ with respect to values of slow mice.

and phagocytes (Mackay and Imhof, 1993), found in fast animals, indicate that these animals have better phagocytic cells for the defense of the organism against pathogenic agents (Ortega et al., 1993) and a better migration capacity of lymphocytes searching for antigens. It is especially interesting that while the macrophages of fast mice produce higher levels of intracellular superoxide (which exerts a favorable effect on their phagocytic activity), the noxious inflammation causing release of superoxide is lower in these fast mice. Furthermore, a better lymphoproliferative response to mitogen in vitro represents a better antigen response in vivo, which is essential for an adequate immune response.

A relation between early immunosenescence and short life span has been shown by previous work from other laboratories. The well-known contribution of immune decline to the impaired resistance to infectious and neoplastic diseases, both in experimental animals and in human subjects, supports the concept that an assessment of immune function can play a useful role in the prediction of morbidity and mortality of human populations (Pawelec et al., 1995). Life span does not show a correlation with any specific immune parameter (Lehtonen et al., 1990), but recent studies suggest that the analysis of a number of parameters may reveal correlations with the mortality rates of aged populations. Thus, it seems that the role of well

preserved immune functions in the prevention of death becomes pre-eminent in subjects who have reached an advanced age (Pawelec et al., 1995).

As regards our behavior data, since 'freezing' is linked to hyper-reactivity to environmental stressors (Gilad and Gilad, 1995), we can assume that the slow mice are more prone to sustain chronic stress throughout their lives because of social interaction with cagemates, handling by investigators and caretakers and other aspects of their environment. In agreement with previous research showing a correlation between stress, on one hand, and immunodepression (Ader et al., 1990) and aging (Ordy et al., 1964; Stein-Behrens and Sapolsky, 1992) on the other hand, both hyper-reactivity to a stressful stimulus and a less than optimal immune function may predict a short life span.

The cellular and molecular processes that are responsible for the parallel age-related decline of the immune system and the central nervous system, and its effect on longevity are not well understood. The data reviewed by Felten et al. (1991) suggest that the hypothalamus, the limbic forebrain structures and the brain stem central autonomic nuclei play an essential role in the functional coordination of the immune system and the central nervous system. Moreover, noradrenergic sympathetic nerves, through direct innervation of immune organs, provide an anatomical

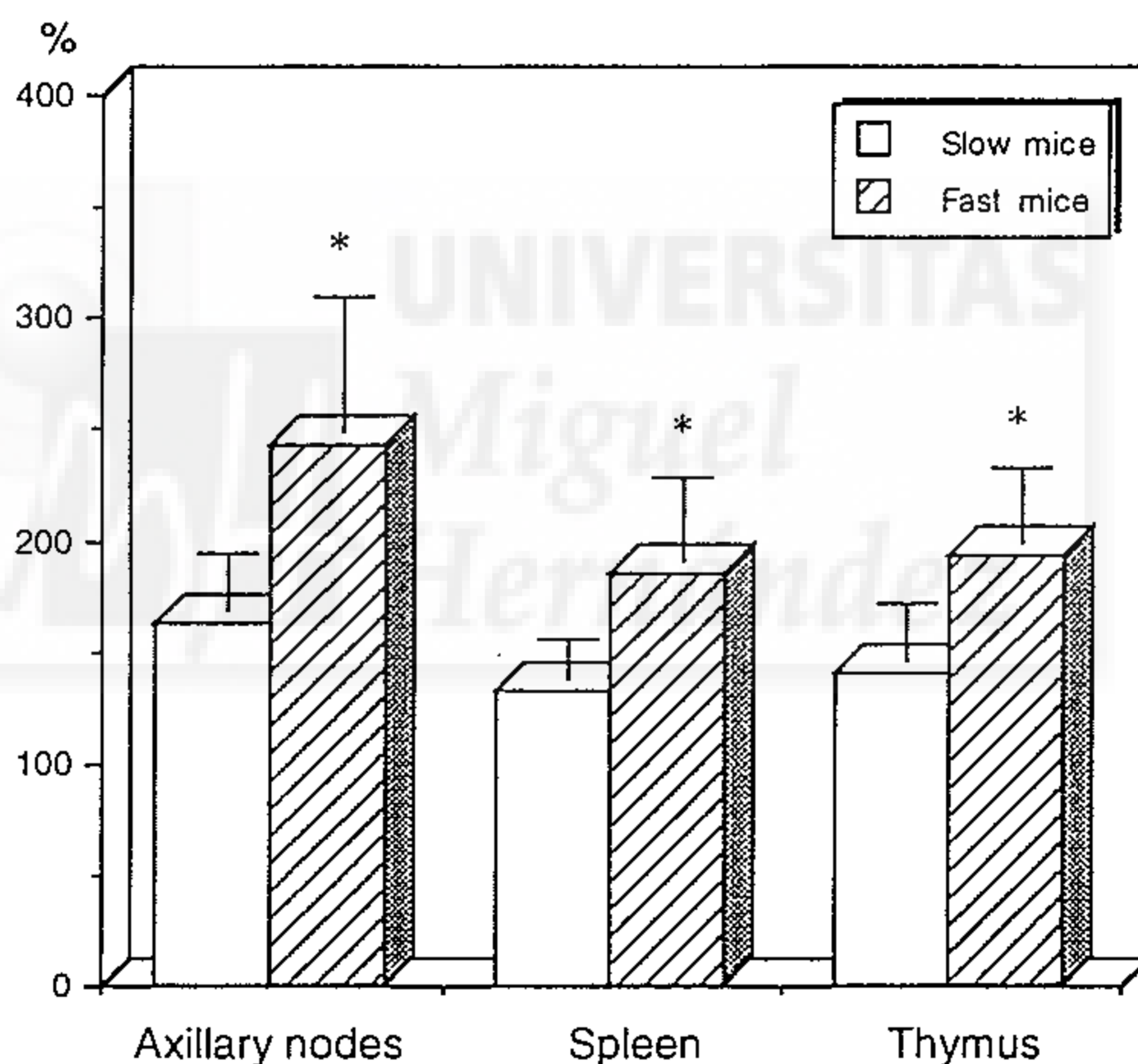


Fig. 6. Proliferative response to the mitogen Con A of lymphocytes from axillary nodes, spleen and thymus. Each column represents the mean \pm S.D. of eight values (percentage of [3 H]thymidine uptake, cpm, giving the 100% value to the cpm obtained in samples without mitogen) corresponding to eight animals, each value being the mean of duplicate assays. * $P < 0.05$ with respect to values of slow mice.

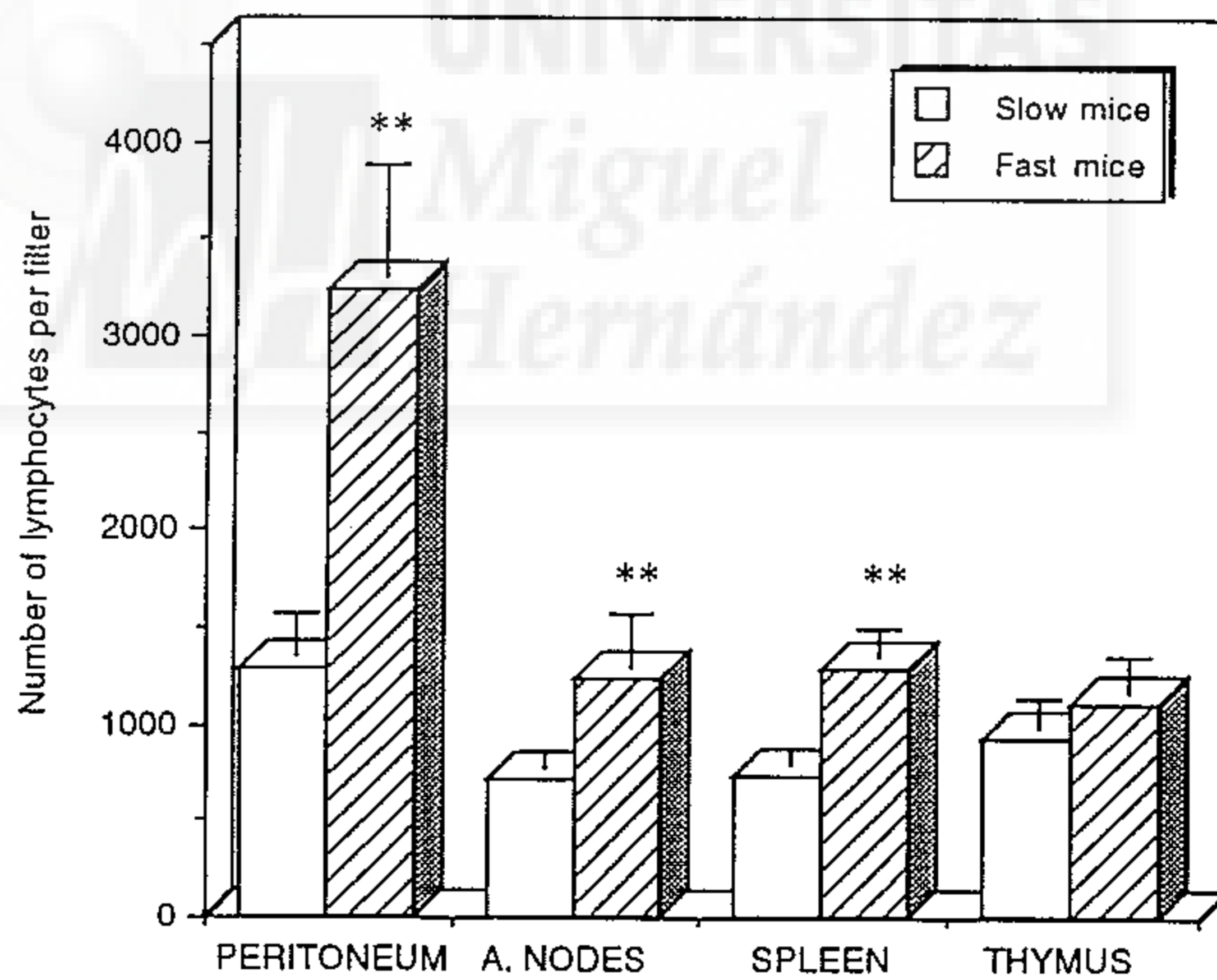
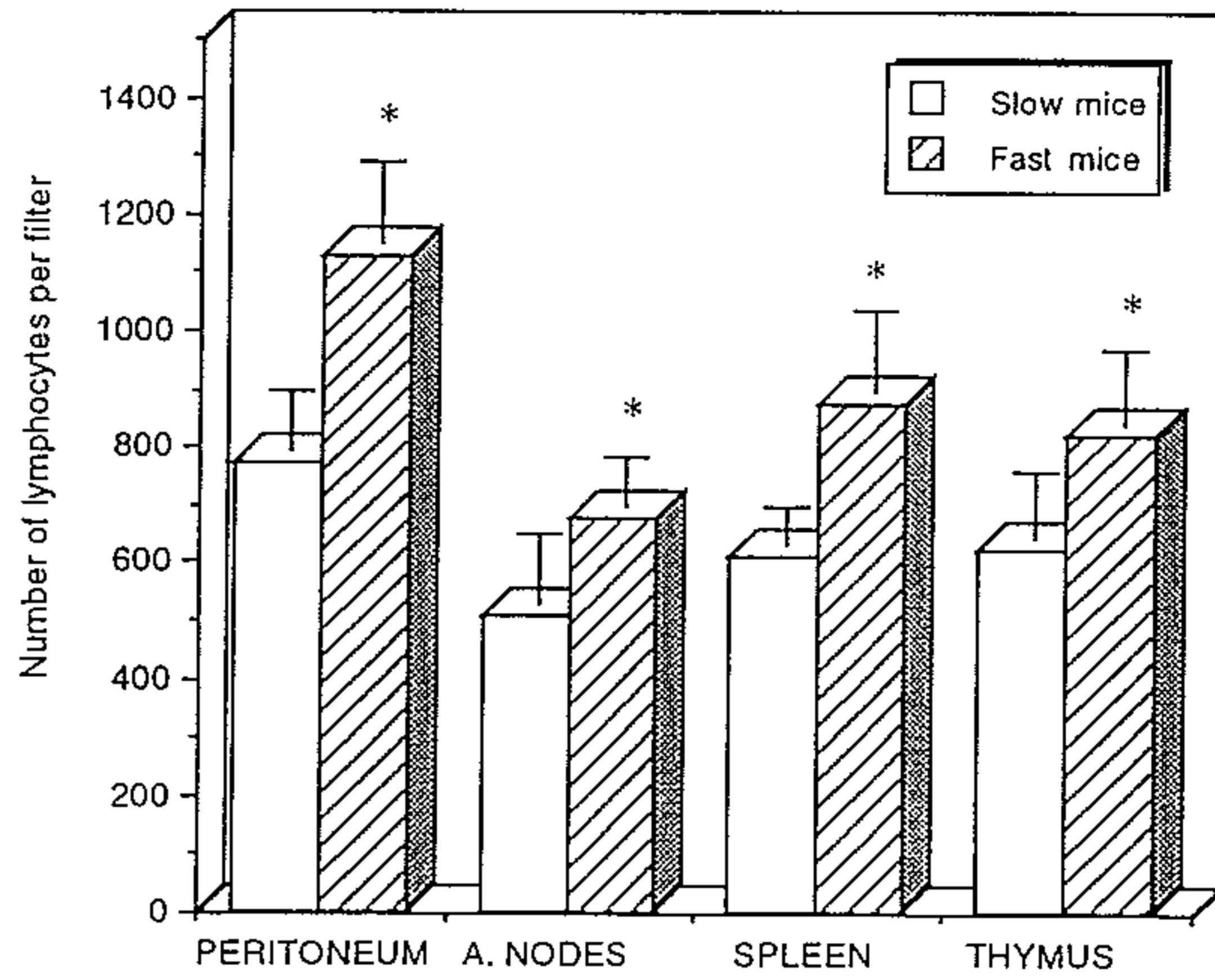


Fig. 5. Spontaneous mobility (upper figure) and chemotaxis (bottom figure) of lymphocytes from peritoneum, axillary nodes, spleen and thymus. Each column represents the mean \pm S.D. of eight values (number of macrophages per filter) corresponding to eight animals, being each value the mean of duplicate assays. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ with respect to values of slow mice.

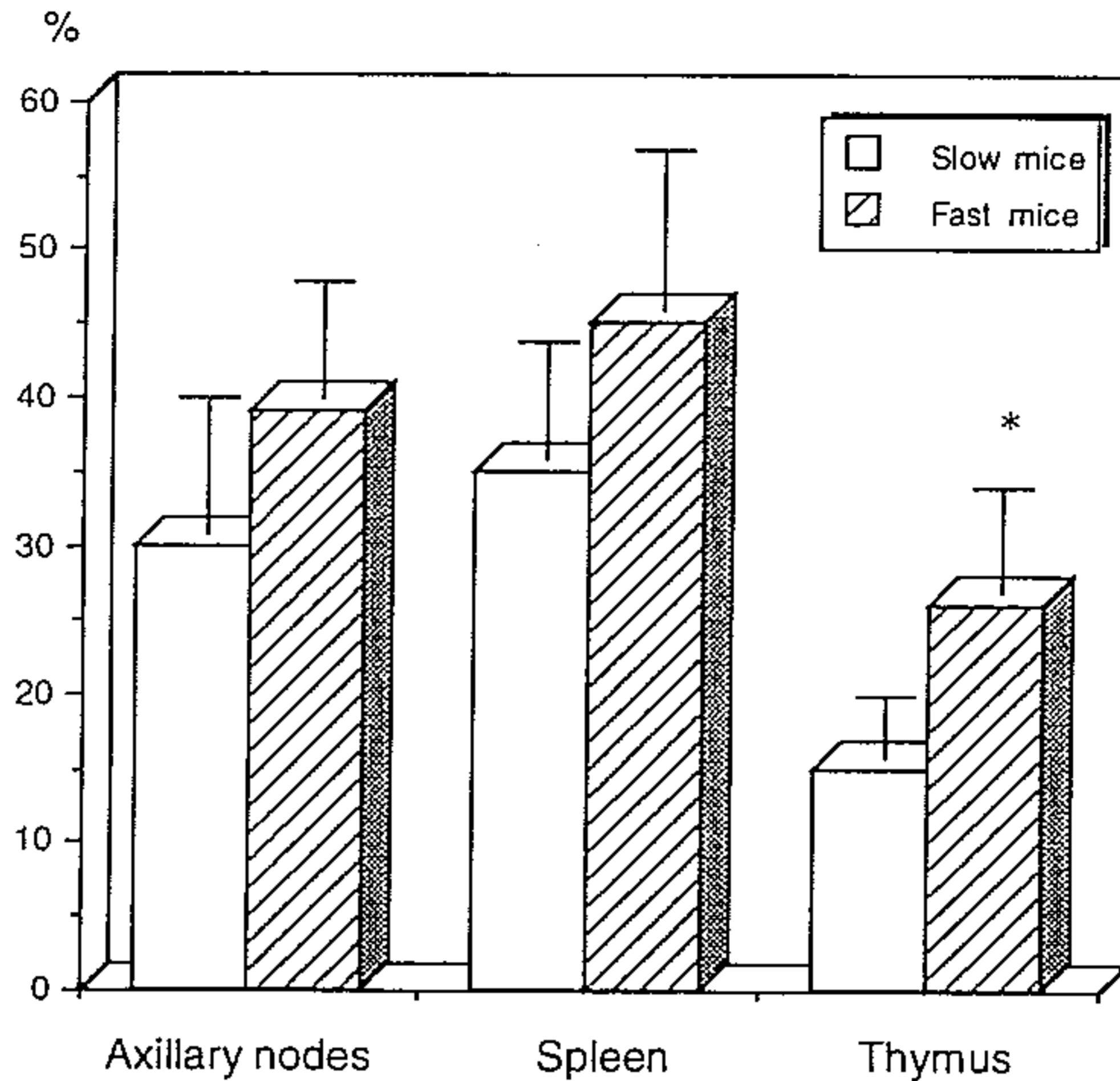


Fig. 7. NK activity of axillary nodes, spleen and thymus. Each column represents the mean \pm S.D. of eight values (percentage of lysis) corresponding to eight animals, each value being the mean of duplicate assays. * $P < 0.05$ with respect to values of slow mice.

link between the nervous and the immune system (Felten and Felten, 1991). A role for declining noradrenergic innervation in immune senescence is suggested by the similarity between alterations of immune response with age and the effect of acute sympathetic denervation in young adults (Ackerman et al., 1991). Even more relevant to our present findings are the following comments by Ackerman et al. (1991): 'The finding of parallel age-associated declines in sympathetic noradrenergic innervation of lymphoid organs and immune function suggests that alterations in the ability of the nervous system to signal the immune system through direct neural pathways may play a role in senescence of the immune system. No studies have tested this hypothesis directly; however, our studies of mice demonstrated a close correlation between the life span of the animal, onset and progression of changes in immune function and the decline of noradrenergic innervation of the spleen. The marked differences in timing of the spleen. The marked differences in timing of these events in different strains of mice support the notion that intrinsic genetic factors may control one or all of these processes'.

It is probable that, in agreement with these views, the slow (hyperreactive) mice suffer an early dysfunction in the above mentioned nervous structures which in turn impairs immune competence and increases the rate of aging of both systems, with

resulting shortening of life span. This hypothesis is in agreement with the finding of an abnormally low number of synaptic profiles in layer III of the frontal cortex in aged rats showing poor performance in a maze in comparison to good performers, both young and aged (Klein, 1983).

We feel that further comparative studies on fast and slow mice may help to clarify the above issues, which are related to fundamental mechanisms of cellular and functional aging. Moreover, the slow mice may provide a useful model of 'senescence accelerated mice' for pharmacological and dietary modulation of the rate of aging.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FIS (94-1348, 95-1623, and 97-2078).

References

- Ackerman, K.D., Bellinger, D.L., Felten, S.Y., Felten, D.L., 1991. Ontogeny and senescence of noradrenergic innervation of the rodent thymus and spleen. In: Ader, R., Felten, D.L., Cohen, N. (Eds.) *Psychoneuroimmunology*, Academic Press, London, pp. 71–125.
- Ader, R., Felten, D., Cohen, N., 1990. Interaction between the brain and the immune system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 561–602.
- Berke, G., 1989. Functions and mechanisms of lysis induced by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. In: Paul, W.E. (Ed.) *Fundamental immunology*, Raven Press, N.Y.
- Blałock, J.E., 1994. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today* 15, 504–511.
- Borkan, G.A., Norris, A.H., 1976. Assessment of biological age using a profile of physical parameters. *J. Gerontol.* 22, 428–437.
- Boyden, S.V., 1962. The chemotaxis effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 115, 453–456.
- Boyun, A., 1968. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, 77–82.
- Decker, T., Lohmann-Matthes, M.L., 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Neuroimmunol.* 38, 61–70.
- De la Fuente, M., Hemanz, A., Collazos, M.E., Barriga, C., Ortega, E., 1995. Effects of physical exercise and aging on ascorbic acid and superoxide anion levels in peritoneal macrophages from mice and guinea pigs. *J. Comp. Phys. B.* 165, 315–319.
- De la Fuente, M., del Rio, M., Hemanz, A., 1993. Stimulation of natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity activities in mouse leukocytes by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C: involvement of cyclic AMP, inositol 1,4,5-triphosphate and protein kinase C. *J. Neuroimmunol.* 48, 143–150.
- De la Fuente, M., Del Rio, M., Ferrández, M.D., Hemanz, A., 1991. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology* 73, 205–211.
- De la Fuente, M., 1985. Changes in the macrophage function with aging. *Comp. Biochem. Physiol.* 81A, 935–938.
- Del Rio, M., De la Fuente, M., 1995. Stimulation of natural killer (NK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activities in murine leukocytes by bombesin-related peptides requires the presence of adherent cells. *Regul. Pept.* 60, 159–166.

- Del Rio, M., Hernanz, A., De la Fuente, M., 1994. Bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C. *Peptides* 15, 15–22.
- Doherty, D.E., Haslett, C., Fonnesen, M.G., Henson, P.M., 1987. Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium. *J. Immunol.* 138, 1762–1771.
- Fabris, N., 1991. Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to ageing. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 12, 219–230.
- Fabris, N., 1986. Pathways of neuroendocrine-immune interactions and their impact with aging processes. In: Facchini, A., Haaijman, J.J., Labó, G. (Eds.), *Immunoregulation in Aging*, Eurage, Rijswijk, pp. 117–130.
- Felten, D.L., Cohen, N., Ader, R., Felten, S.R., Carlson, S.L., Roszman, T.L., 1991. Central neural circuits involved in neural-immune interactions. In: Ader, R., Felten D.L., Cohen, N. (Eds.) *Psychoneuroimmunology*, Academic Press, London, pp. 3–25.
- Felten, S.Y., Felten, D.L., 1991. Inervation of lymphoid tissue. In: Ader, R., Felten, D.L., Cohen, N. (Eds.) *Psychoneuroimmunology*, Academic Press, London, pp. 27–69.
- Ferrández, M.D., De la Fuente, M., 1996. Changes with aging, sex and physical exercise in murine natural killer activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mech. Ageing Dev.* 86, 83–94.
- Ferrandiz, M.L., Martínez, M., DeJuan, E., Díez, A., Bustos, G., Miquel, J., 1994. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in brain of aged mice. *Brain Res.* 644, 335–338.
- Gilad, G.M., Gilad, V.H., 1995. Strain, stress, neurodegeneration and longevity. *Mech. Ageing Dev.* 78, 75–83.
- Klein, A.W., 1983. Synaptic density correlated with maze performance in young and aged rats. A preliminary study. *Mech. Ageing Dev.* 21, 245–255.
- Lehtonen, L., Eskola, J., Vainio, O., Lehtonen, A., 1990. Changes in lymphocyte subsets and immune competence in very advanced age. *J. Gerontol.* 45, M108–112.
- Mackay, C.R., Imhof, B.A., 1993. Cell adhesion in the immune system. *Immunol. Today* 14, 99–102.
- Madden, K.S., Felten, L., 1995. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol. Rev.* 75, 77–106.
- Makinodan, T., Hahn, T.J., McDougall, S., Yamaguchi, D.T., Fang, M., Lida-Klein, A., 1991. Cellular immunosenescence: an overview. *Exp. Gerontol.* 26, 281–288.
- Ordy, J.M., Rolsten, C., Samorajski, T., Collins, R.L., 1964. Environmental stress and biological ageing. *Nature* 204, 724–727.
- Ortega, E., Barriga, C., De la Fuente, M., 1993. Aging and the non-specific immune response. *Facts Res. Gerontol.* 7, 23–29.
- Pawelec, G., Adibzadeh, M., Solana, R., Berman, I., 1997. The T-cell in the ageing individual. *Mech. Ageing Dev.* 93, 35–45.
- Pawelec, G., 1995. Molecular and cell biological studies of ageing and their application to considerations of T lymphocyte immunosenescence. *Mech. Ageing Dev.* 79, 1–32.
- Pawelec, G., Adibzadeh, M., Pohla, H., Schaudt, K., 1995. Immunosenescence: Ageing of the immune system. *Immunol. Today* 16, 420–422.
- Sansoni, P., Cossa Rizza, A., Brianti, V., Fagnoni, F., Snelli, G., Monti, D., Marcato, A., Passeri, G., Ortolani, C., Forti, E., et al., 1993. Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood* 82, 2767–2773.
- Saransaari, P., Oka, S.S., 1995. Age related changes in the uptake and release of glutamate and aspartate in the mouse brain. *Mech. Ageing Dev.* 81, 61–71.
- Solana, R., Villanueva, J.L., Peña, J., De la Fuente, M., 1991. Cell mediated immunity in ageing. *Comp. Biochem. Physiol.* 99A, 1–4.
- Springer, T.A., 1990. Adhesion receptors on the immune system. *Nature* 346, 425–433.
- Stein-Behrens, B.A., Sapolsky, R.M., 1992. Stress, glucocorticoids, and aging. *Aging Clin. Exp. Res.* 4, 197–210.
- Walford, R.L., 1969. *The Immunological Theory of Aging*, Munksgaard, Copenhagen, pp. 1–248.
- Zhang, L., Kokkonen, G., Roth, G.S., 1995. Identification of programmed cell death in situ in the striatum of normal adult rat brain and its relationship to neuronal death during aging. *Brain Res.* 677, 177–179.

The 3rd International Immunonutrition Workshop was held at Platja D'Aro, Girona, Spain on 21–24 October 2009

3rd International Immunonutrition Workshop

Session 9: Food ingredients, immunity and inflammation: animal and *in vitro* models

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

Mónica De la Fuente*

Department of Physiology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

Several immune functions are markers of health, biological age and predictors of longevity. A chronic oxidative and inflammatory state is the main cause of ageing and the immune system is involved in the rate of ageing. Thus, several murine models of premature ageing have been proposed owing to their early immunosenescence and oxidative stress, such as ovariectomised rats and mice, obese rats and anxious mice. In the last model, the most extensively studied by us, mice showing anxiety have an aged immune function and redox status as well as a shorter longevity in comparison with animals without anxiety of the same chronological age, being denominated prematurely ageing mice. A confirmation of the above is that the administration of diets supplemented with antioxidants improves the redox status and immune functions and increases the longevity of prematurely ageing mice. Antioxidant precursors of glutathione such as thioproline or N-acetylcysteine, which have a relevant role in ageing, have been the most widely investigated in adult prematurely ageing mice in our laboratory. In the present work, we have studied the effects of the ingestion for 5 weeks of a diet supplemented with 0.1% (w/w) thioproline+N-acetylcysteine on several functions of leucocytes from chronological old (69–73 weeks of age) prematurely ageing mice of two strains (Swiss and BALB/c). The results show an improvement of the immune functions, with their values becoming closer to those in adult animals (24 ± 2 weeks). Thus, an adequate nutrition with antioxidants, even in aged subjects, could be a good strategy to retard ageing.

Ageing: Immunosenescence: Leucocyte functions: Antioxidants

The ageing process and the concepts of biological age and longevity

The ageing process may be defined as a progressive and general deterioration of the functions of the organism that leads to a lower ability to adaptively react to changes and preserve homeostasis. As Strehler pointed out, four rules can define ageing. It is universal (practically all animals suffer ageing), progressive (the rate of ageing is similar at different ages after reaching the adult state), intrinsic

(its cause is endogenous) and deleterious (at least for individuals since it leads to their death)⁽¹⁾. Although the accumulation of adverse changes with the passing of time should not be considered a disease, it strongly increases the risk of disease, and finally results in death.

The ageing process is highly heterogeneous, and thus, there are different rates of physiological changes in the various systems of the organism and in the diverse members of a population of the same chronological age. This justifies the introduction of the concept of 'biological

Abbreviations: GSH, reduced glutathione; NAC, N-acetylcysteine; NK, natural killer; NPAM, non-prematurely ageing mice; PAM, prematurely ageing mice; TP, thioproline.

*Corresponding author: Professor Mónica De la Fuente, fax +34 913944935; email mondelaf@bio.ucm.es

ageing', which determines the level of ageing experienced by each individual and therefore his/her life expectancy. The biological age is related to the mean longevity, which can be defined as the mean of the time that the members of a population who have been born on the same date live. Subjects of a population with a higher rate of ageing show an older biological age and have a shorter lifespan. Since chronological age fails to provide an accurate indicator of the ageing process, it is necessary to select parameters useful as biomarkers of ageing to find out the rate of ageing and therefore the probable longevity of each subject⁽²⁾.

An integrated theory of ageing: how, where and why of ageing

Almost 400 single-cause theories have been proposed to explain the ageing process⁽³⁾, giving only partial explanation for the causes and effects of ageing. Recently, an integrated theory has been published⁽²⁾ attempting to answer the three important questions of biogerontology: the 'how', the 'where' and the 'why' of ageing. In answer to the question 'how' ageing happens, it is proposed that the ageing process is a chronic oxidative stress condition (increase of oxidant compounds and decrease of antioxidant defences). Thus, it is linked to many age-related changes that affect a large number of parameters including morphology, physiology and behaviour at all levels of organization: molecular, cellular, tissue, organic and that of the whole individual. In addition, since emerging evidence shows the close link between oxidation and inflammation, and since with ageing the pro-inflammatory compounds increase to levels higher than those of the anti-inflammatory compounds, leading to inflammatory stress, an oxidative and an inflammatory state have been suggested as the cause of the loss of function that appears with senescence⁽²⁾. To answer 'where' the ageing process starts, it is proposed that this happens in the mitochondria of post-mitotic and differentiated cells. With respect to 'why' ageing happens, the answer seems to be found in several evolutionary theories and related concepts published a long time ago. Hence, ageing is a consequence of characteristics selected by evolution as an advantage for the young subjects of the species allowing them to reach the reproductive age in the best condition and thus preserve the species. However, these characteristics are a disadvantage for old subjects (not needed for species maintenance). An example is the expression of more pro-oxidant and pro-inflammatory genotypes, which allow the reaching of the reproductive age with more probability since the subjects are more able to survive infections. The consequence after adult age is the establishment of what has been called 'oxi-inflamm-ageing'⁽²⁾.

Immunosenescence: the immune system as a marker of biological age and predictor of longevity

Ageing is associated with an impairment of physiological systems including the immune system, which has evolved to protect individuals against infections and cancers.

In fact, with the passage of time there is an increase of infectious and cancerous processes, which exert a great influence on the age-related morbidity and mortality^(4,5). Indeed, the increased death rate found in aged populations is due in great proportion to infections^(5,6). The profound impact of ageing on immunity is presently accepted. Thus, although there are contradictory results, almost every component of the immune system undergoes striking age-associated re-structuring. This leads to changes that may include not only diminished, but also enhanced functions. Therefore, the changes of the immune system with ageing are termed immunosenescence. Despite the rapidly increasing amount of data on immunosenescence in the last few decades^(2,7-11), the puzzle of all the changes in the different aspects of the immune function with age has not yet been solved. Nevertheless, the pronounced age-related decrease in T-cell functions is evident, specially in the T-cell helper, which affects humoral immunity and causes an impaired B-cell function^(2,7). In the cells of innate immunity, the phagocytic cells show functions that decrease with ageing and others that are over activated^(2,11-13), whereas the anti-tumoral activity of natural killer (NK) cells, in most of the work, shows an age-related decrease^(2,11,14).

In addition, it has been demonstrated that the competence of the immune system is an excellent marker of health^(2,4,8,15,16) and several age-related changes in immune functions, such as low T-cell proliferative responses, IL-2 secretion and NK cell cytotoxicity, have been linked to longevity^(2,15,16). In previous studies, the earlier-mentioned functions and other immune functions, in lymphocytes and phagocytes, have been established as markers of biological age and therefore as predictors of longevity^(2,13,16,17). These functions have shown similar age-related changes in human subjects (studied from the adult age of 20 until 80, in leucocytes of peripheral blood), and in mice (throughout the life of these animals, with a mean life span of 2 years, in their peritoneal leucocytes)⁽²⁾. In order to identify the above parameters as markers of biological age, it is necessary to confirm that the levels shown in particular subjects reveal their real health and senescent conditions. This has been achieved in the following two ways: (A) Ascertaining that the individuals with those parameters showing levels older than those of most subjects of the same population, sex and chronological age, die before their counterparts. This can be confirmed only in experimental animals. (B) Finding that the subjects reaching a very advanced age, preserve these immune functions at levels similar to those of adults. This can be tested on both humans (centenarians) and experimental animals, such as extremely long-lived mice. While biologically older animals showing the immune competence levels characteristic of chronologically older individuals have been found to die prematurely^(2,17), centenarians and long-lived mice exhibit a high degree of preservation of several immune functions, which may be related to their ability to reach a very advanced age in a healthy condition^(2,13,18-20). All the above results confirm that the immune system is a good marker of biological age and a predictor of longevity. Moreover, since the evolution of these immune functions is similar in mice and human subjects, it can be assumed that

those human subjects showing immune parameters at the levels of older subjects have a higher biological age and a shorter longevity⁽²⁾.

Neuro-endocrine-immune communication in ageing. The role of the immune system in oxi-inflamm-aging and in the age-related loss of homeostasis

The immune system does not work alone, since the three regulatory systems, namely the nervous, the endocrine and the immune systems, are intimately linked and interdependent. Thus, there is a 'neuroendocrine-immune' system that allows the preservation of homeostasis and therefore of health^(21,22). The communication between these systems has allowed the understanding of why situations of depression, emotional stress and anxiety are accompanied by a greater vulnerability to infections, cancers and autoimmune diseases, which agrees with the concept that the immune system is affected^(2,23,24).

The impairment of physiological systems with ageing especially affects the three regulatory systems and their communication. This seems to justify the loss of homeostatic capacity and the resulting increase of morbidity and mortality that appears with ageing^(2,16). In addition, the age-related changes in the organism are linked to a chronic oxidative and inflammatory stress affecting all cells and especially those of the regulatory systems, which explains their impaired function^(2,16). Thus, immunosenescence has as its basis an oxidative and inflammatory stress situation, and the theory of oxidation-inflammation in ageing, recently proposed^(2,16), integrates the idea of 'inflamm-aging'⁽²⁵⁾ with the oxidation theory of ageing^(2,16). According to this theory, chronic oxidative and inflammatory stress lead to the damage of cell components, including proteins, lipids and DNA, contributing to the age-related decline of physiological functions, especially in cells of the regulatory systems, including the immune system. Moreover, the immune system, due to its capacity of producing oxidant and inflammatory compounds in order to eliminate foreign agents, could be involved with the rate of ageing, increasing oxidation and inflammation, if the age-related oxidative and inflammatory stress are not well controlled^(2,16). In this context, a relationship has been found between the redox and inflammatory state of the immune cells, their functional capacity and the lifespan of a subject. Thus, when an animal shows a high-oxidative stress in its immune cells, these cells have an impaired function and that animal shows a decreased longevity. This happens in chronologically and biologically older human subjects and mice^(2,17). On the contrary, subjects who achieve greater longevity, such as human subject centenarians and extremely long-lived mice, show a preserved redox state and immune functions^(2,13,19,20). One of the most relevant mechanisms involved in the cellular redox state is the NF- κ B. This transcription factor plays a key role in regulating the expression of a wide range of oxidants and inflammatory compounds, especially in the immune cells, and increases in many chronic inflammatory diseases. In fact, it has been observed that the NF- κ B activation, in resting conditions, is very high in leucocytes

from old mice, but lower in extremely long-lived mice and adult animals⁽¹⁹⁾. Moreover, only old subjects with controlled basal NF- κ B activation in leucocytes achieved longevity. Adults with a high basal expression of this factor, died early⁽¹⁹⁾.

In conclusion, only aged individuals who maintain a good regulation of the leucocyte redox state and consequently a good function of their immune cells, with levels similar to those of healthy adults, reach very high longevity. Thus, the immune system seems to be a good predictor of longevity^(2,19,20).

Murine models of premature immunosenescence

Support for the above oxidation-inflammation theory of ageing and especially for the role of the immune system in ageing, may be obtained by the study of animal models in which subjects showing premature immunosenescence and a high oxidative and inflammatory stress in their immune cells (and in other cells), show decreased longevity in relation to other members of the group of the same chronological age. In this context, several murine models, such as the following, have been investigated and developed during the last few years as novel approaches to assess premature ageing and the above-mentioned idea.

Menopausal models

Menopausal women as well as ovariectomised rats and mice (a good model for mimicking human menopause) constitute a model for assessing premature ageing, since they show premature immunosenescence and a high oxidative stress condition^(2,26-28). Thus, ovariectomised female rats and mice show a redox state and function in leucocytes similar to those in males^(2,27). In mammalian species, males have a higher oxidative state and a worse function in their immune cells than those of females, having a lower mean life span than the latter^(2,27,29). This fact is due to oestrogens resulting in a less oxidized condition⁽³⁰⁾.

Obesity models

Obese subjects show a higher incidence of infections and some types of cancer, suggesting an impaired immune function. In general, the scarce studies on the immunity state in obese compared to non-obese subjects of the same chronological age, show a worse immune function, which have been observed in both genetically and diet-induced obese rats^(2,31-33). Moreover, obesity is associated with an inflammatory state⁽³²⁾, and immune cells from obese rats show premature immunosenescence as well as an oxidative stress situation^(2,33).

Models of poor response to stress, anxiety and depression

It is accepted that an inadequate response to stress is one of the conditions leading to an acceleration of ageing, accompanied by an impaired immune system and other physiological systems^(2,16,17). Thus, it has been shown that mice with chronic hyper-reactivity to stress and anxiety show a premature immunosenescence, a higher oxidative

stress and a shorter lifespan. These animals show premature ageing⁽¹⁷⁾, and this model will be explained in more detail later. Recently, it has also been observed that mice exposed to the stressful condition of isolation have behavioural responses that reveal a certain degree of depression and a more evident immunosenescence than control animals of the same age housed in groups⁽³⁴⁾. In addition, human subjects suffering chronic anxiety or depression show a significant premature immunosenescence and oxidative stress^(23,24).

Model of prematurely ageing mice

A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence has been established⁽¹⁷⁾. The animals are termed prematurely ageing mice (PAM), in contrast to the non-prematurely ageing mice (NPAM) of the same population, sex and chronological age, are identified by their poor response in a simple T-maze exploration test. This provides strong support for the concept that the nervous and the immune systems are closely linked. In mice showing premature ageing, it has been observed that several immune functions were similar to those of chronologically older mice. In addition to a more significant immunosenescence, the PAM exhibited high levels of anxiety and emotionality, showing a brain neurochemistry characteristic of older animals and an oxidative stress situation. Moreover, PAM also had increased baseline corticosterone and a blunted stress response when compared to NPAM. Nevertheless, the most convincing evidence that the immune function parameters studied are useful markers of biological age, is that the PAM showed a shorter lifespan than their NPAM counterparts^(2,16,17).

Effects of a diet supplemented with antioxidants in ageing and immunosenescence

Ageing cannot be 'eliminated', it can only be mitigated, i.e. making the process slower. Since the base of the functional longevity of each subject is health maintenance, and this depends on the genes (approximately 25%) and on the lifestyle and environmental factors (75%), it is possible to retard the rate of ageing through the modulation of these factors such as nutrition⁽²⁾. Among all the aspects that can be considered good nutrition, the antioxidant compounds present in the diet seem to be the most effective. As mentioned above, ageing is the result of a chronic oxidative stress with an oxidant-antioxidant imbalance due to an excess of the oxidants and a decrease or impairment of the antioxidant defences⁽²⁾. In fact, a confirmation of this is the age-related decrease of several antioxidants^(26,35) as well as the increase of longevity in animals that received these antioxidants in their diet^(36,37).

Moreover, nutritional status has a marked effect on immune response in elderly individuals⁽³⁸⁾. Since the functional state of the immune system is a marker of health, biological age and a predictor of longevity, it would be convenient to test the effects of a strategy such as diets rich in antioxidant compounds to retard the ageing process,

analysing immune cell functions and their redox state as well as the mean longevity of the subjects. The administration of antioxidants could prevent the age-related imbalance of oxidants-antioxidants in the immune cells. Nevertheless, it should be considered that the immune cells need to produce oxidants to carry out their functions and thus, they may exhaust their reserves of antioxidants⁽²⁾. This could help to explain why, in both adult experimental animals and human subjects, the functional capacities of the immune cells improve after diet supplementation with the appropriate amount of antioxidants⁽²⁾. It is evident that the amount of antioxidants needed by the immune cells in old subjects is higher than that in adults, since these cells show an age-related impairment of redox regulation with a higher production of oxidants and lower levels of antioxidant defences^(2,39). Thus, the administration of compounds such as vitamins C and E, polyphenols and precursors of reduced glutathione (GSH; taurine, thioproline (TP) and N-acetylcysteine (NAC), among others) in isolation, in nutritional formulations or through food rich in these compounds, has been shown to improve the immune functions and decrease the oxidative stress in leucocytes and in other cells of the organism⁽²⁾. These effects have been shown in adults, but especially in prematurely ageing subjects and in chronologically elderly men, women and mice^(2,11,16,26). Moreover, the confirmation of the central role of the immune system in ox-inflammatory-ageing is that the administration of adequate amounts of antioxidants in the diet, increases the longevity of the subjects⁽²⁾. This has been observed in experimental animals such as mice with a lifespan of 2 years. Since the improvement in the immune function and redox state found with antioxidant supplementation is similar in human subjects and mice, and because these changes in mice are accompanied by an increase in lifespan, it is probable that similar effects could be observed in human subjects. These antioxidants seem to have a direct effect on the immune cells since they improve the same immune cell and redox parameters *in vitro* as well as *ex vivo* after their ingestion in the diet⁽²⁾.

The effects of the dietary supplementation with antioxidants on immune cell functions and their redox state have been observed in several of the models of premature ageing mentioned earlier. The results found with mice suffering anxiety, the premature ageing model previously mentioned, will be discussed in the next section. In the murine model of ovariectomy, an improvement of several immune functions by a five-week ingestion of a diet enriched (1 mg/mouse/d) in soyabean isoflavones and green tea has been observed in ovariectomised old mice⁽⁴⁰⁾. This agrees with the overall observation that any positive change in the diet is more effective in improving immune response in subjects of a biological older population^(2,16,17).

Effects of a diet supplemented with antioxidants on a model of prematurely ageing mice

In the model of PAM the effect of a diet supplemented with appropriate amounts of antioxidants on many

immune functions and oxidative stress parameters, which were previously accredited as markers of biological age, has been extensively studied⁽¹⁷⁾. A dietary supplementation of biscuits enriched with nutritional doses of vitamin C and E, zinc, selenium and β -carotenes, for 15 weeks, with both 5% and 20% (w/w), improves the function and redox balance of peritoneal immune cells from chronologically adult (27–31 weeks of age) and mature (48–52 weeks of age) PAM and NPAM animals. However, the effects were stronger in PAM, and 20% supplementation was more effective than 5%^(17,41). This supplementation with 20% of biscuits enriched with antioxidants also improved the functions and redox balance of the immune cells from chronologically young (16–20 weeks of age) PAM after only 5 weeks of ingestion^(42,43). Moreover, a supplementation with 20% (w/w) of polyphenol-rich cereals, for 5 weeks, improved the immune cell functions in young (16–20 weeks of age) PAM⁽⁴⁴⁾.

The type of antioxidant supplementation most frequently studied in PAM and NPAM has been that using sulphur-containing antioxidants that are precursors of GSH⁽¹⁷⁾. These antioxidants have been shown to increase longevity^(36,37). GSH is the most abundant non-protein thiol in mammalian cells, being considered essential for their survival, and with an important role in many biological processes⁽²⁾. An increase in the levels of GSH reinforces antioxidant protection, preserves the intracellular redox state and the cellular function^(2,26,35). Therefore, optimal immune functions, such as T-cell proliferation among others, will require proper levels of GSH^(2,26,35). In previous studies, it has been observed that GSH stimulates many immune functions *in vitro* and protects cells against apoptosis⁽²⁾. The two antioxidant GSH precursors most often studied and used in the present work have been TP and NAC. TP is an antioxidant present in mitochondria, which can increase the levels of GSH⁽³⁷⁾ and thus increases the longevity^(36,37). Although this is an aspect very little studied, in previous investigations, it has been shown that TP *in vitro* improves several functions of immune cells from mice, as well as the activity of antioxidant enzymes⁽²⁾. In aged mice, the supplementation with TP (0.07 (w/w), for 5 weeks) improved several immune functions⁽⁴⁵⁾. NAC is an antioxidant that acts as a GSH precursor^(26,35) and also neutralizes free radicals in a direct manner. This antioxidant action has been observed in immune cells from mice with endotoxemic shock, a situation of high oxidative stress⁽⁴⁶⁾. NAC *in vitro* increases several functions of peritoneal macrophages from adult mice in a similar way to GSH, as well as the activity of antioxidant enzymes⁽²⁾. In elderly women, the ingestion of NAC improves several immune functions and the redox state⁽²⁶⁾.

In adult PAM, the supplementation of a diet with TP (0.1% (w/w) for 5 weeks) improves the peritoneal macrophage functions⁽⁴⁷⁾ and the same occurs with the supplementation with NAC⁽⁴⁸⁾. When the diet contains both TP and NAC (0.1% (w/w)), the supplementation for 4–5 weeks improves the function of immune cells in Swiss and BALB/c mice^(49,50).

Effects of a diet supplemented with two sulphur-containing antioxidants (thioprolin and N-acetylcysteine), precursors of reduced glutathione, on several leucocyte functions in old prematurely ageing mice of two strains

In previous studies, it has been shown that the ingestion of a diet supplemented with TP+NAC (0.1% (w/w)) by adult female Swiss and BALB/c mice for a short period of time (4–5 weeks) improves several immune functions such as chemotaxis, lymphoproliferative response to the mitogen concanavalin A, IL-2 release and NK activity in leucocytes from peritoneum, axillary nodes, spleen and thymus^(39,49). In the present work, it has been investigated whether this supplementation with 0.1% of TP+NAC for 5 weeks could be enough in chronologically old (69–73 weeks of age) PAM Swiss and BALB/c mice to improve those immune functions to the level of adult (22–26 weeks of age) animals.

Female mice of the Swiss and BALB/c strains (Harlan, Iberica, Spain) 20–24 weeks of age were maintained in sterile conditions at a constant temperature (20–24°C) on a 12/12 reversed light–dark cycle and fed water and Standard Sander Mus pellets (A.04 diet; Panlab LS, Barcelona, Spain) *ad libitum* until the moment of starting the experiment. At 64–68 weeks of age, the exploratory behaviour of each mouse was tested in a T-shaped maze. As previously described⁽¹⁷⁾, the mice that completed the exploration of the first arm of the maze four times in more than 20 s (once each week for 4 consecutive weeks) are considered PAM and those that spent less than that time are NPAM. At 69–73 weeks of age, eight groups of 10 animals each were used. In each strain, 10 PAM and 10 NPAM received a diet (A.04 diet; Panlab) supplemented with 0.1% (w/w) of both TP and NAC (Sigma, San Louis, MO, USA) for 5 weeks (PAMA and NPAMA, respectively). Two other groups of 10 PAM and 10 NPAM, of both strains, received a normal diet (PAMC and NPAMC, respectively) during that time. After 5 weeks, the mice were killed by cervical dislocation according to the European Community Council Directives 86/6091 EEC and the axillary nodes, spleen and thymus were removed. In parallel, a group of adult (20–26 weeks of age) Swiss and BALB/c mice were sacrificed.

The leucocyte suspensions from organs were obtained and the functions studied were evaluated following methods previously described⁽⁴⁹⁾. The chemotaxis was evaluated using a chamber with two compartments separated by a filter. The samples of leucocytes were deposited in the upper compartment and the chemoattractant (f -met-leu-phe, 10^{-8} mol/l) in the lower compartment. After 3 h incubation, the filters were fixed and stained and the number of leucocytes found in four scans of 5 mm each on the lower face of the filter was determined and nominated the chemotaxis index. The proliferation of lymphocytes was determined using a commercially available 5-bromo-2'-deoxyuridine ELISA (BrdU labelling and detection kit III; Boehringer, Mannheim, Germany). The leucocytes were incubated for 48 h in the absence (basal proliferation) or presence of the mitogen concanavalin A (1 mg/ml; Sigma). The absorbance of the samples (measured at

Table 1. Effect of a diet supplemented with two sulphur-containing antioxidants (thioprolone (TP) and N-acetylcysteine (NAC); 0.1% (w/w) for 5 weeks) on several functions of axillary node leucocytes from chronologically old prematurely and non-prematurely aged Swiss and BALB/c mice

(Mean values and standard deviations for 10 subjects)

	NPAMC		NPAMA		PAMC		PAMA		AC	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Swiss mice										
Chemotaxis	441	91 ^c	934	167***	260	64 ^{c†}	808	187***	860	120
Basal proliferation (absorbance)	0.18	0.02	0.17	0.05	0.15	0.05 ^a	0.16	0.02 ^b	0.21	0.03
Proliferation to Con A (absorbance)	0.36	0.06 ^c	0.50	0.09***	0.25	0.06 ^{c†}	0.62	0.06***	0.61	0.13
NK activity (lysis %)	28	6 ^c	36	4**	22	4 ^c	35	5**	44	5
IL-2 release (pg/ml)	152	39 ^c	210	36**	108	20 ^{c†}	143	40*	329	57
BALB/c mice										
Chemotaxis	474	106 ^c	898	158***	257	45 ^{c††}	638	161***	782	111
Basal proliferation (absorbance)	0.08	0.02 ^{b††}	0.09	0.03	0.07	0.01 ^{b††}	0.07	0.01	0.17	0.03†
Proliferation to Con A (absorbance)	0.33	0.04 ^c	0.46	0.09**	0.19	0.05 ^{c††}	0.26	0.04**	0.58	0.10
NK activity (lysis %)	25	3 ^c	41	6***	20	3 ^{c†}	34	4***	58	7†
IL-2 release (pg/ml)	226	24 ^{c††}	565	62***	149	23 ^{c††}	727	133***	418	66†

NPAM, non-prematurely ageing mice; PAM, prematurely ageing mice; NPAMC and PAMC, NPAM and PAM controls; NPAMA and PAMA, NPAM and PAM with antioxidant supplementation; AC, adult controls; Con A, concanavalin A; NK, natural killer.

The data were analysed statistically by the three-way ANOVA for unpaired observations, followed by the Scheffe's *F post-hoc* test. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001 with respect to the corresponding values in controls (NPAMC and PAMC). ^a*P*<0.05; ^b*P*<0.01; ^c*P*<0.001 with the corresponding values in adults. †*P*<0.05; ††*P*<0.001 with respect to the corresponding values in NPAMC. ‡*P*<0.05; ‡‡*P*<0.01 with respect to the corresponding values in Swiss mice.

Table 2. Effect of a diet supplemented with two sulphur-containing antioxidants (thioprolone (TP) and N-acetylcysteine (NAC); 0.1% (w/w) for 5 weeks) on several functions of spleen leucocytes from chronologically old prematurely and non-prematurely aged Swiss and BALB/c mice

(Mean values and standard deviations for 10 subjects)

	NPAMC		NPAMA		PAMC		PAMA		AC	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Swiss mice										
Chemotaxis	439	91 ^c	811	102***	343	80 ^{c†}	670	167***	718	139
Basal proliferation (absorbance)	0.19	0.01 ^b	0.20	0.05	0.16	0.02 ^{c††}	0.32	0.06***	0.23	0.04
Proliferation to Con A (absorbance)	0.40	0.08 ^b	0.41	0.07	0.22	0.05 ^{c†††}	0.46	0.09***	0.54	0.07
NK activity (lysis %)	21	3 ^c	28	3*** ^b	18	4 ^c	26	3*** ^b	45	8
BALB/c mice										
Chemotaxis	478	106 ^c	915	160***	282	93 ^{c††}	802	188***	874	175
Basal proliferation (absorbance)	0.12	0.04 ^{c††}	0.13	0.03 ^{b††}	0.12	0.03 ^{c††}	0.16	0.06†	0.20	0.03
Proliferation to Con A (absorbance)	0.31	0.07 ^{b†}	0.50	0.12**	0.21	0.07 ^{c††}	0.46	0.10***	0.43	0.07††
NK activity (lysis %)	25	5 ^c	38	5*** ^{b†}	16	2 ^{c†††}	30	3***	60	11†††

NPAM, non-prematurely ageing mice; PAM, prematurely ageing mice; NPAMC and PAMC, NPAM and PAM controls; NPAMA and PAMA, NPAM and PAM with antioxidant supplementation; AC, adult controls; Con A, concanavalin A; NK, natural killer.

The data were analysed statistically by the three-way ANOVA for unpaired observations, followed by the Scheffe's *F post-hoc* test. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001 with respect to the corresponding values in controls (NPAMC and PAMC). ^b*P*<0.01; ^c*P*<0.001 with the corresponding values in adults. †*P*<0.05; ††*P*<0.01; †††*P*<0.001 with respect to the corresponding values in NPAMC. ‡*P*<0.05; ‡‡*P*<0.01; ‡‡‡*P*<0.001 with respect to the corresponding values in Swiss mice.

405 nm, with a reference wavelength of 490 nm) is directly correlated with the level of 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporated into cellular DNA. The NK activity of the leucocytes was studied using an enzymatic colorimetric assay (Cytotox 96, Promega, Madison, WI, USA) for cytotoxicity measurements of target cells (yeast artificial chromosome-1 cells from a murine lymphoma) based on the determination of lactate dehydrogenase enzymatic activity using tetrazolium salt. After 4 h of incubation, the percentage lyses of target cells was calculated. The concentration of IL-2 was determined in culture supernatants of leucocytes from axillary nodes after 48 h of incubation with concanavalin A using an ELISA kit (R&D System, Minneapolis, MN, USA).

The results are shown in Tables 1–3 for leucocytes from axillary nodes, spleen and thymus, respectively. The chemotaxis indexes of leucocytes from axillary nodes, spleen and thymus (with similar values in both strains of mice) were in Swiss and BALB/c PAMC, smaller than in the corresponding NPAMC. In all cases, the values in old PAM and NPAM were lower than those in the adult animals. The ingestion for 5 weeks of a diet supplemented with TP+NAC increased, in general, with statistical significant differences, the chemotaxis in PAMA and NPAMA with respect to the corresponding controls (PAMC and NPAMC). Moreover, the ingestion of the antioxidants brought the levels of chemotaxis in aged animals close to those in adults.

Table 3. Effect of a diet supplemented with two sulphur-containing antioxidants (thioprolone (TP) and N-acetylcysteine (NAC); 0.1% (w/w) for 5 weeks) on several functions of thymus leucocytes from chronologically old prematurely and non-prematurely aged Swiss and BALB/c mice (Mean values and standard deviations for 10 subjects)

	NPAMC		NPAMA		PAMC		PAMA		AC	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Swiss mice										
Chemotaxis	350	58 ^c	756	118 ^{***}	248	67 ^c	635	180 ^{***}	550	140
Basal proliferation (absorbance)	0.13	0.02	0.15	0.03	0.08	0.02 ^{b††}	0.14	0.02 ^{***}	0.12	0.03
Proliferation to Con A (absorbance)	0.20	0.05 ^b	0.28	0.08 [*]	0.12	0.04 ^{c†††}	0.22	0.06 ^{**}	0.31	0.05
NK activity (lysis %)	14	3 ^c	24	3 ^{***a}	11	2 ^{c†}	23	3 ^{***a}	32	5
BALB/c mice										
Chemotaxis	311	49 ^c	402	85	148	45 ^c	367	99 ^{***}	620	30
Basal proliferation (absorbance)	0.07	0.01 ^{c‡‡‡}	0.10	0.03 ^{**}	0.07	0.01 ^c	0.08	0.02 ^{b‡‡}	0.16	0.02‡
Proliferation to Con A (absorbance)	0.12	0.04 ^{c‡‡}	0.31	0.07 ^{***}	0.08	0.03 ^{c†‡}	0.15	0.03 ^{***b‡}	0.35	0.07
NK activity (lysis %)	21	4 ^{c†‡}	28	3 ^{**b}	14	3 ^{c†††‡}	29	3 ^{***b‡}	67	8††‡

NPAM, non-prematurely ageing mice; PAM, prematurely ageing mice; NPAMC and PAMC, NPAM and PAM controls; NPAMA and PAMA, NPAM and PAM with antioxidant supplementation; AC, adult controls; Con A, concanavalin A; NK, natural killer. The data were analysed statistically by the three-way ANOVA for unpaired observations, followed by the Scheffe's *F post-hoc* test. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ with respect to the corresponding values in controls (NPAMC and PAMC). ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$; ^c $P < 0.001$ with the corresponding values in adults. † $P < 0.05$; †† $P < 0.01$; ††† $P < 0.001$ with respect to the corresponding values in NPAMC. ‡ $P < 0.05$; ‡‡ $P < 0.01$; ‡‡‡ $P < 0.001$ with respect to the corresponding values in Swiss mice.

With respect to basal proliferation, there are differences between Swiss and BALB/c mice, the latter showing lower values. In general, the levels of proliferation in PAMC and NPAMC were lower than those in adults. The supplementation only increased the basal proliferation in cells from spleen and thymus of PAMA. Nevertheless, the proliferative response of lymphocytes to concanavalin A, which was lower in all cases in PAMC with respect to the corresponding NPAMC and also in all the old NPAMC and PAMC with respect to the values in the corresponding adults, increased after the supplementation. Moreover, the values in aged PAMA and NPAMA were generally similar to those in adults. The NK activity was, in general, smaller in PAMC with respect to NPAMC and in all cases in PAMC and NPAMC when the values were compared with those corresponding in adults. The ingestion of a supplementation of sulphur-containing antioxidants increased the NK activity in all cases bringing the values closer to those in adults although they did not reach those values. The IL-2 release in lymphocytes from axillary nodes (Table 1) was higher in cells from BALB/c mice than in those from Swiss. In both Swiss and BALB/c PAMC groups, there were significant decreases in the levels of this cytokine with respect to those in NPAMC, and in all groups of old animals (both NPAMC and PAMC) the values were lower than in adults. After the antioxidant supplementation in all the groups, there were significant increases of IL-2 concentrations bringing them close to the levels of adults, a change that was more evident in BALB/c mice.

Since all the functions studied are markers of biological age in mice and predictors of longevity⁽²⁾, the present data show that the ingestion of a low amount (0.1% (w/w)) of two antioxidants such as TP+NAC for a short term (5 weeks) decreases the biological age of mice making it more similar to that of chronological adults. Moreover, this effect was found in two different strains of mice, outbred Swiss and inbred BAB/c mice, and in chronologically old PAM and NPAM, but more extensively in PAM. In a

previous study, it has been observed that in chronologically adult PAM and NPAM this kind of supplementation was also more effective in PAM than in NPAM, and in Swiss mice than in BALB/c mice⁽⁴⁹⁾. However, in adult mice, the supplementation was, in general, less effective than in old animals, since the present results show that practically all the functions studied in leucocytes have been improved after the ingestion of the diet supplemented with the antioxidants (Tables 1–3). Although in chronologically old Swiss mice an ingestion of a high concentration of these antioxidants (0.3%) caused a stimulation of several of the functions studied here, this concentration in the adults decreased those functions and increased the oxidative stress of the animals⁽³⁹⁾. In the present study, the mice were chronologically old, but they were divided into two groups with different biological age, since NPAM are always biologically younger than PAM of the same age⁽¹⁷⁾. Based on the present results, 0.1% (w/w) TP+NAC seems an appropriate amount to improve immune function in aged mice. Nevertheless, further research on the effects of higher amounts of those antioxidants in old PAM and NPAM should be carried out.

Conclusion

A similar diet to that used in the present work, also ingested for 5 weeks, improved several peritoneal macrophage functions in chronologically adult Swiss mice, in NPAM and especially in PAM⁽⁵⁰⁾, with these animals showing an increased longevity (N Guayerbas and M De La Fuente unpublished results). Since the improvement of the immune functions studied in peritoneal leucocytes after antioxidant supplementations is very similar to that found in the immune cells from organs such as axillary nodes, spleen and thymus, it is possible that the immune 'rejuvenation' found in the present work could allow an increase of the longevity of animals. Thus, the ingestion of a diet with adequate concentrations of antioxidants, even in chronologically and biologically aged subjects, seems to be

a good strategy to maintain health and retard the inevitable ageing process.

Acknowledgements

This work was supported by the following grants: MEC (BFU 2005-06777), MICINN (BFU2008-04336), UCM Research Group (910379ENEROINN) and RETICEF (RD06/0013/0003) (ISCIII) of Spain. The author declares no conflict of interest.

References

1. Strehler BL (1977) *In Time, Cells and Aging*. New York: Academic Press.
2. De la Fuente M & Miquel J (2009) An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxy-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* **15**, 3003–3026.
3. Medvedev ZA (1990) An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* **65**, 375–398.
4. Wayne SL, Rhyne RL, Garry PJ *et al.* (1990) Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* **45**, M45–M48.
5. High KP (2004) Infection as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing Res Rev* **3**, 1–14.
6. Castle SC, Uyemura K, Fulop T *et al.* (2007) Host resistance and immune responses in advanced age. *Clin Geriatr Med* **23**, 463–479.
7. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R *et al.* (2002) T cells and aging. *Front Biosci* **7**, d1056–d1083.
8. De la Fuente M, Hernanz A & Vallejo C (2005) The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1356–1366.
9. Gruver AL, Hudson LL & Sempowski GD (2007) Immunosenescence of aging. *J Pathol* **211**, 144–156.
10. Aw D, Silva AB, Palmer DB (2007) Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* **120**, 435–446.
11. 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.
12. Gomez CR, Nomellini V, Frunce DE *et al.* (2008) Innate immunity and aging. *Exp Gerontol* **43**, 718–728.
13. Alonso-Fernandez P, Puerto M, Maté I *et al.* (2008) Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of adults. *J Am Geriatr Soc* **56**, 2244–2251.
14. Solana R, Pawelec G & Tarazona R (2006) Aging and innate immunity. *Immunity* **24**, 491–494.
15. De la Rosa 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.
16. De la Fuente M (2008) Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation* **15**, 213–223.
17. Viveros MP, Arranz L, Hernanz A *et al.* (2007) A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* **14**, 157–162.
18. Puerto M, Guayerbas N, Alvarez P *et al.* (2005) Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol* **165**, 33–40.
19. Arranz L, Caamano J, Lord JM *et al.* (2010) Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor-kappaB. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**, 941–950.
20. Arranz L, Lord JM & De la Fuente M (2010) Preserved ex vivo inflammatory status and cytokine responses in naturally long-lived mice. *Age* (doi: 10.1007/s11357-010-9151-y).
21. Wrona D (2006) Neural-immune interactions: An integrative view of bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* **172**, 38–58.
22. Besedovsky HO & Del Rey A (2007) Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun* **21**, 34–44.
23. Arranz L, Guayerbas N & De la Fuente M (2007) Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res* **62**, 1–8.
24. Arranz L, De Vicente A, Muñoz M *et al.* (2009) Impaired immune function in a homeless population with stress-related disorders. *Neuroimmunomodulation* **16**, 251–260.
25. Franceschi C (2007) Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? *Nutr Rev* **65**, S173–S176.
26. Arranz L, Fernandez C, Rodriguez A *et al.* (2008) The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic Biol Med* **45**, 1252–1262.
27. De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N *et al.* (2004) Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology* **5**, 389–400.
28. Baeza I, De Castro NM, Gimenez-Llort L *et al.* (2010) Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *J Neuroimmunol* **219**, 90–99.
29. Guayerbas N & De la Fuente M (2003) An impairment of phagocytic function linked to shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol* **27**, 339–350.
30. Viña J, Sastre J, Pallardo FV *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.
31. Lamas O, Marti A & Martinez JA (2002) Obesity and immunocompetence. *Eur J Clin Nutr* **56**, 542–545.
32. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C *et al.* (2006) Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* **17**, 4–12.
33. De la Fuente M & De Castro NM (2010) Obesity as a model of premature immunosenescence. *Curr Immunol Rev* (In the Press).
34. Arranz L, Gimenez-Llort L, De Castro NM *et al.* (2009) Social isolation during old age worsens cognitive, behavioral and immune impairment. *Rev Esp Geriatr Gerontol* **44**, 137–142.
35. Droge W (2005) Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome? *Phil Trans R Soc B* **360**, 2355–2372.
36. Miquel J & Ecnómos AC (1979) Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidin carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol* **14**, 279–285.
37. Richie JP Jr, Mills BJ & Lang CA (1987) Correction of a glutathione deficiency in the aging mosquito increase its longevity. *Proc Soc Exp Biol Med* **184**, 113–114.
38. Lesourd B (2006) Nutritional factors and immunological ageing. *Proc Nutr Soc* **65**, 319–325.
39. De la Fuente M, Guayerbas N, Catalán MP *et al.* (2002) The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve the

- immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Radic Res* **36**, 119–126.
40. Baeza I, De Castro NM, Alvarado C *et al.* (2007) Improvement of immune cell functions in aged mice treated for 5 weeks with soybean isoflavones. *Ann NY Acad Sci* **1100**, 497–504.
 41. Alvarado C, Alvarez 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.
 42. Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L *et al.* (2005) Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1203–1210.
 43. Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L *et al.* (2006) Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants. *Dev Comp Immunol* **30**, 1168–1180.
 44. Alvarez P, Alvarado C, Puerto M *et al.* (2006) Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals. *Nutrition* **22**, 913–921.
 45. De la Fuente M, Ferrández MD, Del Rio M *et al.* (1998) Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline. *Mech Ageing Dev* **104**, 213–225.
 46. Victor VM, Rocha M, Esplugues JV *et al.* (2005) Role of free radicals in sepsis: Antioxidant therapy. *Curr Pharm Des* **11**, 3141–3158.
 47. Correa R, Blanco B, Del Rio M *et al.* (1999) Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. *Biofactors* **10**, 195–200.
 48. Puerto M, Guayerbas N, Victor VM *et al.* (2002) Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behav* **73**, 797–804.
 49. Guayerbas N, Puerto M, Ferrandez MD *et al.* (2002) A diet supplemented with thiolic antioxidants improves leukocyte function in two strains of prematurely ageing mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**, 1009–1014.
 50. Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P *et al.* (2004) Improvement of the macrophage functions in premature ageing mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. *Cell Mol Biol* **50**, OL677–OL681.



*Improvement of leucocyte functions
in mature and old mice after 15 and
30 weeks of diet supplementation with
polyphenol-rich biscuits*

*Mónica De la Fuente, Sonia Medina,
Isabel Baeza & Liliana Jiménez*

European Journal of Nutrition

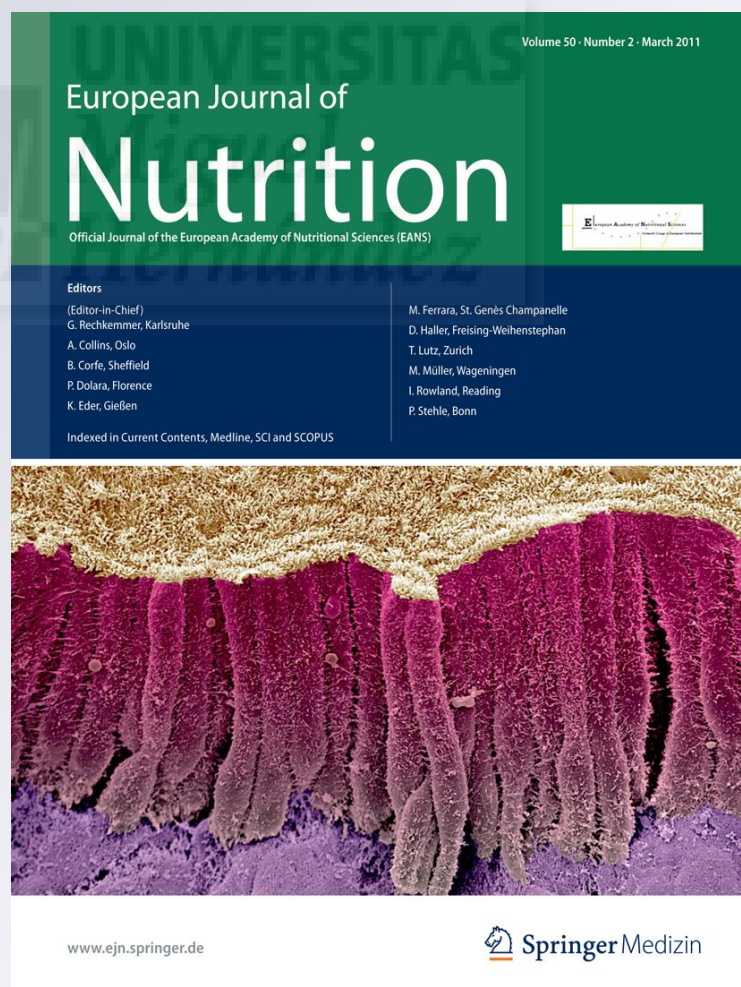
ISSN 1436-6207

Volume 50

Number 7

Eur J Nutr (2011) 50:563-573

DOI 10.1007/s00394-010-0163-2



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Improvement of leucocyte functions in mature and old mice after 15 and 30 weeks of diet supplementation with polyphenol-rich biscuits

Mónica De la Fuente · Sonia Medina ·
Isabel Baeza · Liliana Jiménez

Received: 31 August 2010 / Accepted: 21 December 2010 / Published online: 8 January 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

Purpose To study the effect of diet supplementation with polyphenols on several functions suffering age-related changes, in peritoneal leucocytes from mature and old mice.

Methods Five groups of female ICR mice were used. Four groups received a supplementation (20% wt/wt) of biscuits with different cereal fractions naturally rich in polyphenols (named CO49, CO50, CO52, CO53), containing different amounts of catechin, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, p-coumaric acid, sinapic acid, ferulic acid, rutin and oryzanol. The control group received only standard maintenance diet. Peritoneal suspensions were obtained after 15 and 30 weeks of diet supplementation, when the age of the animals was 49 ± 2 (mature mice) and 64 ± 2 weeks (old mice), respectively. The functions analysed were: chemotaxis of macrophages and lymphocytes, phagocytosis of particles by macrophages, intracellular superoxide anion levels, lymphoproliferative response to mitogens (concanavalin A and lipopolysaccharide), interleukin-2 secretion and natural killer (NK) activity, as functions that decrease with age, and adherence of macrophages and lymphocytes and tumour necrosis factor- α secretion as functions with age-related increase.

Results The supplementation, in general, increased the functions that decrease with age and decreased those that increase with age. There were differences in the effects

shown by the four kinds of biscuits depending on the function studied and the number of weeks of supplementation.

Conclusion Since the immune system has been proposed as a good marker of health and predictor of longevity, diet supplementation with cereals naturally rich in polyphenols could be an important way for health preservation with age and reaching high longevity.

Keywords Leucocyte functions · Polyphenols · Ageing · Mice

Introduction

The immune system, like other physiological systems, suffers age-related changes, which are denominated immunosenescence, with the most pronounced alterations being found in T lymphocytes, although other immune cells such as natural killer (NK) cells, macrophages and B lymphocytes also suffer important changes in their functions with ageing [1, 2]. The main causes of the ageing process seem to be related to oxygen free radicals that injure different biomolecules because of their high reactivity [3, 4]. Moreover, immune cells are especially involved in free radical generation in order to carry out their function, but these free radicals can produce oxidative damage in the immune cells and in the organism if they surpass their antioxidant defence capacity. Thus, an oxidant-antioxidant balance is needed to maintain a correct immune function and the unbalance with more oxidant than antioxidant defences, i.e., the oxidative stress, as occurs in ageing, is the basis of immunosenescence [2, 5]. In addition, it is also known that the immune cell function is a health biomarker and longevity predictor [2, 6, 7]. Recently, it has been suggested that the immune cells can

M. De la Fuente (✉) · S. Medina · I. Baeza
Department of Physiology (Animal Physiology II),
Faculty of Biological Sciences, Complutense University,
c/Jose Antonio Novais no. 2, 28040 Madrid, Spain
e-mail: mondelaf@bio.ucm.es

L. Jiménez
Danone Research, Centre de Recherche Daniel Carasso,
RD 128, 91767 Palaiseau Cedex, France

be involved in the age-related oxi-inflamm-aging situation of the organism, increasing, if these cells suffer a premature immunosenescence, the rate of ageing of the individual [2]. Thus, the ingestion of diets rich in antioxidant compounds has been proposed as a strategy to slow down the immunosenescence and consequently the rate of ageing [2, 8]. Although there is a great deal of information on the effects of antioxidant compounds on the immune function [2, 8, 9], there are several controversial results with respect to positive effects of antioxidant supplementations, which are mainly due to the type of antioxidants, the time of supplementation and especially the doses used and the age of the subjects [2, 8–11].

Polyphenols are the most abundant antioxidants in our diet, but there are few studies on the effects of foods naturally rich in phenolic compounds, such as those present in cereals, on the immune functions, and these effects are unknown in the aged subjects. Polyphenols, both flavonoids and phenolic acids, show free radical scavenging activities [12–14], but also have other important biological effects including immunomodulatory, antibacterial, antigenotoxic and anti-inflammatory activities [14–20]. Moreover, dietary polyphenol intake seems to prevent different diseases such as degenerative and cardiovascular diseases as well as their risk factors [20–24]. Although there are several studies on the effect of polyphenol compounds on the immune function, which show positive effects on immune cell activities [25–27], research on the physiological effects of diets providing nutritional doses of polyphenols as components of regular foods is still scarce [28, 29]. In a previous study, we showed an improvement of function and redox parameters in leucocytes from adult mice after receiving a diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals [30]. Although this supplementation also improved immune functions in adult but prematurely ageing mice [31], the effects on aged animals and with a long period of supplementation have not been studied. Thus, the main aim of the present work was to evaluate whether, in mature and old mice, a long-term exposure to diet supplementation during 15 and 30 weeks with biscuits (made with natural fractions of different cereals in order to increase the diversity and quantity of polyphenols naturally present in them but in physiological doses) affects several immune functions, which have been demonstrated by us and other authors to suffer age-related changes and be possible biomarkers of longevity [1, 2, 6, 32, 33].

Materials and methods

Animals and maintenance

Female ICR (CD-1) mice (*Mus musculus*) (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain), 32 ± 2 weeks old were used. The mice

were specific pathogen-free, as tested by Harlan according to FELASA recommendations, and did not show any sign of malignancy or other pathological processes. Fifty animals were randomly divided into five groups and maintained for 2 weeks for their adaptation to their new location. After this time, four of these groups received a diet with natural polyphenol-rich biscuits and one received standard diet (control group). The animals were housed in polyurethane boxes (ten mice/box), at a constant temperature (22 ± 2 °C), in sterile conditions inside an aseptic air negative-pressure environmental cabinet (Flufrance, Cachan, France), on a 12/12 h reversed light/dark cycle. All mice were treated according to the guidelines of the European Community Council Directives 86/6091 EEC. The study was approved by the Ethical Committee on Animal Research of the Complutense University of Madrid (Spain).

Experimental groups

The control group received a 100% standard maintenance diet (AO4 diet from Panlab L.S. Barcelona, Spain), which does not contain polyphenols and water ad libitum. The diet was in accordance with the recommendations of the American Institute of Nutrition for laboratory animals. The four treated groups received 80% of control diet plus 20% of biscuits elaborated by Danone Vitapole (France) with cereal fractions naturally rich in polyphenols namely CO49, CO50, CO52, CO53 (composition reference included in Table 1). These naturally polyphenol-rich diets were kept in darkness at 4 °C for less than 3 weeks in order to prevent oxidation. Peritoneal suspensions were obtained to evaluate different immune parameters after 15 and 30 weeks of diet supplementation when the age of the animals was 49 ± 2 (mature mice) and 64 ± 2 weeks (old mice), respectively. Animals were the same in both periods of supplementation (they were supplemented for 15 weeks, and after collection of peritoneal suspensions the supplementation was maintained 15 weeks more).

Collection of peritoneal leucocytes

Peritoneal cellular suspensions were obtained between 8:00 and 10:00 h, without killing of the animals (mice were selected at random). The abdomen was cleansed with 70% ethanol, and 3 ml of sterile Hank's was injected intraperitoneally. After massaging the abdomen, 80% of the injected volume was recovered. Then, macrophage and lymphocyte functions were evaluated, with the macrophages being identified by their morphology and non-specific esterase staining, adjusted to 5.10^5 macrophages/ml and 1.10^6 lymphocytes/ml. Cellular viability, determined in

Table 1 Nutritional composition of biscuits tested

Biscuit	Cereal fraction composition (in % of total flour)	Energy (Kcal)	Proteins (g/100 g)	Lipids (g/100 g)	Carbohydrates (g/100 g)	Catechins (mg/100 g)	P-OH benzoic acid (mg/100 g)	Vanillic acid (mg/100 g)	P-Coumaric acid (mg/100 g)	Sinapic acid (mg/100 g)	Ferulic acid (mg/100 g)	Rutin (mg/100 g)	Oryzanol (mg/100 g)	Total polyphenols content (eq mg acid gallic/100 g)	Total antioxidant capacity (μmol TE/100 g)
CO49	20% of buckwheat, 10% of rice bran	453	7.7	18.24	64.5	0.60	2.30	3.60	1.70	4.80	8.40	0.47	0.24	1,700	510
CO50	20% of rice brand, 10% of buckwheat	448	7.75	19.32	60.7	0	0	0	3.10	14.10	10.10	0.24	0.48	2,000	550
CO52	20% of rice brand, 10% wheat middling	440	7.9	19.55	58.1	0.60	3.00	1.00	3.20	13.90	16.10	0	0.48	1,900	530
CO53	10% of buckwheat, 10% of rice bran, 10% of cold pressed wheat germ	447	9.0	18.69	60.6	0	0	0.40	1.50	12.60	10.00	0.95	0.24	1,900	510

each experiment using the trypan-blue exclusion test, was in all cases higher than 95%.

Assay of macrophage functions

The different steps of the phagocytic process, namely adherence, chemotaxis, phagocytosis and digestion (through the measure of superoxide anion levels) were evaluated.

Adherence capacity assay was performed following a method previously described [10]. Aliquots of 200 μl from the adjusted peritoneal suspension were placed in Eppendorf tubes and incubated 10 min at 37 °C. Adherence index (AI) was calculated according to the following expression: AI = (1–macrophage/ml supernatant after 10 min of incubation/macrophages/ml initial sample (time 0)) × 100.

Chemotaxis assay was performed according to a modification of the original technique described by Boyden [10], which consists in the use of chambers with two compartments separated by a filter with a pore diameter of 3 μm (Millipore, Bedford, MA). Aliquots of 300 μl of the adjusted peritoneal suspension were deposited in the upper compartment, and FMLP (formyl-met-leu-phe) at 10⁻⁸ M (Sigma, St. Louis, MO) was placed in the lower compartment as chemoattractant agent. Chambers were incubated 3 h at 37 °C and 5% CO₂ and then the filters were fixed and stained. Chemotaxis index was determined by counting the total number of macrophages or lymphocytes on one-third of the lower face of the filters, corresponding to four scans of 5 mm, using an optical microscope (×100 magnification).

Phagocytosis of inert particles (latex beads 1.09 μm diluted to 1% in PBS; Sigma St Louis, MO) was carried out following the method previously described [10]. Aliquots of 200 μl of the peritoneal suspension were placed in MIF (migratory inhibitory factor) plates for 30 min. The adherence monolayer was washed with PBS at 37 °C and then, this monolayer was resuspended in 200 μl of Hank's solution and incubated with 20 μl of latex. After 30 min of incubation, the plates were washed with PBS, fixed and stained, and the number of latex beads ingested by 100 macrophages was determined by optical microscopy.

Superoxide anion levels were evaluated following the method described by De la Fuente et al. [10], based on the nitroblue tetrazolium (NBT) reduction test in an equimolecular reaction with superoxide anion. Briefly, aliquots of 250 μl of peritoneal suspension were mixed with 250 μl of NBT solution (1 mg/ml; Sigma St Louis, MO). Aliquots of 50 μl of latex beads were added to the stimulated samples and 50 μl of Hank's to the non-stimulated samples. After 60 min of incubation at 37 °C, the reaction was stopped and, following centrifugation,

the supernatants were discarded and the reduced NBT was extracted with dioxin (Sigma St Louis, MO). Supernatant absorbances were measured at 525 nm. The data obtained were expressed as nmol of NBT reduced per 10^6 macrophages by extrapolating from a standard curve of NBT reduced with 1,4-dithioerythritol (Sigma St Louis, MO).

Assay of lymphocyte functions

Adherence and *chemotaxis* assay of lymphocytes was performed as previously described for macrophages [10].

Proliferation of lymphocytes was quantified in total peritoneal cellular suspensions adjusted to a final concentration of $5 \cdot 10^5$ leucocytes/ml in complete medium (RPMI-1640; PAA, Austria, plus 10% foetal calf serum, Life Technologies; plus 1% gentamicin, PAA, Austria), following a method previously described [32]. Aliquots of 200 μ l were dispensed in 96-well flat-bottomed plates (Nunc, Roskilde Denmark), and 20 μ l of concanavalin A (ConA 1 μ g/ml) or lipopolysaccharide (LPS, *E. coli*, 055:B5 1 μ g/ml; Sigma, St Louis, MO) was added. After 48 h of incubation, Con A and LPS-stimulated culture supernatants were collected to measure the levels of interleukin-2 (IL-2) and TNF- α , respectively. Then, 0.5 μ Ci of 3 H-thymidine were added and after 8 h cells were harvested and the thymidine uptake was measured in a beta counter. The results were expressed as percentage of stimulation, 100% being the cpm thymidine uptake at basal condition.

IL-2 and TNF- α levels in the supernatants of leucocyte cultures, after 48 h of incubation with Con A and LPS, respectively, were measured by ELISA kits (R&D System, Minneapolis, USA) and the results expressed as pg/ml.

Natural killer (NK) activity was evaluated using an enzymatic colorimetric assay for cytolytic measurements of target cells (Cytotox 96 TM Promega, Madison, WI, USA) based on the determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity using a tetrazolium salt [32]. Cells YAC-1 from a murine lymphoma were used as targets and peritoneal leucocytes as effector cells (with an effector/target rate 10:1) in the NK assay. After 4 h of incubation, LDH activity was measured in the supernatants by addition of the enzyme substrate at absorbance of 490 nm. To determine the percentage of lysis of target cells, the following equation was used: % lysis = $(E - ES - TS / M - ES - TS) \times 100$, being *E* the mean of absorbances in the presence of effector cells; *ES* the mean of absorbances of effector cells incubated alone; *TS* the mean of absorbances in target cells incubated with medium alone and *M* the mean of maximum absorbances after incubating target cells with lysis solution.

Statistical analysis

The data were expressed as the mean \pm SD of the values. The normality of the samples was tested by the Kolmogorov–Smirnov test. The data were statistically evaluated by the two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey *t* test for comparisons of parametric samples. $p < 0.05$ was taken as the minimum significance level.

Results

The results concerning the several functions studied in macrophages (that represent different steps of the phagocytic process) are indicated in Table 2 and Fig. 1. The adherence capacity, the first step of the phagocytic process (Table 2), increases significantly with animal age (as already mentioned above, the mice after 15 weeks of treatment are mature and after 30 weeks are old; $p < 0.05$ comparing cells from mature mice with those of the aged). All biscuit treatments resulted in significantly diminished values of the adherence indices with respect to those of the controls in both periods of supplementation, showing during the last period (30 weeks) the most effective decrease ($p < 0.001$) for all biscuits. Following adherence, the macrophages migrate to the infection focus. After diet supplementation, only the CO50 and CO53 biscuits caused an increase in this immune parameter at 30 weeks ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively). Regarding phagocytosis capacity, the phagocytosis indices (Fig. 1) show a decrease in old mice ($p < 0.001$) when compared to mature animals. After 15 weeks of supplementation, the CO49 ($p < 0.001$), CO52 ($p < 0.001$) and CO53 ($p < 0.01$) biscuits significantly increased phagocytosis. After 30 weeks, CO50 significantly decreased the phagocytosis index ($p < 0.05$). As regards to superoxide anion levels, the first free radical that macrophages produce by digestion of the ingested material, it could be observed, in control samples, a diminution of superoxide levels in basal as well as stimulated samples ($p < 0.001$) in old animals with respect to mature mice. After 30 weeks of supplementation with CO52 biscuit, the levels of superoxide anion were increased in stimulated samples ($p < 0.001$).

With respect to the effects of the different treatments on lymphocytes, Fig. 2 shows the results obtained for adherence and chemotaxis. As regards to adherence (Fig. 2a), no significant differences were found at the control level between cells from mature and old animals. All the biscuits were able to decrease lymphocyte adherence indices in both periods of supplementation ($p < 0.001$ in all cases with exception of CO49 and CO53, which showed the lowest ($p < 0.05$) after 30-week treatments). Regarding chemotaxis (Fig. 2b), a decrease in this immune parameter

Table 2 Adherence indices, chemotaxis indices and superoxide anion levels (basal and stimulated levels) of peritoneal macrophages from mice after 15 (mature animals) and 30 (old animals) weeks of the different diet supplementations

	Adherence indices	Chemotaxis indices	Superoxide anion (Basal levels)	Superoxide anion (Stimulated levels)
15 weeks of diet supplementation (mature mice)				
Control	45 ± 8	196 ± 50	43 ± 6	64 ± 9
CO49	33 ± 3 ^a	246 ± 45	34 ± 7	72 ± 13
CO50	34 ± 5 ^a	249 ± 51	34 ± 9	51 ± 11
CO52	33 ± 6 ^a	193 ± 36	35 ± 7	64 ± 14
CO53	34 ± 5 ^a	218 ± 41	40 ± 7	72 ± 10
30 weeks of diet supplementation (old mice)				
Control	57 ± 8 ^b	139 ± 26	21 ± 4 ^{bbb}	34 ± 6 ^{bbb}
CO49	39 ± 8 ^{aaa}	186 ± 26	14 ± 3	45 ± 8
CO50	30 ± 6 ^{aaa}	209 ± 42 ^a	17 ± 4	31 ± 7
CO52	33 ± 9 ^{aaa}	110 ± 26	27 ± 8	56 ± 13 ^{aaa}
CO53	36 ± 8 ^{aaa}	237 ± 63 ^{aaa}	25 ± 7	47 ± 7

The results are the mean ± SD of eight values corresponding to the same number of mice, each value being the mean of duplicated assays. ^a $p < 0.05$, ^{aaa} $p < 0.001$ compared to the control of each period of supplementation. ^b $p < 0.05$, ^{bbb} $p < 0.001$ with respect to the corresponding value in 15-week supplementation group

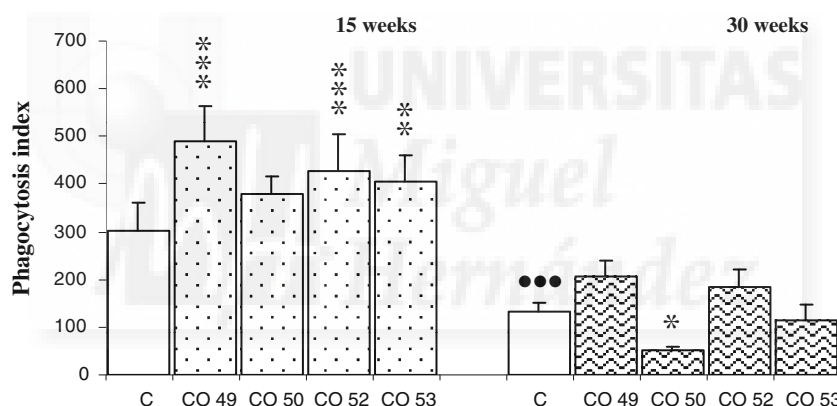


Fig. 1 Phagocytosis indexes (number of latex beads ingested by 100 macrophages) of peritoneal macrophages from mice after 15 (mature animals) and 30 (old animals) weeks of diet supplementation with different polyphenol-rich biscuits. The results are the mean ± SD of eight values corresponding to the same number of animals, each value

being the mean of duplicated assays. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to the control of each period of supplementation. ●●● $p < 0.001$ with respect to the corresponding value in 15-week supplementation group

with age in control samples was observed ($p < 0.05$). The supplementation with CO49, CO50 and CO53 biscuits increased the chemotaxis indices of lymphocytes ($p < 0.05$, 0.001 and 0.01, respectively) after 15 weeks. The same stimulatory effects was observed at 30 weeks, with all biscuits causing an increase in lymphocyte mobility, CO49, CO50 and CO53 showing the highest index values ($p < 0.001$) and CO52 the lowest ($p < 0.05$).

Figure 3 represents proliferation percentages in response to concanavalin A (Con A) and lipopolysaccharide (LPS). A significant decrease ($p < 0.001$) in proliferation at control levels can be observed in cells from old animals with respect to those from mature mice, in response to both

Con A and LPS. The biscuits studied are able to increase lymphocyte proliferation in response to Con A (Fig. 3a) after 15 weeks of treatment. However, this stimulatory effect can only be observed with CO52 ($p < 0.01$) and CO53 ($p < 0.001$) biscuits after 30 weeks of treatment. The percentages of proliferation in response to LPS (Fig. 3b) are increased with CO50 and CO52 biscuits at 15 weeks ($p < 0.01$ and 0.001, respectively). After 30 weeks of supplementation, all treatments, except CO49, increase proliferation ($p < 0.001$ for CO50 and CO53, and $p < 0.01$ for CO52) in response to LPS.

With regards to natural killer activity, represented as lysis percentage of tumour cells, and interleukin-2 (IL-2)

Fig. 2 Adherence (a) and chemotaxis indexes (b) of peritoneal lymphocytes from mice after 15 (mature animals) and 30 (old animals) weeks of diet supplementation with different polyphenol-rich biscuits. The results are the mean \pm SD of eight values corresponding to the same number of animals, each value being the mean of duplicated assays. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to the control of each period of supplementation. $\bullet p < 0.05$ with respect to the corresponding value in 15-week supplementation group

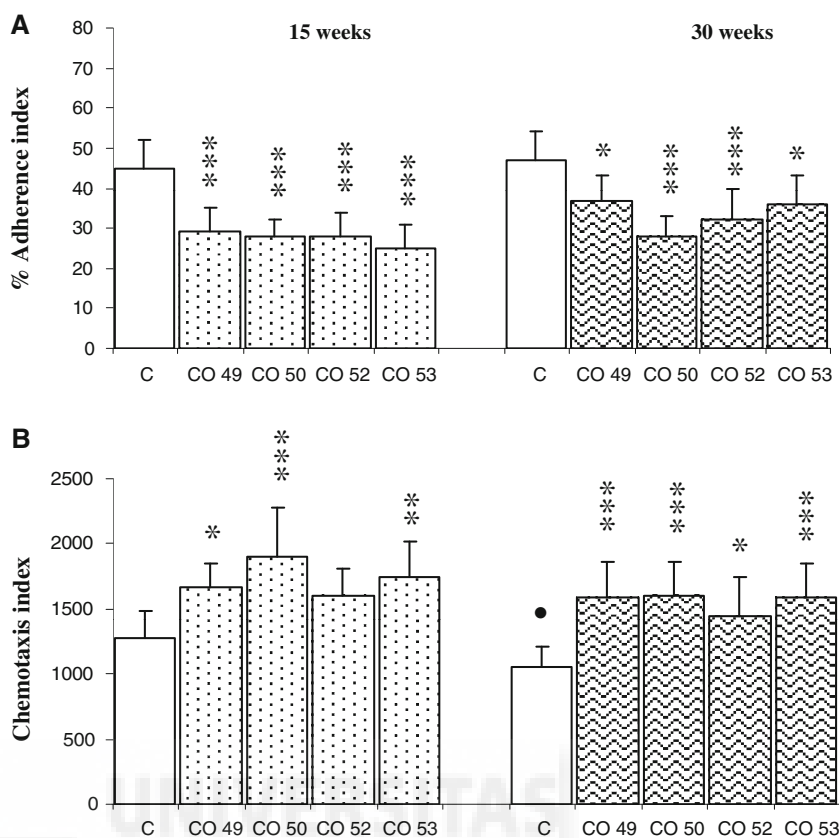


Fig. 3 Proliferation, in response to the mitogens concanavalin A (Con A) (a) and lipopolysaccharide (LPS) (b), of peritoneal lymphocytes from mice after 15 (mature animals) and 30 (old animals) weeks of diet supplementation with different polyphenol-rich biscuits. The results are the mean \pm SD of eight values corresponding to the same number of animals, each value being the mean of duplicated assays. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to the control of each period of supplementation. $\bullet\bullet p < 0.001$ with respect to the corresponding value in 15-week supplementation group

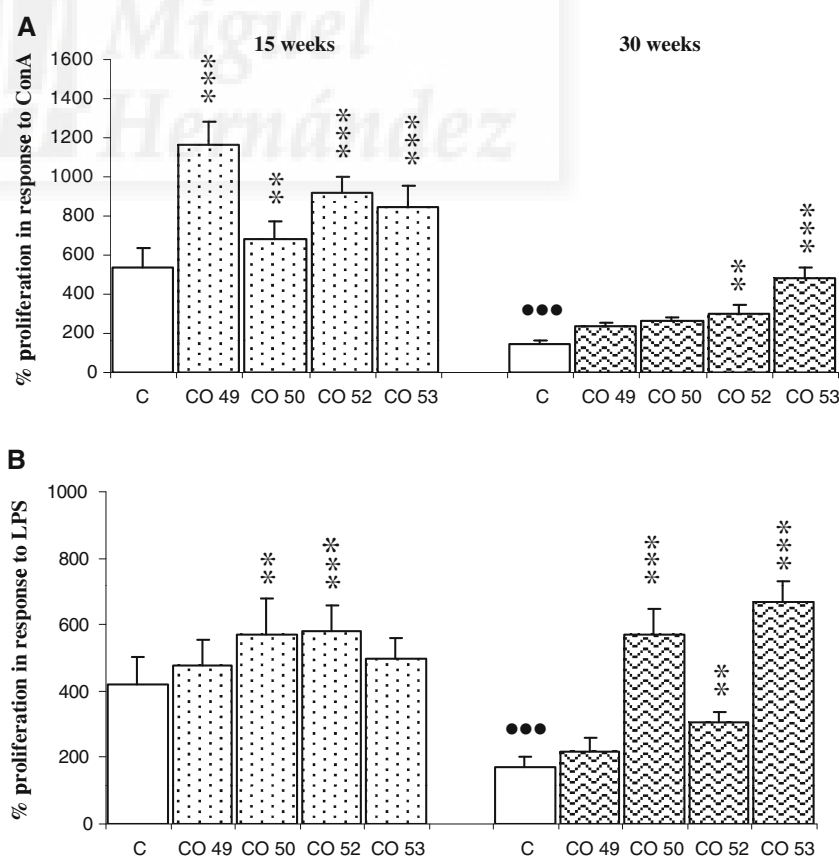


Table 3 Natural killer activity and interleukin 2 levels of peritoneal leucocytes from mice after 15 (mature animals) and 30 (old animals) weeks of the different diet supplementations

	Natural killer activity (% lysis)	Interleukin-2 levels (pg/ml)
15 weeks of supplementation (mature mice)		
Control	26 ± 5	243 ± 24
CO49	33 ± 6	341 ± 53 ^{aa}
CO50	37 ± 5 ^{aa}	380 ± 65 ^{aaa}
CO52	36 ± 5 ^{aa}	314 ± 83
CO53	45 ± 7 ^{aaa}	341 ± 48 ^{aa}
30 weeks of supplementation (old mice)		
Control	23 ± 2	159 ± 30 ^b
CO49	35 ± 5 ^{aaa}	226 ± 38
CO50	32 ± 3 ^a	182 ± 42
CO52	37 ± 8 ^{aaa}	235 ± 55
CO53	39 ± 6 ^{aaa}	239 ± 39

The results are the mean ± SD of eight values corresponding to the same number of animals, each value being the mean of duplicated assays. ^a $p < 0.05$, ^{aa} $p < 0.01$, ^{aaa} $p < 0.001$ compared to the control of each period of supplementation. ^b $p < 0.05$ with respect to the corresponding value in 15-week supplementation group

levels, the results are shown in Table 3. No significant differences with age were observed on natural killer activity between control samples. After 15 weeks, CO50 and CO52 increase lysis percentages ($p < 0.01$), as well as CO53 ($p < 0.001$). All treatments significantly increased natural killer activity after a 30-week period (CO49, CO52 and CO53 $p < 0.001$; and CO50 $p < 0.05$). As regards the IL-2 levels, a decrease with age in control samples was observed ($p < 0.05$). The supplementation with CO49 ($p < 0.01$), CO50 ($p < 0.001$) and CO53 ($p < 0.01$) increased IL-2 levels after 15 weeks, and no significant effects were observed after 30 weeks.

Besides, alpha-tumour necrosis factor levels (TNF- α) were measured. In reference to control samples, increased levels of this cytokine ($p < 0.05$) were shown in old mice (246 ± 28 pg/ml), in comparison with mature animals (202 ± 36 pg/ml). No effects on TNF- α levels were observed with the different treatments after 15 weeks, whereas after 30 weeks of supplementation with CO52 a significant decrease in TNF- α levels (191 ± 36, $p < 0.05$) was shown.

Discussion

In the present work, we have shown the favourable effects of long-term intake (15 and 30 weeks) of different biscuits containing nutritional concentrations of various combinations of cereal fractions naturally rich in polyphenols

improving several relevant function parameters in immune cells from mature and old mice, which suffer age-related changes. The differences observed at control level between both ages in immune parameters are similar to those shown by several authors to occur with ageing [1, 2, 32–34]. Thus, the immune cells from the mice used in the present study show, in general, the previously observed age-related changes.

The adherence, the first step in the immune response of immune cells increases with age in macrophages. Adherence is a process related to oxidative stress, which implies an increased expression of adhesion molecules and other oxidant and inflammatory factors [34], and since ageing is associated with high levels of free radicals, an increase with ageing of the adherence function has been observed [2, 34]. An adequate adherence is needed for cell migration towards inflammatory foci, but an excessive adherence could represent a drawback for the cells to reach the infectious focus. Treatments were able to decrease the adherence indices of macrophages and lymphocytes after both periods of supplementation. Polyphenols, through their antioxidant role could reduce oxidative stress and the expression of adhesion molecules. In general, the described effects of polyphenols have demonstrated a clear inhibitory action on adhesion. Thus, certain types of polyphenols such as ferulic acid [35] and catechins [36] may decrease the expression of adhesion molecules by endothelial cells, and also may reduce monocyte adhesion. Moreover, epigallocatechin gallate (EGCG), one of the main phenolic components of green tea, inhibits adhesion of human neutrophils [37] and of the human monocyte cell line [38]. These two kinds of polyphenols, and especially the ferulic acid, present in all the biscuits studied, could be responsible of the decrease in the adherence of leucocytes found after supplementation.

With ageing, a decreased chemotaxis in macrophages and lymphocytes has also been previously described [2, 34]. The different biscuits did not show any differences after 15 weeks of supplementation with respect to macrophage control values of this immune parameter. Nevertheless, after the longest period of polyphenol-rich biscuit supplementation (30 weeks), CO50 and CO53 biscuits were able to increase macrophage chemotaxis. With respect to lymphocytes, in general, it can be observed an enhancement of chemotaxis in both periods of supplementation. There are few studies on the effect of polyphenols on cell migration or chemotaxis to sites of inflammation. Similar results to those shown in the present work have been found with several polyphenols, which enhance both f-MetLeuPhe directed and random migration of murine neutrophils in vitro [39]. However, other research shows controversial results. Thus, after in vitro and in vivo supplementation with the polyphenol rutin, an

inhibition of chemotaxis of rat neutrophils has been reported [40]. Nevertheless, in prematurely ageing mice, the supplementation for 5 weeks with a cereal rich in rutin increased the peritoneal macrophage chemotaxis [31]. Moreover, in adult mice a diet supplementation for that time with different polyphenol-rich cereals improves chemotaxis of peritoneal lymphocytes and macrophages [30].

The phagocytosis activity, that is the main macrophage function, decreases in old mice at control levels when compared to the values of mature animals, in agreement with previous results [2, 34]. In general, the different treatments increased this function after 15 weeks of treatment. The effects shown by biscuits change depending on the period studied. Thus, CO50 did not exert any effect after 15 weeks but inhibited significantly phagocytosis after 30 weeks. Besides, the stimulatory effect exerted by CO49, CO52 and CO53 after 15 weeks, disappears after 30 weeks of polyphenol-biscuits intake. It is possible that the different amounts and composition of polyphenols present in the different biscuits may be responsible for these effects. It has been demonstrated that a synthetic lipophilic derivate, 3-palmitoyl-(+)-catechin, enhances the phagocytic activity of guinea pig kupffer cells *in vivo* according to Piazza et al. [41]. Therefore, the presence of catechin in CO49 and CO52 biscuits could explain their enhancement of phagocytosis after 15 and 30 weeks of supplementation. In a previous study, diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals increased the phagocytic capacity of peritoneal macrophages from prematurely ageing mice [31].

The digestion of the phagocytized particles by macrophages takes place through the respiratory burst in which NADPH oxidase is activated catalyzing a reaction that produces superoxide anion. Without phagocytic stimulus these cells can also produce superoxide anion increasing the NADPH synthesis. In the present study, peritoneal macrophages from old mice show lower levels of intracellular superoxide anion, both at basal levels and with phagocytic stimulus, than those from mature animals. This confirms the lower effectiveness of foreign material destruction at this age and this fact is in agreement with previous results showing an age-related decrease in the intracellular levels of superoxide anion in peritoneal leucocyte of mice and an increase in extracellular superoxide levels, which could produce serious host tissue damage [2, 34]. The different kinds of biscuits do not show, in general, any effect at basal level on this free radical in both periods of supplementation. However, in stimulated samples, CO52 increases the levels of this anion after 30 weeks of treatment. In most cases the studies with polyphenols have been performed measuring extracellular superoxide anion levels, and the scavenging properties of polyphenols on this free radical showed these levels decreased [42, 43].

Nevertheless, several antioxidant compounds such as vitamin C, vitamin E, glutathion, tioprolin or N-acetylcysteine, have shown *in vitro* and *in vivo* an increase in the levels of intracellular superoxide anion [2, 10, 44]. Moreover, a diet supplementation with polyphenol-rich cereals also increased the intracellular superoxide anion levels in peritoneal leucocyte from adult mice [30] and from prematurely ageing mice [31].

The most pronounced alterations with ageing seem to be found in T lymphocyte functions, with a decrease in their proliferative response and IL-2 production [1, 2]. The results of the present work confirm these previous studies since a significant reduction of the proliferation of lymphocytes and also of IL-2 concentrations have been found at control level in old mice with respect to the mature animals. In general, the naturally polyphenol-rich biscuits studied are able to improve proliferation in response to mitogens after both intake periods, as well as to enhance the levels of IL-2 after 15 weeks of treatment. Other authors have found that 2 weeks after polyphenol-fruit juice consumption, IL-2 levels increased significantly, as well as human lymphocyte responsiveness to mitogens [25]. In this context, an *in vitro* study on humans has demonstrated that polyphenols such as ferulic, p-coumaric and vanillic acids enhance the activity of human lymphocyte proliferation as well as the secretion of interferon-gamma [45]. Ferulic and p-coumaric acids are the main polyphenols in cereals, and the biscuits tested have a high content of these molecules, which could be responsible of the increased lymphocyte proliferation observed in our study. In a previous work, the diet supplementation with polyphenol-rich cereals showed an increase in IL-2 release and proliferation of peritoneal T lymphocytes in both adult and prematurely ageing mice, with the p-coumaric acid being an important candidate to mediate this effect [30, 31]. Nevertheless, controversial results have been reported regarding lymphocyte proliferation and IL-2 release depending on the polyphenol studied. Thus, the cacao liquor polyphenols, *in vitro*, inhibit human lymphocyte proliferation in response to mitogens [46] and no effect of five polyphenols in an *in vitro* study on IL-2 concentrations have been reported by Miles et al. [47]. Moreover, epigallocatechin-3-gallate inhibited the spleen T cell proliferation in mice and its supplementation resulted in a lower IL-2 receptor expression [48].

With respect to the antitumoural activity of NK cells, no differences were found at control levels between the ages studied. Controversial results with respect to NK activity with ageing have been observed, thus no change or a decline of this immune function with age has been reported [2, 49]. Supplementation with biscuits rich in polyphenols was able to improve this function after 15 weeks (with the exception of CO49), and 30 weeks of supplementation.

In agreement with our results, a study performed in adult humans consuming polyphenol-fruit juice, in a total period of 10 weeks, showed an improvement of the natural killer activity [25]. *In vitro* quercetin showed a decrease in lytic activity of NK cells, whereas catechin increased this function [50]. Moreover, green tea catechins maintained better NK activity in senescence-accelerated mice prone and decreased their tumour metastasis [51], and a diet supplementation with polyphenol-rich cereals for 5 weeks increased the NK activity of peritoneal leucocytes from prematurely ageing mice [31]. However, in an *in vivo* study performed in humans, the NK activity was not affected by polyphenols present in red wine [52].

With ageing also increases the release of proinflammatory cytokines such as TNF- α [2, 34] in agreement with the results obtained in the present work. The effect of CO52 biscuits decreasing the levels of TNF- α after 30 weeks of ingestion could show a useful anti-inflammatory action at this old age. The majority of the studies about the effect of polyphenols on the secretion of TNF- α are controversial. A recent study shows that a phenolic synthetic compound blocks this inflammatory cytokine production in macrophages [53]. Catechins have been particularly well studied on TNF- α secretion and showed an inhibitory effect in mouse macrophages [54, 55], but no significant effect in whole blood human cultures [56] and in a mouse monocyte/macrophage cell line (RAW 264.7) [57]. The diet supplementation for 5 weeks with several polyphenol-rich cereals decreased the release of TNF- α in peritoneal leucocyte of adult mice, with exception of one of the cereal studies, that without p-coumaric acid [30]. Nevertheless, other authors did not observe any effect on TNF- α production in whole blood cultures in the presence of p-coumaric acid [58]. The immunomodulatory role of the polyphenols studied in the present work, lowering the age-overactivated functions of leucocytes such as adherence and TNF- α release and, at the same time, stimulating the impaired ones such as the other function studied here, to reach the best physiological levels in each immune function, has already been shown with other antioxidants [2].

The present work demonstrates that age-associated impairment of the immune system may be attenuated by ingestion of nutrients present in the biscuits studied. Probably, the polyphenol content of these biscuits could be the main compound responsible for the improvement observed on several immune cell functions. Nevertheless, we cannot assume that the changes found in immune status are due to one individual polyphenol, and we must also consider that there are other components of the biscuits (such as lipids) that also influence immune status, and thus, additional studies in this area would be needed. Presently, all that we can say is that these effects are possibly a consequence of the concrete combination of the different

types of polyphenols as well as the physiological amounts of them present in the biscuits. The use of combinations of optimal doses of antioxidant and anti-inflammatory phytochemicals for dietary intake, better than an antioxidant alone [59], could result in an appropriate way to slow down the progressive tendency to decline of the immune responses with advancing age, as many studies have shown [2, 8–10, 44]. Moreover, the potential antioxidant and anti-inflammatory action of polyphenols [12–17] could not always explain their pivotal physiological role, since, polyphenols, like other antioxidants, not only can be considered as merely scavenging radicals but also as modulators and regulators of several physiological functions including immune responses [2, 18, 19, 60, 61]. In addition, the role that show several nutrients increasing antioxidant defences by up-regulating the expression and activity of antioxidant enzymes normally present in the cell, such as it has been observed in some polyphenol compounds, seems the best way to improve longevity [11].

Since the immune system declines with age, increasing morbidity and mortality [62], naturally rich polyphenol food may be an important way to preserve health with age. In fact, the few studies on the effects of polyphenol supplementation in the immune functions of chronologically old subjects or with premature or accelerated ageing have shown positive effects [26, 27, 31, 51, 63], and in several cases this supplementation improved the immune functions restoring the values to those in adults. For such reason, further efforts have to be focused to understand the mechanisms by which these compounds influence immunity during ageing. In conclusion, the present work reveals that the ingestion of diets enriched in cereal polyphenols through ageing is useful against the age-related immunological decline and thus, since immune function has been shown to be a health and longevity predictor, increase healthy longevity.

Acknowledgments This work has been supported by grants from DANONE-VITAPOLE, and the Ministry of Science and Innovation (MICINN, BFU 2008-04336), the UCM Research Group (910379ENEROINN) grants and RETICEF (RD06/0013/0003) from ISCIII, Spain.

References

1. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R et al (2002) T cells and aging. *Front Biosci* 7:D1056–D1183
2. 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
3. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298–300
4. Miquel J (1998) An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 33:113–126

5. Knight JA (2000) Review: free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 30:145–157
6. Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS (1990) Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 45:M45–M48
7. Arranz L, Caamano J, Lord JM, De la Fuente M (2010) Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor- κ B. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65:941–950
8. De la Fuente M (2010) Murine models of premature ageing for the study of diet-induced immune changes. Improvement of leukocyte functions in two strains of old prematurely ageing mice by dietary supplementation with sulphur-containing antioxidants. *Proc Nutr Soc* 69:651–659
9. Chandra RK (2004) Impact of nutritional status and nutrient supplements on immune responses and incidence of infection in older individuals. *Ageing Res Rev* 3:91–104
10. De la Fuente M, Miquel J, Catalan MP, Victor VM, Guayerbas N (2002) The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Radic Res* 36:119–126
11. Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borras C (2007) Fostering antioxidant defences: up-regulation of antioxidant genes or antioxidant supplementation? *Br J Nutr* 98:S36–S40
12. Rice-Evans CA, Miller NJ (1996) Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 24:790–795
13. RiceEvans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 20:933–956
14. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79:727–747
15. Middleton EJ (1998) Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory function. *Adv Exp Med Biol* 439:175–182
16. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS (2004) Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci* 96:229–245
17. Hughes DA (2005) Plant polyphenols: modifiers of immune function and risk of cardiovascular disease. *Nutrition* 21:422–423
18. Ramiro-Puig E, Castell M (2009) Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *Br J Nutr* 101(7):931–940
19. Magrone T, Jirillo E (2010) Polyphenols from red wine are potent modulators of innate and adaptive immune responsiveness. *Proc Nutr Soc* 69(3):279–285
20. Sies H (2010) Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch Biochem Biophys* 501:2–5
21. Giugliano D (2000) Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 10:38–44
22. Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathe G (2002) Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother* 56:200–207
23. Passamonti S, Terdoslavich M, Franca R, Vanzo A, Tramer F, Braidor E, Petrusa E, Vianello A (2009) Bioavailability of flavonoids: a review of their membrane transport and the function of bilitranslocase in animal and plant organisms. *Curr Drug Metab* 10:369–394
24. Uto-Kondo H, Ayaori M, Ogura M et al (2010) Coffee consumption enhances high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in macrophages. *Circ Res* 106:779–787
25. Bub A, Watzl B, Blockhaus M, Brivida K, Liegibel U, Müller H, Pool-Zobel BL, Reckemmer G (2003) Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J Nutr Biochem* 14:90–98
26. Baeza I, De Castro NM, Alvarado C, Alvarez P, Arranz L, Bayon J, De la Fuente M (2007) Improvement of immune cell functions in aged mice treated for 5 weeks with soybean isoflavones. *Ann NY Acad Sci* 1100:497–504
27. Baeza I, De Castro NM, Arranz L, De la Fuente M (2010) Soybean and green tea polyphenols improve immune function and redox status in very old ovariectomized mice. *Rejuvenation Res* doi:10.1089/rej.2010.1049
28. Boyle SP, Dobson VI, Duthie SJ, Kyle JA, Collins AR (2000) Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal. *Eur J Nutr* 39:213–223
29. Pedersen CB, Kyle J, Jenkinson AM, Gardner PT, McPhail DB, Duthie GG (2000) Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers. *Eur J Clin Nutr* 54:405–408
30. Alvarez P, Alvarado C, Mathieu F, Jimenez L, De la Fuente M (2006) Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leukocytes. *Eur J Nutr* 45:428–438
31. Alvarez P, Alvarado C, Puerto M, Schlumberger A, Jimenez L, De la Fuente M (2006) Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals. *Nutrition* 22:913–921
32. Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M (2002) Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 37:249–256
33. Guayerbas N, De la Fuente M (2003) An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely-ageing mice. *Develop Comp Immunol* 27:339–350
34. De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Alvarez P, Alvarado C (2004) Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol* 50:OL683–OL690
35. Ma ZC, Hong Q, Wang YG et al (2010) Ferulic acid attenuates adhesion molecule expression in gamma-radiated human umbilical vascular endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 33:752–758
36. Koga T, Meydani M (2001) Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 73:74174–74178
37. Hofbauer R, Frass M, Gmeiner B, Handler S, Speiser W, Kapiotis S (1999) The green tea extract epigallocatechin gallate is able to reduce neutrophil transmigration through monolayer of endothelial cells. *Wien Klin Wochensh* 111:278–282
38. Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jimenez F, Urdiales JL (2009) Epigallocatechin gallate reduces human monocyte mobility and adhesion in vitro. *Br J Pharmacol* 158(7):1705–1712
39. Kenny MT, Balistrery FJ, Torney HL (1990) Flavonoid modulation of murine neutrophil cytokinesis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 12:527–541
40. Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C (2003) Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp Toxicol Pathol* 54:313–318
41. Piazza M, Borgia G, Crowell J, Nappa S, Lambrase A, Perrissoud D, Schreil W (1985) The effect of 3-palmitoyl-(+)-catechin on kupffer cells in guinea pig liver. *Hepatology* 5:867–869
42. Martínez J, Moreno JJ (2000) Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol* 59:865–870
43. O'Dowd Y, Driss F, Dang PMC, Elbim C, Gougerot-Pocidal MA, Pasquier C, El-Benna J (2004) Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 68:2003–2008
44. Alvarado C, Álvarez P, Puerto M, Gausseres N, Jiménez L, De la Fuente M (2006) Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely ageing mice. *Nutrition* 22:767–777

45. Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, Lin CC (2003) Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Med* 69:600–604
46. Sanbongi C, Suzuki N, Sakane T (1997) Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in human in vitro. *Cell Immunol* 177:129–136
47. Miles EA, Zoubouli P, Calder PC (2005) Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production. *Clin Nutr* 24:780–784
48. Wu D, Guo Z, Ren Z, Guo W, Meydani SN (2009) Green tea EGCG suppresses T cell proliferation through impairment of IL-2/IL-2 receptor signalling. *Free Radic Biol Med* 47(5):636–643
49. Ferrandez MD, Correa R, Del Rio M, De la Fuente M (1999) Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 34:675–685
50. Exon JH, Magnuson BA, South EH, Hendrix K (1998) Dietary quercetin, immune functions and colonic carcinogenesis in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 20:173–190
51. Shimizu K, Shimizu NK, Hakamata W, Unno K, Asai T, Oku N (2010) Preventive effect of green tea catechins on experimental tumor metastasis in senescence-accelerated mice. *Biol Pharm Bull* 33:117–121
52. Watzl B, Bub A, Pretzer G, Roser S, Barth SW, Rechkemmer G (2004) Daily moderate amounts of red wine or alcohol have no effect on the immune system of healthy men. *Eur J Clin Nutr* 58:40–45
53. Hwang JM, Yu JY, Jang YO, Kim BT, Hwang KJ, Jeon YM, Lee JC (2010) A phenolic acid phenethyl urea compound inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines in cell culture. *Int Immunopharmacol* 10:526–532
54. Chen CC, Chow MP, Huang WC, Lin YC, Chang YJ (2004) Flavonoids inhibit tumor necrosis factor- α -induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor- κ B: structure, activity relationships. *Mol Pharmacol* 66:683–693
55. Ichikawa D, Matsui A, Imai M, Sonoda Y, Kasahara T (2004) Effect of various catechins on the IL-12p40 production by murine peritoneal macrophages and a macrophage cell line, J774.1. *Biol Pharm Bull* 27:1353–1358
56. Crouvezier S, Powell B, Keir D, Yaqoob P (2001) The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Cytokine* 13:280–286
57. Wang J, Mazza G (2002) Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 50:4183–4189
58. Miles EA, Zoubouli P, Calder PC (2005) Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 21:389–394
59. Liu RH (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* 134:3479S–3485S
60. Brigelius-Flohé R (2005) Introductory remarks to the new series of reviews: from dietary antioxidants to regulators in cellular signalling and gene expression. *Free Rad Res* 39:351
61. Queen BL, Tollefsbol TO (2010) Polyphenols and aging. *Curr Aging Sci* 3:34–42
62. Dorshkind K, Swain S (2009) Age-associated declines in immune system development and function: causes, consequences, and reversal. *Curr Opin Immunol* 21:404–407
63. Alvarez P, Alvarado C, Jimenez L, De la Fuente M (2008) Effects of a diet with polyphenol-rich cereal supplementation on the function and redox state of peritoneal leukocytes from mice: differences between a short (5 weeks) and long (20 weeks) period of supplementation. *Proc Nutr Soc* 67 (OCE):E23

Miguel
Hernández

Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E

M. De la Fuente, M.D. Ferrández, M.S. Burgos, A. Soler, A. Prieto, and J. Miquel

Abstract: We have investigated the effects of supplementation of the diet with the antioxidant vitamins C and E on several functions of the immune response of aged women. Ten healthy women and 20 women (72 ± 6 years old) suffering two diseases often associated with age (10 with major depression disorders, MDD, and 10 with coronary heart disease, CHD) were administered 1 g of vitamin C and 200 mg of vitamin E daily for 16 weeks. Blood samples were collected before and after treatment for measurement of several immunological functions, namely proliferative response of lymphocytes to the mitogen phytohemagglutinin (20 mg/L) and phagocytic functions of polymorphonuclear (PMN) neutrophils, i.e., adherence to vascular endothelium, chemotaxis, phagocytosis of latex beads, and superoxide anion production. In addition, we also determined the levels of serum cortisol and lipid peroxides. Intake of vitamins resulted in a significant increase in the lymphoproliferative capacity and in the phagocytic functions of PMN neutrophils as well as in a significant decrease of serum levels of lipid peroxides and cortisol, both in the healthy aged women and in the aged women with MDD or CHD. These findings suggest an important role of antioxidant supplementation in the improvement of immune function in aged females as well as in the prevention and treatment of specific diseases associated with age that are quite prevalent in the developed countries.

Key words: vitamins C and E, ageing, lymphocytes, neutrophils, lipid peroxides, cortisol.

Résumé : Nous avons examiné les effets d'une supplémentation en vitamines C et E antioxydantes sur diverses fonctions de la réponse immunitaire de femmes âgées. Dix femmes en santé et 20 femmes (âgées 72 ± 6 ans) atteintes de deux maladies souvent associées à l'âge (10 souffrant de troubles dépressifs majeurs (DM) et 10 souffrant de cardiopathie ischémique (CI)), ont reçu une dose de 1 g de vitamine C et de 200 mg de vitamine E, quotidiennement, pendant 16 semaines. Des échantillons sanguins ont été prélevés avant et après le traitement pour vérifier diverses fonctions immunologiques, notamment la réponse proliférative des lymphocytes au mitogène phyto-hémagglutinine (20 mg/L) et les fonctions phagocytaires des polynucléaires neutrophiles, c.-à-d. adhérence à l'endothélium vasculaire, chimiotaxie, phagocytose de billes de latex et production d'anion superoxyde. Nous avons aussi déterminé les taux de cortisol et de peroxydes lipidiques sériques. L'ingestion de vitamines a induit une augmentation significative de la capacité lymphoproliférative et des fonctions phagocytaires des polynucléaires neutrophiles, et une diminution significative des taux de cortisol et peroxydes lipidiques sériques tant chez les femmes en santé que chez les femmes souffrant de DM et de CI. Ces résultats suggèrent que la supplémentation antioxydante joue un rôle important dans l'amélioration de la fonction immunitaire chez les femmes âgées ainsi que dans la prévention et le traitement de maladies spécifiques au vieillissement qui sont fréquentes dans les pays développés.

Mots clés : vitamines C et E, vieillissement, lymphocytes, polynucléaires neutrophiles, peroxydes lipidiques.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

Ageing is accompanied by functional and metabolic alterations in cells and tissues, including changes in the immune system, both in humans and in many other mammalian species (Makinodan and Kay 1980; Solana et al. 1991; Ortega et al. 1993; Miller 1996). These age-related changes in immune function have been found mainly in T cell activity, which is decreased in its proliferative response to antigens or mitogens

(Globerson 1995; Miller 1996), while there is no agreement on the effects of age on phagocytic cells (reviewed by Ortega et al. 1993). Thus, some studies have established that phagocytic function does not decline or is stimulated with ageing (Sondell et al. 1990; De la Fuente et al. 1995), while other authors have found a diminished activity at certain stages of that function (De la Fuente 1985; Indelicato et al. 1990).

Free radicals, because of their high potential to damage biological systems, have been proposed as contributing factors to ageing (Miquel et al. 1980; Harman 1995) and to the development of chronic diseases, including heart disease and cancer (Harman 1956; Halliwell et al. 1995). To prevent the harmful effects of oxygen free radicals, the organisms have developed complex antioxidant systems (Harman 1995) that may be classified on the basis of their origin as endogenous (antioxidant and scavenger enzymes) or dietary, i.e., tocopherols (vitamin E), ascorbic acid (vitamin C), carotenoids, and selenium (and other metals that are essential for the function of the antioxidant enzymes).

Ascorbic acid and α -tocopherol are potent antioxidants,

Received July 16, 1997.

M. De la Fuente,¹ M.D. Ferrández, and M.S. Burgos.
Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal),
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense,
Av. Complutense s/n, E-28040, Madrid, Spain.

A. Soler. Laboratorio de Medicina Preventiva, Ibermútua,
Alicante, Spain.

A. Prieto and J. Miquel. Departamento de Farmacología y
Terapéutica, Universidad de Alicante, Alicante, Spain.

¹ Author to whom all correspondence should be addressed.

which act individually or in a synergistic fashion (Chew 1995). Ascorbic acid is the major water-soluble antioxidant and acts as the first defense against free radicals in whole blood (Niki et al. 1988) and plasma (Frei et al. 1989). Moreover, ascorbic acid contributes to the regeneration of vitamin E, which is the most abundant lipophilic antioxidant *in vivo* (Burton et al. 1983).

The balance between antioxidants and oxidants in living organisms is defined as antioxidant status, which is dynamic and, in the human body, is tipped slightly in favor of oxidation (Halliwell et al. 1995). This antioxidant-oxidant balance is an important determinant of immune cell function, including the maintenance of the integrity and functionality of membrane lipids, cellular proteins, and nucleic acids and the control of signal transduction of gene expression in immune cells (Meydani et al. 1995). Cells of the immune system are particularly sensitive to changes in the antioxidant status because they carry out important functions through the generation of a high number of oxygen free radicals (Pieri et al. 1993). Moreover, the cells of the immune system have a high percentage of polyunsaturated fatty acids in their plasma membrane, and therefore it is not surprising that these cells usually contain higher concentrations of antioxidant nutrients than do other cells (Hatman and Kayden 1979; Coquette et al. 1986). Vitamin C is a nutrient that regulates the immune system because of its antiviral and antioxidant properties, plays a role in the phagocytic function (Hernanz et al. 1990), and has an immunostimulant effect on lymphocyte cells (reviewed by Jariwalla and Harakeh 1996). Vitamin C deficiency, especially when it has progressed to scurvy, is associated with a loss of resistance to disease, while high intakes of vitamin C can stimulate phagocytic and T-lymphocytic activity (Jariwalla and Harakeh 1996).

The protection of cell membranes and other cellular components of immune cells against lipid peroxidation, a very important vitamin E related mechanism (Bendich 1990), involves trapping free radicals (Watson and Leonard 1986). Moreover, vitamin E modulates the immune system (Kline et al. 1990; Meydani et al. 1990; Beharka et al. 1997), enhancing humoral and cell-mediated immune responses (Bendich 1990; Meydani et al. 1990; Beharka et al. 1997). This vitamin acts by increasing the CD4/CD8 ratio, lymphocyte count, antibody response, natural killer cell activity, phagocytosis, and mitogen responsiveness (Kline et al. 1990; Beharka et al. 1997).

Ageing is often accompanied by financial, psychologic, and social changes that can impair the nutritional antioxidant status, and diet supplementation with micronutrients can play a crucial role in the maintenance of normal immune function in the elderly (Pike and Chandra 1995). Therefore, the aim of this work was to study whether antioxidant supplementation with the above vitamins in aged healthy and sick women could improve their immune response. The study of immune function has been carried out on the two most representative immune cells in human peripheral blood, namely, the lymphocytes and the phagocytic cells, i.e., the neutrophils. In lymphocytes, their most important and often investigated property, i.e., the proliferative response to mitogens, has been analyzed. In neutrophils we have studied the step after they leave the blood vessel until the pathogenic agent is destroyed. This involves the following pathway: adherence to endothelium, mobility directed to the infectious focus by a chemoattractant gradient (chemotaxis), ingestion of foreign agents, and

their destruction with the help of oxygen free radicals, with superoxide anion being the first produced.

Materials and methods

Subjects

A group of 30 aged women (72 ± 6 years old) volunteered for this study, which was approved by the Complutense University Human Experimental Ethical Review Committee. The subjects were informed of the nature of the study and signed informed consent forms. There were 10 control (C group) subjects in good health, as defined by normal findings in physical, hematological, and biochemical screening tests; 10 patients with major depressive disorders (MDD group); and 10 patients with coronary heart disease (CHD group).

The diagnosis of major depressive disorders (MDD) was made by the SCID-UP interview (Spitzer and Williams 1983) according to the DSM-III-R diagnostic criteria. Exclusion criteria for entering the study were acute and chronic physical diseases, immune diseases, metabolic and endocrine disorders, diabetes, obesity, or undernutrition, with recent weight loss, and drug or alcohol addiction.

The diagnosis of coronary heart disease (CHD) was established by coronary angiography, demonstrating coronary artery atherosclerotic luminal narrowing of at least one major coronary artery or by a history of myocardial infarction, confirmed by conventional ECG.

The participating women were not hospitalized during the course of the study. They resided in their homes and consumed a physician-supervised balanced Mediterranean diet, that was not very rich in polyunsaturated fatty acids, since the main cooking fat was olive oil. There was no change in the diet throughout the study for any of the subjects. The clinical exploration and blood tests performed before the start of vitamin supplementation failed to provide any evidence of nutritional deficiency that could be linked to a low antioxidant balance.

As regards drug intake, all CHD patients received treatment with diuretics, angiotensin converting enzyme inhibitors, and other standard pharmaceuticals. The MDD patients were treated with antidepressants. To our knowledge, none of the drugs taken by the diseased women has been reported to interfere in any way with the absorption or metabolism of vitamins C or E. There was no change in the pharmacological treatment over the course of the study.

Treatment

All subjects received a daily supplement of 1 g of ascorbic acid (Roche Nicholas SA, Barcelona, Spain) and 200 mg of α -tocopherol (Roche) daily for 16 weeks. This treatment was chosen on the basis of previous unpublished work from our laboratory showing that these doses were stimulant to immune function.

Peripheral venous blood samples were drawn by vein puncture at 09:00–10:00 in either nonheparinized (for determination of lipid peroxides and cortisol levels) or heparinized (for determination of immune cell functions) tubes before and after supplementation.

Serum

Immediately after blood collection, it was centrifuged at $350 \times g$ for 15 min to obtain serum. Samples were stored at -20°C until required for the assays.

Lipid peroxidation

The determination of serum lipid peroxide levels was carried out according to the thiobarbituric method of Ohkawa et al. (1979), extracting the reaction products with *n*-butanol-pyridine (15:1, v/v) and performing the spectrophotometry at 532 nm. The results were expressed as micromoles of malondialdehyde (MDA) per litre serum.

Immune cell functions

Separation of blood neutrophils and lymphocytes

Cells were obtained from heparinized samples by centrifugation at $300 \times g$ for 30 min in a density gradient (1.114), using Monoply resolving medium (Flow Laboratories, McLean, Va.). Differential migration during centrifugation resulted in the formation of two halos and a red blood cell pellet. The superior halo consisted of mononuclear lymphocytes and monocytes, and the inferior halo consisted of polymorphonuclear neutrophils. The cells were harvested, washed twice in Hank's medium for neutrophils or RPMI medium (Gibco, Burlington, Ont.) for lymphocytes, counted, and adjusted to 10^6 cells/mL medium. Cell viability was checked by the trypan blue exclusion test. Viable cells were over 98%.

Samples for the assay of neutrophil and lymphocyte functions were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 .

Assays of neutrophil functions

Adherence capacity of neutrophils

Adherence capacity was measured following the method described by McGregor et al. (1974). This method mimics *in vitro* the adherence of neutrophils to the vascular endothelium, and it has been followed to evaluate adherence in other studies (De la Fuente et al. 1997). Briefly, 1 mL blood (diluted 1:1 with Hank's medium) was placed in a Pasteur pipette in which 50 mg of nylon fiber was packed to a height of 1.25 cm. After 10 min, the effluent had drained by gravity. The percentage of adherence or adherence index (AI) was calculated as follows: $\text{AI} = 100 - (\text{neutrophils per mL of effluent samples} / \text{neutrophils per mL of original samples}) \times 100$.

Induced mobility or chemotaxis

Induced mobility or chemotaxis was evaluated by a modification (De la Fuente et al. 1993) of the original technique described by Boyden (1962), which measures the mobility capacity of neutrophils towards an infectious focus. Aliquots of 0.3 mL of the neutrophil suspension (10^6 neutrophils/mL) were deposited in the upper compartment of a Boyden chamber separated by a filter of nitrocellulose (Millipore, Milford, Mass.) of 3- μm pore diameter. FMet-Phe-Leu (Sigma Chemical Corp., St. Louis, Mo.), a chemoattractant agent for neutrophils, was put in the lower compartment, at 10^{-8} M, to induce chemotaxis. After 3 h of incubation at 37°C and 5% CO_2 , the filter was fixed (methanol 50%) and stained (Diff-Quick pack; Dade, Dürdingen, Switzerland). The chemotactic index (ChI), representing the total number of neutrophils counted at random in 16 fields by optical microscopy (immersion objective) at the lower face of the filters, was calculated.

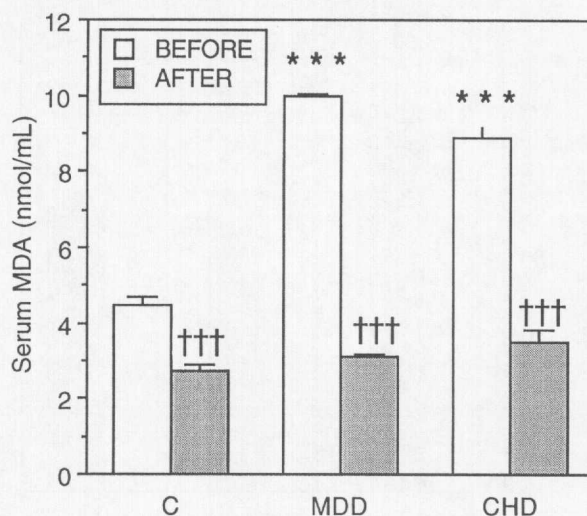
Phagocytosis assay

The assay was carried out following the method described by De la Fuente (1985) for ingestion of inert particles (latex beads). Aliquots of 200 μL of neutrophil suspension were incubated on migration inhibition factor (MIF) plates (Sterilin, Teddington, U.K.) for 30 min, and the adherent monolayer was washed with PBS (phosphate buffered saline, Sigma) at 37°C , and 20 μL latex bead (1.09 μm diluted to 1% PBS) was added. After 30 min of incubation, the plates were washed, fixed (methanol 50%), and stained with the Diff-Quick pack, and the number of particles ingested by 100 neutrophils was determined by optical microscopy (immersion objective) (phagocytosis index, Phi).

Superoxide anion production measurement

Superoxide anion production, the first response in the respiratory burst that starts the destruction of ingested microorganisms, was evaluated by its capacity to reduce the nitroblue tetrazolium (NBT) (Bagasra et al. 1988). The assay was carried out following the method described previously by De la Fuente et al. (1995). Aliquots of 250 μL of

Fig. 1. Serum levels of lipid peroxides before and after vitamin administration. Each column represents the mean \pm SD of 10 values corresponding to 10 women, with each value being the mean of duplicate assays. C, control; MDD, major depressive disorder; CHD, coronary artery disease. *** $p < 0.001$ with respect to control group before vitamin administration; ††† $p < 0.001$ with respect to the corresponding values before vitamin administration.



neutrophil suspension were mixed with 250 μL of NBT (1 mg/mL in PBS) and 20 μL latex bead (1.09 μm diluted to 1% PBS) suspension. After 60 min of incubation, the reaction was stopped with 0.5 M HCl, the samples were centrifuged, the supernatants were discarded, and the reduced NBT was extracted with dioxane (Sigma). Supernatant absorbance at 525 nm was determined in a spectrophotometer using dioxane as a blank control.

Assay of lymphocyte function: lymphocyte culture

The suspensions of mononuclear leukocytes were adjusted to 10^6 lymphocytes/mL of RPMI, supplemented with gentamicin (1 mg/mL, Gibco) and 10% fetal calf serum (Gibco), previously inactivated by heat (30 min at 56°C). Aliquots of 200 μL were dispensed in plates of 96 wells (Costar, Cambridge, Mass.), and 20 μL of phytohemagglutinin (PHA, Flow) to 20 mg/L was used as mitogen. Twenty microlitres of PBS were added to the controls. After 48 h of incubation at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 , 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ (1 Ci = 37 GBq) [^3H]thymidine (Du Pont, Boston, Mass.) was added, followed by another 24 h of incubation. The cells were harvested in a semiautomatic harvester, and thymidine uptake was measured in a beta counter (LKB, Uppsala, Sweden) for 1 min. The results were expressed as [^3H]thymidine uptake (cpm), both in basal and PHA-stimulated cells.

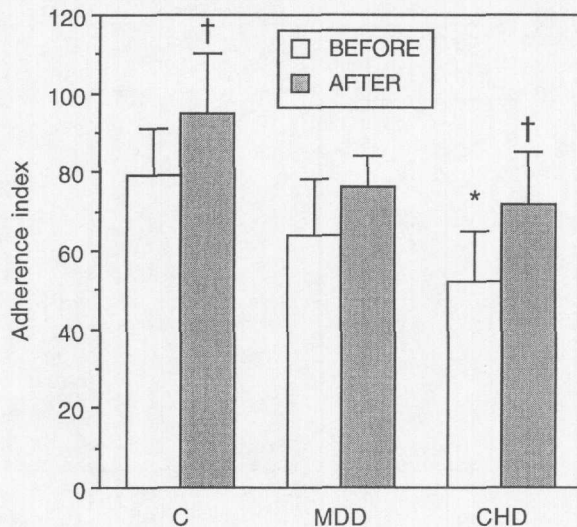
Cortisol levels

The serum cortisol levels were measured using a commercial radioimmunoassay kit (ICN, Costa Mesa, Calif.) with a sensitivity of 7 nmol/L. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 5.8 and 6.5%, respectively.

Statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm SD of 10 values corresponding to 10 subjects, each value being the mean of duplicate assays. The data were evaluated statistically by one-way ANOVA for unpaired observations of parametric data followed by Scheffé's F test between two groups, and Student's t test for paired observations of parametric data. The normality of the samples was confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test. The minimum level of significance is $p < 0.05$.

Fig. 2. Adherence capacity of neutrophils before and after vitamin administration. Each column represents the mean \pm SD of 10 values corresponding to 10 women, with each value being the mean of duplicate assays. C, control; MDD, major depressive disorder; CHD, coronary artery disease. * $p < 0.05$ with respect to control group before vitamin administration; † $p < 0.05$ with respect to the corresponding values before vitamin administration.



Results

The serum concentrations of lipid peroxide (Fig. 1) before vitamin administration were significantly higher ($p < 0.001$) in the major depressive disorder (MDD) group and in the coronary heart disease (CHD) group than in the controls (C). After treatment, the values of lipid peroxidation were significantly decreased ($p < 0.001$) in relation to those before treatment, and a significantly higher value ($p < 0.05$) was found in the CHD group with respect to controls.

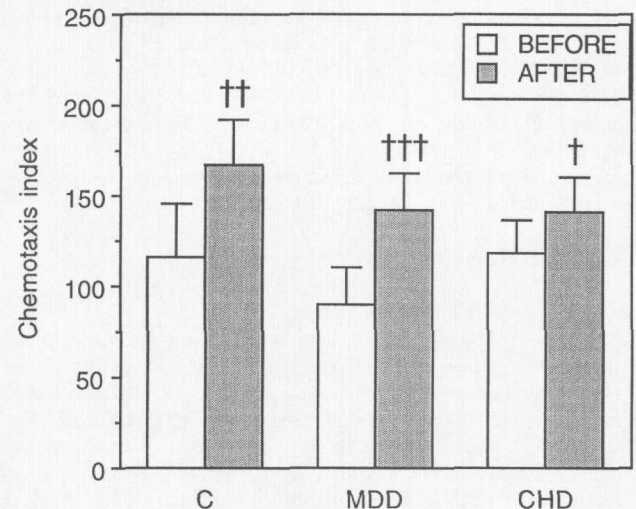
The results of the neutrophil activities expressed in the phagocytic process are shown in Figs. 2–5. Regarding adherence capacity of polymorphonuclear (PMN) neutrophils (Fig. 2) before treatment, the CHD group showed lower values ($p < 0.05$) of adherence indexes (AI) than controls. After vitamin supplementation, the values of AI were increased with respect to the corresponding pretreatment values, with significant differences in the C and CHD groups ($p < 0.05$). Moreover, significantly lower ($p < 0.05$) AI were found in the MDD and the CHD than in the control group.

The chemotaxis indexes of the MDD and CHD groups, before treatment, were similar to those of the C group (Fig. 3). After supplementation, all experimental groups showed significantly higher values ($p < 0.01$ for C, $p < 0.001$ for MDD, and $p < 0.05$ for CHD) than those found before treatment.

Before treatment, both disease groups showed significantly lower phagocytosis indexes (Fig. 4) than the C group ($p < 0.05$ for MDD, and $p < 0.001$ for CHD), and the index of the CHD group was lower than that of the MDD group ($p < 0.001$). After supplementation with vitamins, the three experimental groups presented a significant increase ($p < 0.001$). The values in the MDD group were lower ($p < 0.01$) than in the control group.

The MDD and CHD groups showed significantly higher ($p < 0.001$) values of superoxide anion production compared with

Fig. 3. Chemotaxis capacity of neutrophils before and after vitamin administration. Each column represents the mean \pm SD of 8 values corresponding to 8 women, with each value being the mean of duplicate assays. C, control; MDD, major depressive disorder; CHD, coronary artery disease. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, and ††† $p < 0.001$ with respect to the corresponding values before vitamin administration.



the C group before treatment (Fig. 5). After supplementation there was a significant decrease ($p < 0.05$ in the control group and $p < 0.001$ in the MDD and CHD groups) in superoxide production.

With respect to the lymphocyte function studied, the results of the lymphoproliferation capacity, both basal and in response to PHA, are shown in Figs. 6A and 6B, respectively. Before treatment, the MDD and CHD groups showed a diminished response to 20 mg/L PHA in relation to the C group. After diet supplementation with vitamins, there was a significant increase ($p < 0.001$) in proliferation, both basal and in response to PHA, in all experimental groups. The treatment induced in the CHD group a higher basal proliferation ($p < 0.001$) than in the control and MDD groups; however, the MDD group showed lower values ($p < 0.05$) than the control and CHD groups for PHA proliferation.

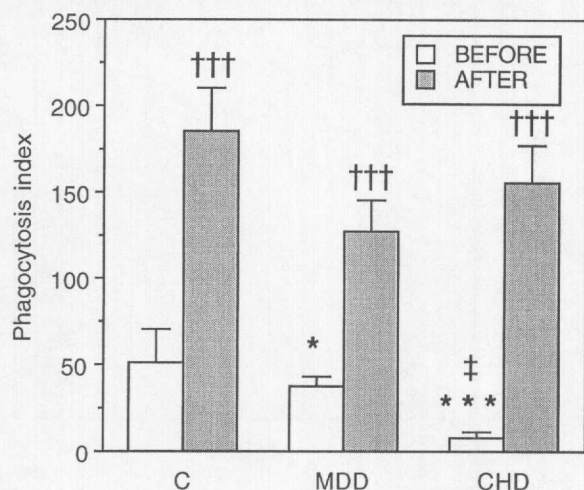
The serum cortisol levels (Fig. 7), before treatment, were higher in the MDD and the CHD groups ($p < 0.01$) than in the C group. After treatment, there was a decrease ($p < 0.01$) in the CHD group in relation to the corresponding values before treatment. In relation to the control, both MDD ($p < 0.01$) and CHD ($p < 0.05$) showed higher values after vitamin administration. The values were lower ($p < 0.05$) for the CHD group than for the MDD group.

Discussion

Relationships between depression (MDD) and heart disease (CHD), and immune changes

Our present data indicate that two chronic diseases often found in ageing, i.e., major depressive disorder (MDD) and coronary heart disease (CHD), result in impaired immune functions (both in PMN neutrophils and in lymphocytes) and in higher levels of serum lipid peroxides and cortisol. Oxygen

Fig. 4. Phagocytic capacity of neutrophils before and after vitamin administration. Each column represents the mean \pm SD of 10 values corresponding to 10 women, with each value being the mean of duplicate assays. C, control; MDD, major depressive disorder; CHD, coronary artery disease; * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ with respect to control group before vitamin administration; ††† $p < 0.001$ with respect to the corresponding values before vitamin administration; ‡ $p < 0.001$ with respect to the corresponding value in the MDD group.

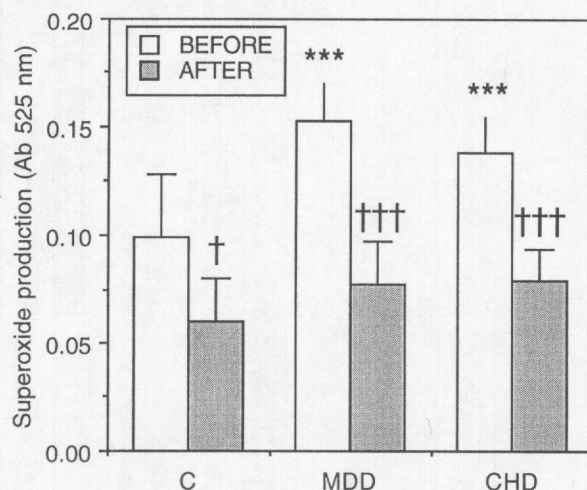


stress could play a pathogenic role in the immune dysfunction, since lipid peroxidation has been assumed to play an important role in the impairment of cell function caused by ageing (Harman 1995). Moreover, Lustyik et al. (1990) suggest that the senescent immune system deficiency derives from peroxidation-related changes in the physical properties of cell membranes, which result in more rigid membrane structures, less able to respond to stimuli. On the other hand, it has also been assumed that the age-related higher plasma levels of cortisol exert an inhibitory effect on immune function (Blalock 1989).

Previous work from other laboratories has already shown that depression and related disorders may be linked to alterations in the immune system, such as decreased immune responses, lower immunoglobulin levels, reduced specific circulating white blood cells, and increased total white blood cells (Herbert and Cohen 1993). Nevertheless, published research abounds in conflicting data. Thus, Stein et al. (1991) reported multiple impairments of immune functions, whereas Brambilla et al. (1995) showed that MDD is not always associated with immune decline. This may be due to a number of potential confounds in the experimental designs and methodologies used. Nevertheless, it seems that alterations in immune function may be secondary to neurobiological changes associated with depression (Stein et al. 1991).

To our knowledge, there are no data showing an association between CHD and immune decline, as seen in the present work. It is possible that the higher levels of lipid peroxidation associated with the atherogenic process in patients with CHD may lead to a decreased immune response. In agreement with this concept, the first lesion associated with atherosclerosis is the fatty streak, which results from accumulation of oxidized low density lipoproteins (LDL) in macrophages (foam cells). Oxidized LDL is much more atherogenic than native LDL,

Fig. 5. Superoxide production by neutrophils measured by the nitroblue tetrazolium (NBT) reduction test in the presence of ingested material (latex beads) before and after vitamin administration. Each column represents the mean \pm SD of 10 values corresponding to 10 women, with each value being the mean of duplicate assays. C, control; MDD, major depressive disorder; CHD, coronary artery disease; *** $p < 0.001$ with respect to control group before vitamin administration; † $p < 0.05$ and ††† $p < 0.001$ with respect to the corresponding values before vitamin administration. Ab: absorbance.



since it is taken up more avidly by macrophages, attracts monocytes, and stimulates the release of macrophage colony-stimulating factor (Steinberg 1991). Apparently, this atherogenic process is linked to elevated blood lipid peroxide concentrations (Santos et al. 1989), which probably trigger the endothelial damage. It is known that plasma contains powerful chain-breaking antioxidants and metal-ion binding proteins that limit lipid peroxidation. A senescent decline in these protective mechanisms may be involved in both atherogenesis and impaired immune response.

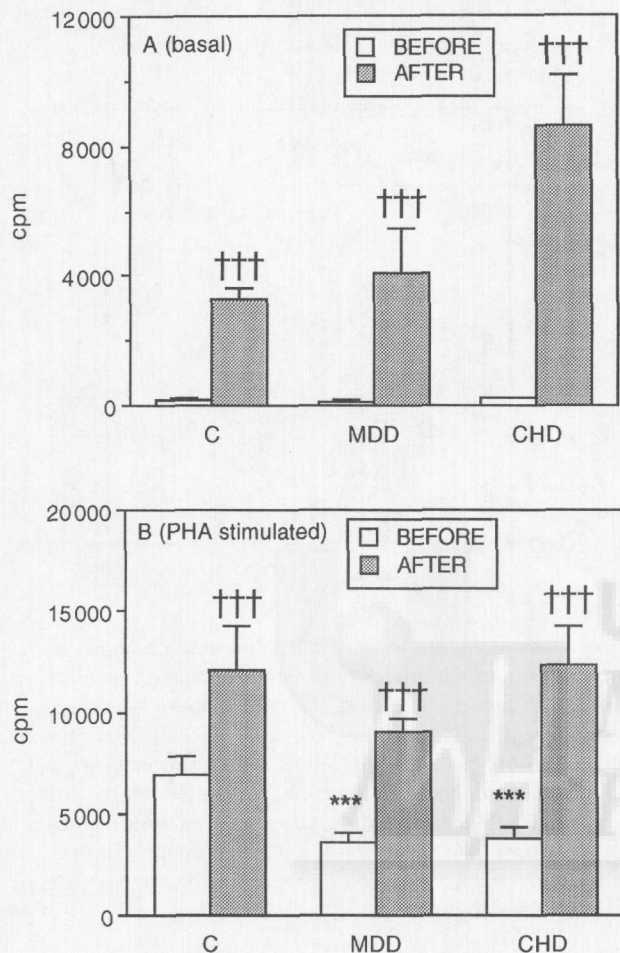
Effects of antioxidant supplementation

The present work shows that antioxidant vitamin supplementation results in a significant reduction of serum lipid peroxides, both in healthy controls and in patients with MDD or CHD. Moreover, we find an improvement of the neutrophil and lymphocyte functions studied and a slight decrease in serum cortisol levels.

Our data are in agreement with recent studies showing that healthy subjects receiving antioxidant supplementation have an improved immune response (Meydani et al. 1995; Jariwalla and Harakeh 1996; Pike and Chandra 1995) and with the observation that infection-related illness appears to be much less frequent in aged subjects receiving antioxidant-enriched diets (Meydani et al. 1990; Penn et al. 1991), which is attributed to the beneficial effects of vitamins E (Meydani et al. 1995) and C (Beyer 1994; Jariwalla and Harakeh 1996).

In the present study, on the one hand, we observed that adherence, chemotaxis, and phagocytic capacities of neutrophils are increased after antioxidant treatment. This means that these cells are activated regarding their ability to reach and ingest bacterial and other foreign bodies, i.e., to improve their

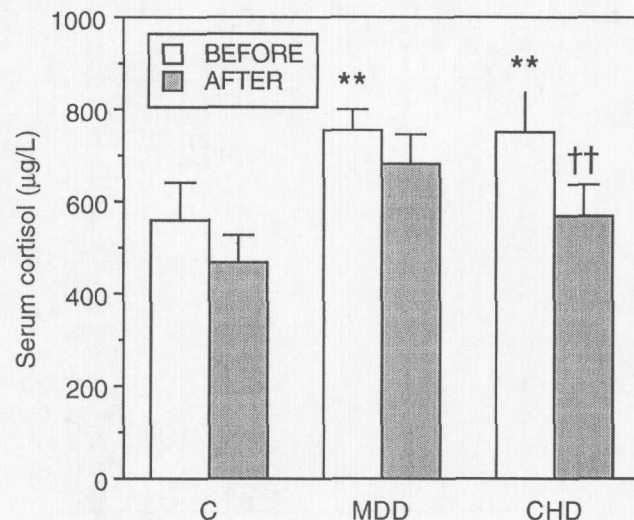
Fig. 6. Lymphoproliferation in (A) basal and (B) in response to phytohemagglutinin (PHA). Each column represents the mean \pm SD of 10 values corresponding to 10 women, with each value being the mean of triplicate assays. C, control; MDD, major depressive disorder; CHD, coronary artery disease. *** $p < 0.001$ with respect to control group before vitamin administration; ††† $p < 0.001$ with respect to the corresponding values before vitamin administration.



defence function. The ingestion of antioxidants also appears to slow down the increase in superoxide production by phagocytes that usually occurs with ageing (De la Fuente et al. 1995), an effect that may be beneficial since it prevents an excessive oxidative stress. On the other hand, one of the central events implicated in the development of the immune response is the proliferation of activated lymphocytes that results in the clonal expansion of functional antigen-specific cells. The decrease of peripheral blood lymphocyte proliferation in elderly humans (Miller 1996) seems to reflect a progressively decreasing proportion of functional T cells rather than a uniform decline in function of all cells (Spaulding et al. 1997), which could be due to the excessive apoptosis of those lymphocytes (Phelouzat et al. 1996). Since antioxidants are known to inhibit apoptosis (Briehl and Baker 1996), this could be the mechanism responsible for the antioxidant-caused improvement of the lymphoproliferative response.

Since the changes observed in the immune parameter studied bring the values closer to those usually observed in young subjects, we can hypothesize that the antioxidant vitamin treat-

Fig. 7. Serum cortisol levels before and after vitamin administration. Each column represents the mean \pm SD of 10 values corresponding to 10 women, with each value being the mean of duplicate assays. C, control; MDD, major depressive disorder; CHD, coronary artery disease. ** $p < 0.01$ with respect to control group before vitamin administration; †† $p < 0.01$ with respect to the corresponding values before vitamin administration.



ments should be beneficial to health. An improved immune function after antioxidant ingestion is being reported by an increasing number of authors (Meydani 1991; Meydani et al. 1995; Jariwalla and Harakeh 1996; Pike and Chandra 1996; Beharka et al. 1997). A beneficial effect of the antioxidant treatment is also suggested by our MDA data. The serum MDA values obtained in the controls before treatment were similar to those published by Meydani (1991) using the same method. This author also found that older subjects had higher levels of thiobarbituric reactive substances (TBARS) than young subjects. The difference between young and old subjects was similar to that found in the present study between the before and after antioxidant treatment levels. Thus, it appears that the products of lipid peroxidation, which have suppressive capacity of immune function (Meydani 1991), are decreased by antioxidant vitamin intake.

With regard to MDD, despite the effectiveness of the antioxidant vitamins in preventing immune depression, it is premature to recommend their therapeutic application until more definitive evidence is obtained on health-related immune changes in depressive disorders (Stein et al. 1991). To our knowledge there is no published evidence of the effect of the treatment with antioxidant vitamins in MDD patients and, although our results suggest an improvement of immune response in those patients, there is no conclusive proof of the therapeutic value of the treatment on the psychological manifestations of depression.

In CHD patients, if oxidants do indeed initiate atherosclerosis or contribute to its pathology, then an increased intake of antioxidants (especially lipid-soluble chain-breaking antioxidants that accumulate in lipoproteins) should be expected to have a beneficial effect. There is a solid scientific basis to explain how antioxidants might protect against atherosclerosis (Steinberg 1991; Jacob and Burri 1996). In this

context, epidemiological studies showed that large vitamin E intake is associated with a decreased risk of coronary heart diseases (Meydani et al. 1995). Vitamin C intake was reported to be inversely related to cardiovascular disease and total morbidity in men (Jialal et al. 1990). However, epidemiological studies cannot establish causal relations. In addition, in these studies, increased vitamin supplements were also associated with a greater health concern, decreased rates of smoking, and increased amounts of exercise. In any case, our results indicate an enhanced *ex vivo* immune response following antioxidant supplementation.

In conclusion, this preliminary study, in spite of its limitations, suggests that the intake of antioxidant vitamin supplements by aged people, both healthy and sick, may improve their immune response.

Acknowledgements

The authors thank Dr. A. Hernanz for valuable advice and M. Carazo for technical assistance. This work was supported by FIS grants 94/1348, 95/1623, and 97/2078.

References

- Bagasra, O., Howedy, A., and Kajdascy-Balla, A. 1988. Macrophage function in chronic experimental alcoholism. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunology*, **65**: 405–409.
- Beharka, A.A., Wu, D., Han, S.N., and Meydani, S.N. 1997. Macrophage prostaglandin production contributes to the age-associated decrease in T cell function which is reversed by the dietary antioxidant vitamin E. *Mech. Ageing Dev.* **93**: 59–77.
- Bendich, A. 1990. Antioxidants micronutrients and immune response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **587**: 168–180.
- Beyer, R.E. 1994. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 349–358.
- Blalock, I.E. 1989. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and the neuroendocrine system. *Physiol. Rev.* **69**: 1–31.
- Boyden, S.V. 1962. The chemotaxis effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* **115**: 453–456.
- Brambilla, F., Maggioni, M., Cenacchi, T., Sacerdote, P., and Panerai, A.R. 1995. T-lymphocyte proliferative response to mitogen stimulation in elderly depressed patients. *J. Affective Disord.* **36**: 51–56.
- Briehl, M.M., and Baker, A.F. 1996. Modulation of antioxidant defence as a factor in apoptosis. *Cell Death Differ.* **3**: 63–70.
- Burton, G.W., Joyce, A., and Ingold, K.U. 1983. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch. Biochem. Biophys.* **221**: 281–290.
- Chew, B.P. 1995. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *J. Nutr.* **125**: 1804S–1808S.
- Coquette, A., Vray, B., and Vanderpas, J. 1986. Role of vitamin E in the protection of the resident macrophage membrane against oxidative damage. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **94**: 529–534.
- De la Fuente, M. 1985. Changes in the macrophage function with ageing. *Comp. Biochem. Physiol. A, Comp. Physiol.* **81**: 935–938.
- De la Fuente, M., Ferrández, M.D., Muñoz, F., De Juan, E., and Miquel, J. 1993. Stimulation by the antioxidant thioprolin of the lymphocyte functions of old mice. *Mech. Ageing Dev.* **68**: 27–36.
- De la Fuente, M., Hernanz, A., Collazos, M.E., Barriga, C., and Ortega, E. 1995. Effects of physical exercise and ageing on ascorbic acid superoxide anion levels in peritoneal macrophages from mice and guinea pigs. *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **165**: 315–319.
- De la Fuente, M., Carrasco, M., and Hernanz, A. 1997. Modulation of human neutrophil function *in vitro* by gastrin. *J. Endocrinol.* **153**: 475–483.
- Frei, B., England, L., and Ames, B.N. 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 6377–6381.
- Globerson, A. 1995. T lymphocytes and Ageing. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **107**: 491–497.
- Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., and Aruoma, O. 1995. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**: 7–20.
- Harman, D. 1956. Ageing: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 298–300.
- Harman, D. 1995. Role of antioxidant nutrients in ageing: overview. *Age*, **18**: 51–62.
- Hatman, L.J., and Kayden, H.J. 1979. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. *J. Lipid Res.* **20**: 639–645.
- Herbert, T.B., and Cohen, S. 1993. Depression and immunity: a meta-analytic review. *Psychol. Bull.* **113**: 474–486.
- Hernanz, A., Collazos, M.E., and De la Fuente, M. 1990. Effect of age, culture media and lymphocyte presence in ascorbate content of peritoneal macrophage from mice and guinea pigs during phagocytosis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **91**: 166–170.
- Indelicato, S.R., Udupa, K.B., Balazovich, K.J., Boxer, L.A., and Lipschitz, D.A. 1990. Effect of age on phorbol-ester stimulation of human neutrophils. *J. Gerontol.* **45**: B75–B80.
- Jacob, R.A., and Burri, B.J. 1996. Oxidative damage and defense. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**: 985S–990S.
- Jariwalla, R.J., and Harakeh, S. 1996. Antiviral and immunomodulatory activities of ascorbic acid. *In Subcellular biochemistry. Vol. 25. Ascorbic acid: biochemistry and biomedical cell biology. Edited by J.R. Harris. Plenum Press, New York. pp. 215–231.*
- Jialal, I., Vega, G.L., and Grundy, S.M. 1990. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, **82**: 185–191.
- Kline, K., Rao, A., and Romach, E.H. 1990. Vitamin E modulation of disease resistance and immune responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **587**: 294–298.
- Lustyik, G., Hallgren, H.M., Bergh, N., and O'Leary, J.J. 1990. Effect of preliminary culture on the membrane microviscosity of lymphocytes from young and old donors. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **10**: 77–88.
- Makinodan, T., and Kay, M. 1980. Age influence on the immune system. *Adv. Immunol.* **29**: 287–329.
- McGregor, R., Spagnoulo, P., and Lentnek, A. 1974. Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone and aspirin, measured with a new assay system. *N.Engl. J. Med.* **291**: 642.
- Meydani, S.N. 1991. Dietary modulation of the immune response in the aged. *Age*, **14**: 108–115.
- Meydani, S.N., Barklund, M.P., Liu, S., Meydani, M., Miller, R.A., Cannon, J.G., Morrow, F.D., Rocklin, R., and Blumberg, J.B. 1990. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **52**: 557–563.
- Meydani, S.N., Wu, D., Santos, M.S., and Hayek, M. 1995. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**: 1462S–1476S.
- Miller, R.A. 1996. Ageing and the immune response. *In Handbook of the biology of ageing. Edited by E. Schneider and J. Rowe. Academic Press, San Diego. pp. 355–392.*
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J.E., and Johnson, J.E. 1980. Mitochondrial role in cell ageing. *Exp. Gerontol.* **15**: 575.
- Niki, E., Yamamoto, Y., and Takahashi, M. 1988. Free-radical mediated damage of blood and its inhibition by antioxidants. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **34**: 507–512.

- Ohkawa, M., Onishi, N., and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**: 351–358.
- Ortega, E., Barriga, C., and De la Fuente, M. 1993. Ageing and non-specific immune response. *In Facts and research in gerontology. Edited by J.L. Albaréde and P. Vellas.* P. Serdi, Paris. pp. 23–29.
- Penn, N.D., Purkins, L., Kelleher, J., Heatley, R.V., Mascie-Taylor, B.H., and Belfield, P.W. 1991. The effect of dietary supplementation with vitamins A, C and E on cell-mediated immune function in elderly long-stay patients: a randomized controlled trial. *Age Ageing*, **20**: 169–174.
- Phelouzat, M.A., Arbogast, A., Laforge, T., Quadri, R.A., and Proust, J.J. 1996. Excessive apoptosis of mature T lymphocytes is a characteristic feature of human immune senescence. *Mech. Ageing Dev.* **88**: 25–38.
- Pieri, C., Recchioni, R., and Moroni, F. 1993. Age-dependent modifications of mitochondrial trans-membrane potential and mass in rat splenic lymphocytes during proliferation. *Mech. Ageing Dev.* **70**: 201–212.
- Pike, J., and Chandra, R.K. 1995. Effect of vitamin and trace element supplementation on immune indices in healthy elderly. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **65**: 117–121.
- Santos, M.Y., Valles, J., and Aznar, J. 1989. Plasma lipid peroxides in patients with vascular disease and in middle-aged normal subjects with a high risk of atherosclerosis. *In CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. Edited by J. Miquel, A. Quintanilha, and H. Weber.* CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 237–254.
- Solana, R., Villanueva, J.L., Peña, J., and De la Fuente, M. 1991. Cell mediated immunity in ageing. *Comp. Biochem. Physiol. A, Comp. Physiol.* **99**: 1–4.
- Sondell, K., Athlin, L., Bjermer, L., Eriksson, S., and Norberg, B. 1990. The role of sex and age in yeast cell phagocytosis by monocytes from healthy blood donors. *Mech. Ageing Dev.* **51**: 55–59.
- Spaulding, C.C., Walford, R.L., and Effros, R.B. 1997. The accumulation of non-replicative, non-functional, senescent T cells with age is avoided in calorically restricted mice by an enhancement of T cell apoptosis. *Mech. Ageing Dev.* **93**: 25–33.
- Spitzer, R.L., and Williams, B.W. 1983. Structured clinical interview for DSM-III-Upjohn version. Biometric Research Division, New York State Psychiatric Institute, New York.
- Stein, M., Miller, A.H., and Trestman, R.L. 1991. Depression and the immune system. *In Psychoneuroimmunology. Edited by R. Ader, D.L. Felten, and N. Cohen.* Academic Press, San Diego, Calif. pp. 897–930.
- Steinberg, D. 1991. Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation*, **84**: 1420–1425.
- Watson, R.R., and Leonard, T.K. 1986. Selenium and vitamins A, E, and C: nutrients with cancer preventative properties. *J. Am. Diet. Assoc.* **86**: 505–510.



Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women

MONICA DE LA FUENTE¹, ANGEL HERNANZ², NOELIA GUAYERBAS¹,
VICTOR MANUEL VICTOR¹, & FRANCISCO ARNALICH³

¹Department of Animal Physiology, Faculty of Biological Science, Complutense University of Madrid, and ²Biochemistry Department and ³Internal Medicine Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

Accepted by Professor A. Azzi

(Received 9 September 2007; in revised form 28 December 2007)

Abstract

The effects of diet supplementation with the antioxidant vitamin E (200 mg daily) on several blood neutrophil, lymphocyte and natural killer cell functions have been investigated in healthy elderly men and women before supplementation, after 3 months of supplementation and 6 months after the end of supplementation (post-supplementation). In parallel, samples of healthy adult men and women were used as age controls. In elderly men and women, an impairment of immune functions was observed in comparison with the respective adult controls and the intake of vitamin E resulted in a significant enhancement of immune parameters in both elderly men and women, bringing their values close to those in the adults. These effects were not found in post-supplementation samples in several but not in all functions. The present findings suggest that supplementation with vitamin E can produce an improvement of immune functions and therefore of health in aged people.

Keywords: Vitamin E, ageing, lymphocytes, neutrophils, men, women

Introduction

Ageing is associated with a decline in cell and tissue functions, including those of the immune system, both in humans and in many other mammalian species [1–4]. The immunosenescence seems to contribute significantly to morbidity and mortality in the elderly through the age-related increase of cancer and especially of infectious diseases [5]. Thus, it is presently accepted that immune function is related not only with health but with longevity as well [4,6,7] and individuals who live longer in good health, such as centenarians or very old animals, are equipped with optimal immune cell defense mechanisms [8].

Free radicals, because of their high potential to damage biological systems, have been proposed as

contributing factors to ageing [9–11]. However, since the reactive oxygen species (ROS) have a pivotal role in the regulation of many cellular processes [12], an adequate oxidant–antioxidant balance is very important for maintaining cell functions. This balance is critical in the cells of the immune system, since these cells synthesize ROS as key agents for their functions [13] and they are particularly sensitive to oxidative stress because of the high content of polyunsaturated fatty acids in their plasma membranes [14]. Moreover, the integrity and function of lipids, proteins and nucleic acids as well as the control of signal transduction of gene expression in immune cells are very dependent on the maintenance of the oxidant–antioxidant balance [14–16]. Therefore, it is not surprising that immune cells usually contain higher

Correspondence: Professor M. De la Fuente, PhD, Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Fax: +34 1 394 4935. E-mail: mondelaf@bio.ucm.es

concentrations of antioxidant compounds than other cells [17].

With ageing, an imbalance between oxidant production and antioxidant levels appears in favour of the former with resulting oxidative stress [11,18]. Antioxidants, such as vitamins E and C, β -carotene and others, have been proposed as reagents able to retard, reverse or prevent the oxidative damage and therefore the general physiological impairment associated with ageing [11] and in particular immunosenescence [3,4,19–21].

Vitamin E is the most important lipid-soluble antioxidant present in body tissues and is considered the first line of defense against lipid peroxidation [22]. Vitamin E deficiency in aged humans is relatively scarce in the Western countries [23] and for this reason, there is little work on deficiency of this vitamin and immune function. The few studies performed on this subject show that the vitamin E deficiency seems to be linked to impaired cell-mediated immunity [24]. In addition, previous studies have shown that vitamin E supplementation improves T-cell mediated function in the elderly [20,25–28] and that the optimal dose is 200 IU/day [25]. *In vitro* and *in vivo* animal studies by us and others indicate that vitamin E can also improve the function of other cells of the immune system [29–33]. No information, however, is available on the effect of vitamin E supplementation on a relevant function of lymphocytes such as the chemotaxis or the effects of this supplementation on the function of neutrophils or NK cells in the elderly. Thus, we conducted a study to determine the effect of vitamin E supplementation in elderly healthy men and women at 200 mg/day during a short period of time (3 months) on several immune functions, as well as the time of prevalence of these effects. The study was carried out on the three most representative immune cells in human peripheral blood, namely lymphocytes, phagocytic cells, i.e. neutrophils, and NK cells and on several important functions that have been shown to change with age [3,7,16]. In lymphocytes, the adherence to endothelium, the mobility directed to the infectious focus by a chemoattractant gradient (chemotaxis), the proliferative response to mitogens and the IL-2 production have been analysed. In neutrophils we have studied the different steps of their phagocytic process, such as adherence to endothelium, chemotaxis, ingestion of foreign agents and their destruction with the help of oxygen free radicals, starting with superoxide anion. In NK cells the cytotoxic activity against tumoral cells was analysed.

Materials and methods

Subjects

A group of 33 elderly women and men (mean age \pm SD: 70.4 ± 5.1 years old) and 30 adult women and

men (29.7 ± 4.9 years old) who volunteered were used for this study. All elderly subjects were selected according to the immunogerontological 'SENIEUR' protocol [34]. All subjects showed good health, as defined by normal findings in physical, haematological and biochemical screening tests, they had normal body weight and physical examination, they did not take any medication for at least 2 months before the start of the study, did not smoke and gave informed written consent. Exclusion criteria were abnormal laboratory values, malignancies, inflammation and infection influencing the immune system. The participating women and men were not hospitalized during the course of the investigation. They resided in their homes and consumed a physician-supervised balanced Mediterranean diet that was not very rich in poly-unsaturated fatty acids, since the main cooking fat was olive oil. There was no change in the diet throughout the study for any of the subjects. The study protocol was carried out in agreement with the Declaration of Helsinki (1989) and was approved by the Ethics Committee of the La Paz Hospital.

Vitamin E supplementation

Elderly subjects (18 women and 15 men) received a daily supplement of 200 mg of dl-alpha-tocopherol (Alcala Farma) for 3 months. This dose was chosen on the basis of previous work from our laboratory [27] and especially of the work of Meydani et al. [25] in which that dose of vitamin E was the most effective at improving T-cell mediated function.

Peripheral venous blood samples from elderly subjects were drawn by vein puncture from 9–10 am, in tubes with EDTA (for determination of immune cell functions), before (BT), after 3 months of supplementation (T) and 6 months after the end of supplementation, without intake of vitamin E (post-supplementation, PT). At each time point five men and five women, healthy adults, were studied and the 15 men and 15 women used as controls.

Separation of blood neutrophils and lymphocytes

Cells were obtained from EDTA samples by centrifugation at 300 g for 30 min in a density gradient (1.114) using monopoly resolving medium (Flow Laboratories, McLean, VA). Differential migration during centrifugation resulted in the formation of two halos and a red blood cell pellet. The superior halo consisted of mononuclear lymphocytes and monocytes and the inferior halo of polymorphonuclear neutrophils. The cells were harvested, washed twice in Hank's medium for neutrophils or RPMI medium (Gibco, Burlington, Ontario, Canada) for lymphocytes, counted and adjusted to 5×10^5 neutrophils/ml medium and 1×10^6 lymphocytes/ml medium. Cell viability was checked by the trypan blue exclusion test. Viable cells were over 98%.

Assays of neutrophil functions

The adherence capacity of neutrophils was measured following the method described by McGregor et al. [35]. This method mimics *in vitro* the adherence of neutrophils to the vascular endothelium and it has been followed for evaluating adherence in other studies [36]. Briefly, 1 mL blood (diluted 1:1 with Hank's medium) was placed in a Pasteur pipette in which 50 mg of nylon fibre was packed to a height of 1.25 cm. After 10 min, the effluent had drained by gravity. The percentage of adherence or adherence index (AI) was calculated as follows:

$$\text{AI} = 100 - \frac{(\text{neutrophils per mL of effluent samples})}{(\text{neutrophils per mL of original samples})} \times 100.$$

The induced mobility or chemotaxis was evaluated by a modification [36,37] of the original technique described by Boyden [38], which measures the mobility capacity of neutrophils towards an infectious focus. Aliquots of 0.3 ml of the neutrophil suspension (10^6 neutrophils/ml) were deposited in the upper compartment of a Boyden chamber separated by a filter of nitrocellulose (Millipore, Milford, MA) of 3 μm pore diameter. Fmet-phe-leu (Sigma, St. Louis, MO), a chemoattractant agent for neutrophils, was put in the lower compartment at 10^{-8} M to induce chemotaxis. After 3 h of incubation at 37°C and 5% CO₂, the filter was fixed (methanol 50%) and stained (Diff-Quick pack; Dade, Düringen, Switzerland). The chemotactic index (ChI), representing the total number of neutrophils counted by optical microscopy (immersion objective) on one-third of the lower face of the filters, was calculated.

The phagocytosis assay was carried out following the method previously described [36] for ingestion of inert particles (latex beads). Aliquots of 200 μL of neutrophil suspension were incubated on migration inhibition factor (MIF) plates (Sterilin, Teddington, UK) for 30 min and the adherent monolayer was washed with PBS (phosphate buffer saline) at 37°C, and 20 μL latex beads (1.09 μm diluted to 1% PBS, Sigma) were added. After 30 min of incubation, the plates were washed, fixed (methanol 50%) and stained with the Diff-Quick pack and the number of particles ingested by 100 neutrophils was determined by optical microscopy (immersion objective) as phagocytosis index (PhI).

Superoxide anion production, the first response in the respiratory burst, which starts the destruction of ingested micro-organisms, was evaluated by its capacity to reduce nitroblue tetrazolium (NBT). The assay was carried out following the method described previously [36]. Aliquots of 250 μL of neutrophil suspension were mixed with 250 μL of NBT (1 mg/mL in PBS, Sigma) and 20 μL latex bead (1.09 μm diluted to 1% PBS, Sigma) suspension (stimulated samples)

and 20 μL of PBS (non-stimulated samples). After 60 min of incubation, the reaction was stopped with 0.5 N HCl, the samples were centrifuged, the supernatants discarded and the reduced NBT extracted with dioxane (Sigma). Supernatant absorbance at 525 nm was determined in a spectrophotometer using dioxane as a blank control. The data obtained were expressed as nmol NBT reduced by 10^6 neutrophils by extracting in a standard curve of NBT reduced with 1,4-dithioerythritol (Roche, Basel, Switzerland).

Assays of lymphocyte function

Lymphocyte adherence and chemotaxis methods were similar to the above described in neutrophils, previously carried out with lymphocytes [39].

The lymphoproliferation assay was performed by a standard method, previously used by us [27,37,40]. The suspensions of mononuclear leukocytes were adjusted to 10^6 lymphocytes/mL of RPMI (Gibco) supplemented with gentamicin (1 mg/mL, Gibco) and 10% foetal bovine serum (FBS) (Gibco), previously inactivated by heat (30 min at 56°C). Aliquots of 200 μL were dispensed in plates of 96 wells (Costar, Cambridge, MA) and 20 μL of phytohemagglutinin (PHA, Flow) to 20 mg/L was used as mitogen; 20 μL of PBS were added to controls. After 48 h of incubation, 0.5 μCi /well ³H-thymidine (Dupont, Boston, MA) was added, followed by another 24 h of incubation. The cells were harvested in a semiautomatic harvester and thymidine uptake was measured in a beta counter (LKB, Uppsala, Sweden) for 1 min. The results were expressed as ³H-thymidine uptake (cpm), both in basal and PHA stimulated cells.

The natural killer activity was measured following an enzymatic colourimetric assay for cytolysis measurements of target cells (Cytotox 96 TM Promega, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) based on the determination of LDH using tetrazolium salts. This method has been demonstrated to provide identical values (within experimental error) to those obtained by parallel ⁵¹Cr release assays in murine cells [32]. Cells K-562 from a human lymphoma were used as targets in the assay. These cells were maintained in complete medium (RPMI-1640 plus 10% FBS), being checked and counted periodically. Target cells were seeded in 96-well U-bottom culture plates at 10^4 cells/well in RPMI medium without phenol red. Effector cells (lymphocytes) were added at 10^5 cells/well. The effector/target rate used, 10/1, was found by us to be responsible for similar results to those obtained in a previous work with radioactive techniques [32]. The plates were centrifuged at 250 g for 4 min to facilitate cell-to-cell contacts and then they were incubated for 4 h. After incubation, LDH activity was measured by addition of the enzyme substrate and absorbance recording at 490 nm. Four

kinds of control measurements were performed: a target spontaneous release, a target maximum release, an effector spontaneous release and a volume correction control to adjust the volume change caused by the addition of lysis solution to the maximum release control wells. To determine the percentage of target cells killed, the following equation was used:

$$\% \text{ lysis} = ((E - ES - TS)/(M - TS)) \times 100$$

where *E* is the mean of absorbance in the presence of effector cells, *ES* the mean of absorbance of effector cells incubated alone and *M* the mean of maximum absorbance after incubating target cells with lysis solution.

Interleukin-2 release assay

The concentration of interleukin-2 (IL-2) was determined on supernatants of lymphocyte cultures in the presence of ConA following a method previously described by us [40]. After 48 h of incubation with ConA (1 mg/ml), the supernatants were collected and frozen at -20°C until assay. IL-2 was measured using an ELISA kit (R & D Systems, Minneapolis, MN).

Statistical study

Data are expressed as the mean ± SD of the values corresponding to subjects, being each value the mean of duplicate assays (two samples from the same blood). The data were evaluated statistically by the one-way analysis of variance (ANOVA) for paired observations, used to evaluate vitamin E supplementation in the aged groups, followed by the Scheffe's *F* post-hoc procedure. The two-way ANOVA test for unpaired observations was used for age and gender groups, followed by the Scheffe's *F*-test. The normality of the samples was confirmed by the Kolmogorov-

Smirnov test, *p* < 0.05 being the minimum level of significance.

Results

The results of the neutrophil activities expressed in the phagocytic process are shown in Table I. Regarding adherence capacity of PMN neutrophils, the aged groups before supplementation (BT) showed higher values (*p* < 0.001) of adherence indexes (AI) than adult controls. After vitamin supplementation (T), the values of AI were decreased with respect to the corresponding BT values in the female and male groups (*p* < 0.01), showing similar values to those of cells from the adults. After 6 months without vitamin E ingestion (PT) the values of AI remained lower than those of BS (*p* < 0.05) in both men and women. The chemotaxis indexes (CI) of neutrophils of elderly women and men, before supplementation (BT), were lower than those of the adult groups (*p* < 0.001). After supplementation (T), these indexes showed significantly higher values (*p* < 0.05) than those found in BT, although these values were still lower (*p* < 0.05 in women and *p* < 0.001 in men) than those of adults. In the PT groups the CI brought the values near those of the BT. The phagocytosis indexes (PI), lower in neutrophils from elderly women than in those from adult women (*p* < 0.05), increased after supplementation with vitamin E (*p* < 0.01 in women and *p* < 0.001 in men). In the PT groups the values decreased (*p* < 0.01 in women and *p* < 0.05 in men) with respect to the values after supplementation. The values of superoxide anion production in stimulated and non-stimulated neutrophils in the aged BT groups were significantly higher (*p* < 0.01 in women and *p* < 0.001 in men) than in the adult groups. After supplementation (T) there was a significant decrease

Table I. Several functions of neutrophils from elderly men and women before (BT) and after (T) a daily supplementation of 200 mg vitamin E for 3 months, as well as after 6 months post-supplementation (PT).

Functions	Women						Men		
	Adult (n = 15)	Elderly (n = 18)			Adult (n = 15)	Elderly (n = 15)			
		BT	T	PT		BT	T	PT	
Adherence (AI)	41 ± 10	67 ± 10 ^c	39 ± 15 ^{**}	52 ± 8 ^{*a}	50 ± 8	63 ± 5 ^c	47 ± 12 ^{**}	48 ± 10 [*]	
Chemotaxis (CI)	627 ± 139	357 ± 80 ^c	486 ± 125 ^{*a}	410 ± 102 ^b	691 ± 87	427 ± 68 ^c	512 ± 72 ^{*c}	377 ± 64 ^c	
Ingestion (PI)	176 ± 40	141 ± 32 ^a	220 ± 46 ^{**}	151 ± 43 ⁺⁺	132 ± 30	139 ± 26	264 ± 37 ^{***c}	203 ± 46 ^{*b+}	
O ₂ ⁻ levels (nmol/10 ⁶ cells)									
NS	36 ± 16	57 ± 18 ^b	32 ± 13 [*]	50 ± 15 ⁺	39 ± 17	91 ± 19 ^c	26 ± 3 ^{***}	60 ± 15 ^{*++}	
S	51 ± 11	77 ± 17 ^b	48 ± 19 ^{**}	74 ± 14 ⁺	57 ± 20	116 ± 16 ^c	47 ± 13 ^{***}	70 ± 12 ^{***}	

The data are expressed as the mean ± SD of the values. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 with respect to the corresponding BT values. ^a*p* < 0.05, ^b*p* < 0.01 and ^c*p* < 0.001 with respect to the corresponding adult value. ⁺*p* < 0.05 and ⁺⁺*p* < 0.01 with respect to the corresponding S values. AI (adherence index) = 100 - (neutrophils per mL of effluent samples/neutrophils per mL of original samples) × 100. CI (chemotaxis index) was the number of neutrophils in the lower face of the filter. PI (phagocytosis index) was the number of the latex beads ingested per 100 neutrophils. NS (non-stimulated), S (stimulated samples with latex bead suspension).

($p < 0.05$ or $p < 0.01$, for non-stimulated and stimulated samples, respectively, in women and $p < 0.001$ in men) in superoxide production, with similar values to those found in adults. In the PT groups the values were increased ($p < 0.05$ in women and $p < 0.05$ or $p < 0.01$ in men for stimulated and non-stimulated samples, respectively) with respect to those after supplementation (T). However, in men the superoxide levels remained lower than in BT groups ($p < 0.01$ in stimulated samples and $p < 0.05$ in non-stimulated samples).

With respect to the lymphocyte functions studied, the results of adherence (AI) and chemotaxis (CI) are shown in Figure 1. The AI of lymphocytes from elderly subjects before supplementation (BT) were higher than those from adults ($p < 0.05$ in women and $p < 0.01$ in men). After vitamin supplementation (T), the values of AI were decreased with respect to the corresponding BT values in women and men ($p < 0.01$), showing similar values to those in cells from adults. In PT the values of AI, in both men and women, were similar to those found before

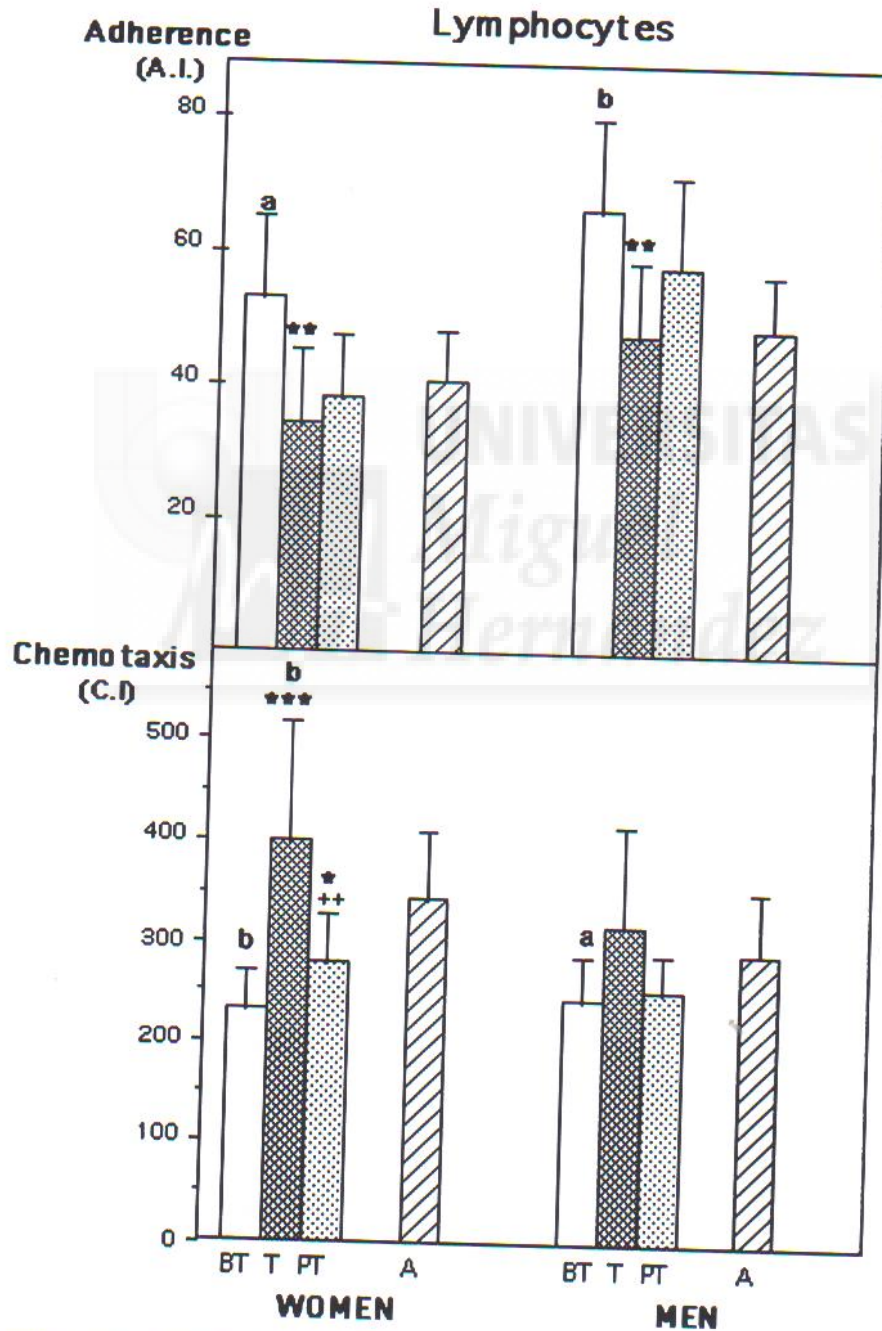


Figure 1. Adherence capacity (up) and chemotaxis capacity (down) of lymphocytes from elderly subjects before (BT), after 3 months of vitamin E supplementation (T) and 6 months after the end of supplementation without vitamin E intake (PT). Each column represents the mean \pm SD of the values corresponding to 18 women or 15 men, each value being the mean of duplicate assays. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ with respect to the corresponding BT values. ^a $p < 0.05$ and ^b $p < 0.01$ with respect to the corresponding adult (A) values (15 women and 15 men). ++ $p < 0.01$ with respect to the corresponding T-values.

supplementation (BT). The chemotaxis of lymphocytes was lower in elderly men ($p < 0.05$) and women ($p < 0.01$) than in the adults. With vitamin E supplementation this function increased in cells from women ($p < 0.001$), decreasing after 6 months without supplementation ($p < 0.01$), although preserving values higher than those before supplementation ($p < 0.05$).

The lymphoproliferative capacity in response to PHA, the IL-2 release and the NK activity are shown in Figure 2. These parameters were lower in cells from elderly men and women than in adults ($p < 0.001$ in proliferation and IL-2 and $p < 0.05$ and $p < 0.01$ in NK of women and men, respectively). After the supplementation with vitamin E (T) all these functions were stimulated ($p < 0.001$ in proliferation and $p < 0.01$ in IL-2 and NK), showing similar or higher values ($p < 0.01$ in proliferation of lymphocytes from women) than in adults. After 6 months without supplementation of vitamin E (PT) the values decreased, being similar to those found for BT, with the exception of NK activity in cells from men, which maintain values higher ($p < 0.05$) than BT.

Discussion

The present work shows that the intake of 200 mg/day of vitamin E supplementation in elderly men and women during 3 months results in a significant improvement of several functions of lymphocytes, neutrophils and NK cells, which are those that suffer an impairment with age [3,4,16]. These results expand and confirm the previous data about the enhanced T-cell-mediated immunity in healthy elderly human subjects by vitamin E supplementation [19,25,27,28].

The oxidation theory of ageing has been supported by the increased vitality and life-span of mice administered antioxidants [41]. Moreover, in unpublished work from our laboratory, we have also found that mice with an antioxidant-supplemented diet show a significant increase in their life-span. Other experimental evidence supports this fact, showing that antioxidants such as vitamin E may prevent or delay the oxidative stress and the physiological impairment associated with ageing [11]. Since the immune system is a health marker and longevity predictor [4,6,7] and since its age-related impairment [1-4,42] may be a consequence of oxidative stress [4,18], diet supplementation with antioxidants has been investigated as a way to prevent or even reverse that age-related immune dysfunction [3,4,21], thus increasing health and therefore life span.

In the present work, a study of several functions of the three main immune cells, lymphocytes, phagocytes (neutrophils) and NK cells, has been carried out in healthy elderly men and women in comparison with those cells from adult subjects. It is known that the changes in the immune cells with ageing are

especially related with T lymphocyte activity, which is decreased as regards proliferative response to antigens or mitogens, one of the central events implicated in the development of the immune response, and in its IL-2 production. In agreement with previous results from us and other authors [3,4,27] the lymphoproliferative response to the mitogen PHA and the IL-2 production by T lymphocytes were found to be decreased in the present study in both elderly men and women with respect to adults. Other lymphocyte functions such as chemotaxis were also decreased in elderly subjects in agreement with previous results [3,4]. However, as regards functions of the non-specific immune response there is no agreement on the effects of age [43,44]. Thus, some authors have found a diminished activity of certain functions of phagocytes and NK cells, while other studies have established that these and other functions do not decline or are stimulated with age [3,4,16,43]. Although there are contradictory results concerning changes in natural killer (NK) cell activity with ageing, most previous research shows a decrease [3,4,32], similar to the results of the present work. Other functions such as chemotaxis and ingestion of phagocytes were also decreased in elderly subjects as in previous studies [3,4,16]. However, adherence and superoxide anion levels were increased with age. Adherence of lymphocytes or phagocytes is the first event in the immune and inflammatory response and it is a function that precedes the migration (i.e. chemotaxis) of immune cells. Leukocyte adherence increases in an oxidative situation such as ageing or endotoxic shock, because free radicals stimulate the expression of adherence molecules [4,16,27]. With respect to the age-related changes in the levels of superoxide anion there are contradictory data. In peritoneal leukocytes from mice the intracellular levels of superoxide decrease whereas the extracellular levels increase with age [16]. Previous results have shown an increase in the levels of superoxide anion in neutrophils from elderly women (data in the process of being published) in agreement with the results of the present work.

Vitamin E is widely recognized as a major lipid-soluble antioxidant present in the biological membrane, although this vitamin scavenges also ROS in the body aqueous compartments, protecting cells against oxidative stress damage. Experimental studies have provided evidence for a role of vitamin E in protecting the immune function in young animals using supplementation with higher than usual levels of this vitamin [29]. These results are more evident in elderly subjects in which the beneficial effect of dietary vitamin E supplementation has been clearly shown [20,25,28]. Further, the modulating effects of vitamin E found in the present study, bringing the immune values close to those of the adults, occurs after a short period of ingestion (3 months) and with

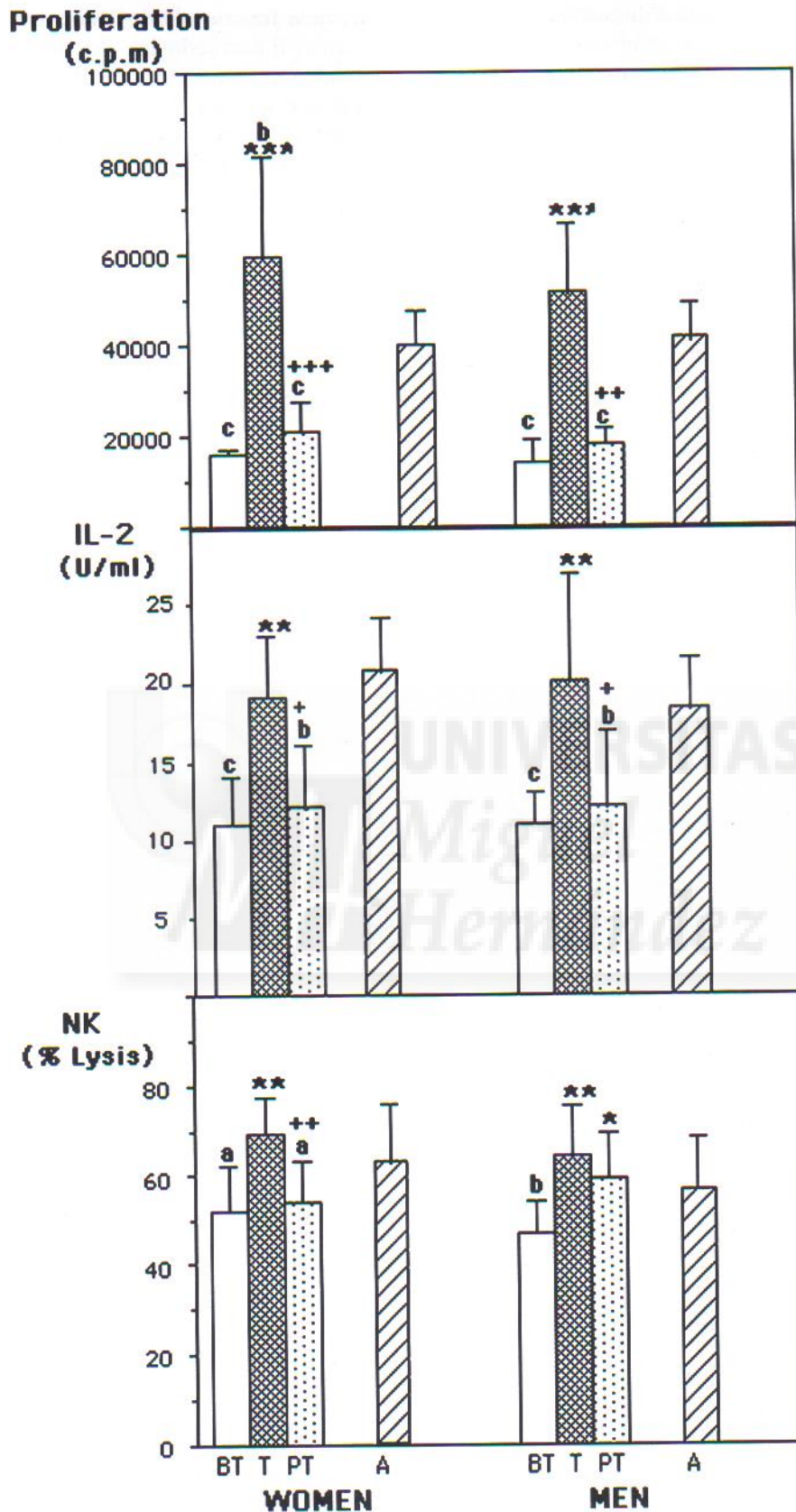


Figure 2. Proliferation, IL-2 production and NK activity of lymphocytes from elderly subjects before (BT), after 3 months of vitamin E supplementation (T) and 6 months after the end of supplementation without vitamin E intake (PT). Each column represents the mean \pm SD of the values corresponding to 18 women or 15 men, each value being the mean of duplicate assays. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ with respect to the corresponding BT values. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.001$ with respect to the corresponding adult (A) values (15 women and 15 men). + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ and +++ $p < 0.001$ with respect to the corresponding T-values.

a dose of 200 mg/day. Some of these effects have been observed previously, especially in relation with lymphocyte proliferation in response to mitogen and IL-2 production [25,28] as well as adherence capacity [27]. However, other effects of vitamin E observed in the present study have been described for the first time, such as the effects on neutrophil functions, NK activity and lymphocyte chemotaxis. In another study, our group has also shown that vitamin C, together with the same amount of vitamin E used in the present study, improves several immune functions (in lymphocytes and neutrophils) in old women bringing their values close to those of adults [4,37]. In the present study only the vitamin E supplementation was able to produce similar results.

The increase with ageing in the adherence capacity was lowered after ingestion of vitamin E, which has been previously observed by us [27]. Similarly, vitamin E ingestion decreased superoxide production bringing its values near those of adults. The ingestion of other antioxidants appears to slow down the increase in superoxide production by phagocytes that usually occurs with age [21], an effect that may be beneficial since it prevents an excessive oxidative stress. Other functions such as chemotaxis and phagocytic capacities, which decrease with ageing, are increased after vitamin E intake. This means that these cells are activated regarding their ability to reach and ingest bacterial and other foreign bodies, i.e. to improve their defense function.

The most widely studied effects of vitamin E supplementation on immune functions analysed in the present study have been on T-cell proliferation to mitogens and the IL-2 production, functions that decrease in elderly humans. This fact seems to reflect a progressively decreasing proportion of functional T-cells rather than a uniform decline in function of all cells, which could be due to the excessive apoptosis of those lymphocytes [45]. Vitamin E increases the T-cell proliferation and IL-2 production of naive T-cells (the subpopulation of lymphocytes that decreased more with ageing) in old mice, with no effect on memory T-cells [20,46]. This effect seems to be mediated by the increase of the percentage of old CD4+ T-cells capable of forming an effective immune synapse [47]. In addition, the presence of multiple intracellular signalling deficiencies as well as changes on the expression of genes associated with signal transduction, transcriptional regulation and apoptosis pathways in T-cells could be the cause of the impaired proliferative response of T-cells with ageing and vitamin E has a significant effect on the expression of these genes associated with the cell cycle and Th1/Th2 balance in old cells [48]. Because there are data supporting the idea that immune function in ageing is similar to that in inflammatory conditions [4] and that antioxidants also have anti-inflammatory effects, they may act in this way on

immune function [49]. Thus, it has been found that vitamin E acts reducing prostaglandin production by phagocytes, which contributes to the age-associated decrease in T-cell proliferation [20,28]. Moreover, vitamin E does not exert an indiscriminate stimulating effect on the immune system against disturbances like those caused by ageing. Instead, this antioxidant shows an immunoregulatory effect, increasing or depressing immune functions depending on the particular function and cell state, as observed previously [27]. Since the changes shown in the immune parameters studied bring the values closer to those of adult subjects, we can hypothesize that the daily intake of 200 mg of vitamin E by aged people can improve their immune response at the level not only of lymphocyte and NK functions, but the neutrophil activities as well. Since those immune function parameters have been suggested to be markers of health and longevity [4], vitamin E supplementation could be useful to improve the quality of life and functional longevity of elderly subjects.

Acknowledgements

This work was supported by FIS and MEC (BFU2005-06777) grants and RETICEF (RD06/0013/0003) (ISCIII) of Spain.

References

- [1] Makinodan T, Kay M. Age influence on the immune system. *Adv Immunol* 1980;29:287-329.
- [2] Pawelec G. Immunity and ageing in man. *Exp Gerontol* 2006;41:1239-1242.
- [3] De la Fuente M. Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:S5-S8.
- [4] De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo MC. The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1356-1366.
- [5] High KP. Infection as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing Res Rev* 2004;3:1-14.
- [6] Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 1990;45:45-98.
- [7] Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002;37:249-256.
- [8] Puerto M, Guayerbas N, Alvarez P, De la Fuente M. Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol* 2005;165:33-40.
- [9] Harman D. Ageing: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;2:298-300.
- [10] Miquel J, Economos AC, Fleming JE, Johnson JE. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980;15:575-591.
- [11] Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Vina J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 2000;32:189-198.

- [12] Brigelius-Flohe R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem* 2006;387:1329–1335.
- [13] Knight JA. The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem* 2000;35:1–62.
- [14] Meydani SN, Wu D, Santos MS, Hayek M. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1462S–1476S.
- [15] Meydani M, Lipman RD, Han SN, Wu D, Beharka A, Martin KR, Bronson R, Cao G, Smith D, Meydani SN. The effect of long-term dietary supplementation with antioxidants. *Ann NY Acad Sci* 1998;854:352–360.
- [16] De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, Alvarado C. Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol* 2004;50:OL683–OL690.
- [17] Coquette A, Vray B, Vanderpas J. Role of vitamin E in the protection of the resident macrophage membrane against oxidative damage. *Arch Int Physiol Biochem* 1986;94:529–534.
- [18] Daynes RA, Enioutina EY, Jones DC. Role of redox imbalance in the molecular mechanisms responsible for immunosenescence. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:537–548.
- [19] Serafini M. Dietary vitamin E and T cell-mediated function in the elderly: effectiveness and mechanism of action. *Int J Dev Neurosci* 2000;18:401–410.
- [20] Meydani SN, Han SN, Wu D. Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications. *Immunol Rev* 2005;205:269–284.
- [21] Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausserés N, Jimenez L, De la Fuente M. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* 2006;22:767–777.
- [22] Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B* 1981;8:211–224.
- [23] Polito A, Intorre F, Andriollo-Sanchez M, Azzini E, Raguzzini A, Meunier N, Ducros V, O'Connor JM, Coudray C, Roussel AM, Maiani G. Estimation of intake and status of vitamin A, vitamin E and folate in older European adults: the ZENITH. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:S42–S47.
- [24] Kowdley KV, Mason JB, Meydani SN, Cornwall S, Grand RJ. Vitamin E deficiency and impaired cellular immunity related to intestinal fat malabsorption. *Gastroenterology* 1992;102:2139–2142.
- [25] Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS, Siber G, Loszewski R, Thompson C, Pedrosa MC, Diamond RD, Strollar BD. Vitamin E supplementation and *in vivo* immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. *JAMA* 1997;277:1380–1386.
- [26] Meydani SN, Leka LS, Fine BC, Dallal GE, Keusch GT, Singh MF, Hamer DH. Vitamin E and respiratory tract infections in elderly nursing home residents. A randomized controlled trial. *JAMA* 2004;292:828–836.
- [27] De la Fuente M, Victor VM. Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 2000;78:49–54.
- [28] Meydani SN, Barklund MP, Liu S, Meydani M, Miller RA, Cannon JG, Morrow FD, Rocklin R, Blumberg JB. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am J Clin Nutr* 1990;52:557–563.
- [29] De la Fuente M, Carazo M, Correa R, Del Rio M. Changes in macrophage and lymphocyte functions in guinea-pigs after different amounts of vitamin E ingestion. *Br J Nutr* 2000;84:25–29.
- [30] Moriguchi S, Kobayashi N, Kishino Y. High dietary intakes of vitamin E and cellular immune functions in rats. *J Nutr* 1990;120:1096–1102.
- [31] Del Rio M, Ruedas G, Medina S, Victor VM, De la Fuente M. Improvement by several antioxidants of macrophage function *in vitro*. *Life Sci* 1998;63:871–881.
- [32] Ferrandez MD, Correa R, Del Rio M, De la Fuente M. Effects *in vitro* of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 1999;34:675–685.
- [33] Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Handa H, Ozaki M, Yukawa S. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor secretion from macrophages by vitamin E. *Biochim Biophys Acta* 1998;1404:427–434.
- [34] Lighthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, Muller-Hermelink HK, Steinmann GG. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev* 1984;28:47–55.
- [35] McGregor R, Spagnoulo P, Lentnek A. Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone and aspirin, measured with a new assay system. *N Engl J Med* 1974;291:642–646.
- [36] De la Fuente, Carrasco M, Hernanz A. Modulation of human neutrophil function *in vitro* by gastrin. *J Endocrinol* 1997;153:475–483.
- [37] De la Fuente M, Ferrandez MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A, Miquel J. Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamin C and E. *Can J Pharmacol* 1998;76:373–380.
- [38] Boyden SV. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1962;115:453–456.
- [39] Carrasco M, Hernanz A, De La Fuente M. Effect of cholecystokinin and gastrin on human peripheral blood lymphocyte functions, implication of cyclic AMP and interleukin 2. *Regul Pept* 1997;70:135–142.
- [40] Medina S, Del Rio M, Hernanz A, De la Fuente M. Age-related changes in the neuropeptide Y effects on murine lymphoproliferation and interleukin-2 production. *Peptides* 2000;21:1403–1409.
- [41] Miquel J, Economos AC. Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol* 1979;14:279–285.
- [42] Weng NP. Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? *Immunity* 2006;24:491–494.
- [43] Ortega E, Garcia JJ, De La Fuente M. Ageing modulates some aspects of the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes. *Exp Physiol* 2000;85:519–525.
- [44] Stout RD, Suttles J. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev* 2005;205:60–71.
- [45] Spaulding C, Guo W, Effros RB. Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol* 1999;34:633–644.
- [46] Adolffson O, Huber BT, Meydani SN. Vitamin E-enhanced IL-2 production in old mice: naïve but not memory T cells show increased cell division cycling and IL-2 producing capacity. *J Immunol* 2001;167:3809–3817.
- [47] Marko MG, Ahmed T, Bunnell SC, Wu D, Chung H, Huber BT, Meydani SN. Age-associated decline in effective immune synapse formation of CD4(+) T cell is reversed by vitamin E supplementation. *J Immunol* 2007;178:1443–1449.
- [48] Han SN, Adolffson O, Lee CK, Prolla TA, Ordovas J, Meydani SN. Age and vitamin E-induced changes in gene expression profiles of T cells. *J Immunol* 2006;177:6052–6061.
- [49] Singh U, Devaraj S, Jialal I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr* 2005;25:151–174.

JNHA - The Journal of Nutrition, Health and Aging

Vitamin C and vitamin C plus E improve the immune function in the elderly

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:							
Full Title:	Vitamin C and vitamin C plus E improve the immune function in the elderly						
Article Type:	Original Paper						
Corresponding Author:	Monica De la Fuente, PhD SPAIN						
Corresponding Author Secondary Information:							
Corresponding Author's Institution:							
Corresponding Author's Secondary Institution:							
First Author:	Monica De la Fuente, PhD						
First Author Secondary Information:							
Order of Authors:	Monica De la Fuente, PhD Francisco Arnalich, MD, PhD Angel Hernanz, PhD						
Order of Authors Secondary Information:							
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>MINECO (BFU2011-30336)</td> <td>Dr Monica De la Fuente</td> </tr> <tr> <td>Universidad Complutense de Madrid (ES) (910379ENEROINN)</td> <td>Dr Monica De la Fuente</td> </tr> <tr> <td>ISCIII-FEDER (RD12/0043/0018)</td> <td>Dr Monica De la Fuente</td> </tr> </table>	MINECO (BFU2011-30336)	Dr Monica De la Fuente	Universidad Complutense de Madrid (ES) (910379ENEROINN)	Dr Monica De la Fuente	ISCIII-FEDER (RD12/0043/0018)	Dr Monica De la Fuente
MINECO (BFU2011-30336)	Dr Monica De la Fuente						
Universidad Complutense de Madrid (ES) (910379ENEROINN)	Dr Monica De la Fuente						
ISCIII-FEDER (RD12/0043/0018)	Dr Monica De la Fuente						
Abstract:	<p>With aging the immune response is impaired. This immunosenescence, in which an alteration of the redox state of the immune cells appears, is involved in the rate of aging. Since leukocyte function is a good health marker and longevity predictor, the effects of daily oral administration of the antioxidant vitamin C (500 mg), or both vitamin C (500 mg) and vitamin E (200 mg) on several blood neutrophil (adherence, chemotaxis, phagocytosis, and superoxide anion levels) and lymphocyte (adherence, chemotaxis, proliferation, interleukin-2 secretion and natural killer activity) functions were studied in healthy elderly men and women. These parameters were analyzed before supplementation, after 3 months of supplementation, and 6 months after the end of supplementation. In addition, adult subjects were used as control age groups. The results showed that vitamin C improved these immune parameters in elderly subjects, bringing their values close to those of adults. These effects were maintained after 6 months without supplementation in several functions. Similar effects were found in the elderly supplemented with both vitamin C and E. Thus, a short period of vitamin C or vitamin C and E ingestion, at the doses used, improves the immune function in elderly individuals and could contribute to a healthy longevity.</p>						
Suggested Reviewers:	<p>EDUARDO ORTEGA orincon@unex.es</p> <p>SIMIN MEYDANI simin.meydani@tufts.edu</p> <p>ASUNCION MARCOS amarcos@ictan.csic.es</p> <p>ISABEL BAEZA isabelbaezamonedero@yahoo.es</p>						

Vitamin C and vitamin C plus E improves immune functions in elderly men and women

Original Contribution

Vitamin C and vitamin C plus E improve the immune function in the elderly

Mónica De la Fuente ¹, Francisco Arnalich ² and Angel Hernanz ³

¹ Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biological Sciences,
Complutense University of Madrid, Spain

²Internal Medicine Department, Hospital La Paz, Madrid, Spain

³Biochemistry Department, Hospital La Paz, Madrid, Spain

Corresponding author: Mónica De la Fuente. Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Universidad Complutense, 28040 Madrid, España. Telephone number: 00 34 91 394 49 89. Fax number: 00 34 91 394 49 35. e-mail address: mondelaf@bio.ucm.es.

Abstract

With aging the immune response is impaired. This immunosenescence, in which an alteration of the redox state of the immune cells appears, is involved in the rate of aging. Since leukocyte function is a good health marker and longevity predictor, the effects of daily oral administration of the antioxidant vitamin C (500 mg), or both vitamin C (500 mg) and vitamin E (200 mg) on several blood neutrophil (adherence, chemotaxis, phagocytosis, and superoxide anion levels) and lymphocyte (adherence, chemotaxis, proliferation, interleukin-2 secretion and natural killer activity) functions were studied in healthy elderly men and women. These parameters were analyzed before supplementation, after 3 months of supplementation, and 6 months after the end of supplementation. In addition, adult subjects were used as control age groups. The results showed that vitamin C improved these immune parameters in elderly subjects, bringing their values close to those of adults. These effects were maintained after 6 months without supplementation in several functions. Similar effects were found in the elderly supplemented with both vitamin C and E. Thus, a short period of vitamin C or vitamin C and E ingestion, at the doses used, improves the immune function in elderly individuals and could contribute to a healthy longevity.

Keywords: Vitamin C. Vitamin E. Aging. Immune function. Men and Women.

Introduction

Aging is a progressive and general impairment of the physiological systems including the immune system. It is presently accepted, that almost every component of the immune system undergoes striking age-associated re-structuring, leading to changes that may include diminished as well as enhanced functions, this fact being denominated immunosenescence (1-3). With age there is a pronounced decrease of adaptive immunity carried out by lymphocytes, the functions of which, especially in the T-cell, are impaired (1,2). With respect to the innate immunity, the natural killer (NK) cells show a decreased cytotoxicity (2,4), and the phagocytes show a decline of several of their activities such as phagocytosis and chemotaxis (2,5-7). All this explains the increase of cancer and the susceptibility and vulnerability to infections among aged subjects, which stand out as the most common causes of illness and death (2,8). However, several functions of immune cells, especially those related with an increase of oxidative and pro-inflammatory conditions, are increased with aging (2,7,9).

In addition, it has been shown that the competence of the immune system is an excellent marker of health (8,10) and several age-related changes in immune functions have been linked to longevity (2,7). Thus, mice with premature immunosenescence have a significant decrease of life span and individuals who live longer in good health, such as centenarians or extremely long-lived animals, show very well preserved immune functions (2,5,7,11-13).

Among all the gerontological theories, the free radical-oxidation theory is the most widely accepted to explain how the aging process occurs (2,14). Thus, aging is the result of damage accumulation (by deleterious oxidation) in biomolecules, which causes the age-related decline of physiological functions, including the immune function (2). However, since reactive oxygen species (ROS) have a pivotal role in the regulation of many cellular processes, an adequate oxidant-antioxidant balance is very important for maintaining cell function, this balance being critical in the immune system (2,15,16). The immune cells are an important source of oxidant compounds, which are used to carry out their defensive function, but high levels of those compounds may damage not only these cells, which are particularly sensitive to damage of their biomolecules caused by oxidative stress, but also the surrounding cells and tissues, increasing the rate of aging of the organism (2). Thus, since oxidant levels must be tightly controlled by the antioxidant defenses in the immune cells, it is not surprising that an

antioxidant deficit has been related to impaired immune responses, leading to frequent and severe infections that result in increased mortality (2, 15,16). An important number of studies show that the ingestion of diets with adequate levels of antioxidants such as vitamins E and C, β -carotene, polyphenols and others, are able to retard or prevent the oxidative damage and therefore the general physiological impairment associated with aging, and in particular immunosenescence, suggesting that these diets are a good way to improve the immune system in elderly subjects (2, 17).

Ascorbic acid (vitamin C) is a hydro-soluble antioxidant present in the extracellular fluid and the cytosolic compartment of the cell, which shows a variety of functions especially in immune homeostasis (18). It is highly concentrated in leukocytes and declines during infections and stress (19), since it is used rapidly in their defensive work (20). Decreased concentrations of this vitamin in the immune cells are associated with a lower functional capacity of these cells (21). In addition, vitamin C has been shown to stimulate, *in vitro* and after supplementation trials, several immune functions, such as T-lymphocyte proliferation, NK activity, phagocytic capacity and cytokine production (2,18,19,22-25). The role of vitamin C in the immune cells is its capacity of contributing to the maintenance of the redox integrity of cells during the inflammatory response. However, vitamin C has not been specifically linked to any single immunological mechanism (26), and being an indirect modulator *in vivo* on the immune cells (27).

Vitamin E is the most important lipid-soluble antioxidant present in the biological membrane and the first line of defense against lipid peroxidation (28). The few studies performed on the effect of deficiency of vitamin E on immune function show that it seems to be linked to impaired cell-mediated immunity (29). Moreover, several *in vitro* and *in vivo* studies in young animals show that vitamin E can improve the function of immune cells (2,22,30,31).

Although the effect of antioxidant supplementation on the immune functions in the elderly is a subject of great interest, and it is accepted that micronutrients such as vitamin E and C provide additional benefits to immunocompromised persons (32), there is little relevant research, especially on healthy men and women. It is known that older people show the highest risk of both poor nutrition (with an insufficient intake of these micronutrients) and increased oxidative stress (2,33-35). This deficiency in micronutrients, which includes vitamins C and E, is due, in part, to physiological changes associated with aging and even to financial and social

status (33,34). In this context, it has been observed that vitamin C is the only antioxidant that in low blood concentrations in old populations is a strong predictor of mortality (35). Previous studies have shown clearly that vitamin E supplementation improves several immune functions in the elderly (36). Moreover, in a study using a daily supplementation of 200 mg of vitamin E for 3 months in elderly men and women, an improvement of several lymphocyte and neutrophil functions has been observed (37), but the effects of vitamin C in this context have not been investigated.

In addition, several studies show the relevance of the intake of supplementation with more than one antioxidant (34, 38). However, the effect of a combination of vitamin C and vitamin E has been scarcely studied. Preliminary research in elderly women with a vitamin C and vitamin E supplementation showed an improvement of several immune functions (39). In addition, in a neurodegenerative illness such as Alzheimer's disease (AD), the combination of vitamins C and E has been associated with a decrease in the prevalence and incidence of AD, that was not evidenced by the use of vitamin C or E supplements alone (40).

In view of the above, we conducted a study to determine the effect of vitamin C supplementation (500mg/day) and vitamin C (500 mg/day) and vitamin E (200 mg/day) during a short period of time (3 months), on several functions of immune cells in elderly healthy men and women, as well as the prevalence of these effects. Moreover, we used in parallel adult men and women to find out if the antioxidant supplementation could improve the immune function to levels similar to those normally present at this age.

Methods

Subjects. A group of 44 elderly (24 women and 20 men) (mean age \pm SD: 74 \pm 4 years old) and 30 adult (15 women and 15 men) (mean age \pm SD: 35 \pm 5 years old) volunteers were used for this study. Sample size was calculated according to standard deviations from the mean of parameters in the groups under study, error of $\alpha=0.05$, power of 80% and risk of retirements of 10%. Although the study began with 90 people, who agreed to participate in the investigation, it was completed by 44 subjects, since many failed to continue taking the supplements or changed drastically their life habits and had to be discarded from the results. All individuals studied in the present work were Spanish and recruited from the population of Madrid. The inclusion criteria were to be in healthy condition, which was defined as absence

of pathology or findings of clinical significance in general laboratory parameters. Exclusion criteria were severe general pathology, immune diseases, cancer, dementia or cognitive alteration, chronic respiratory disease, hypertension, diabetes, life expectancy inferior to one year, poor collaboration level, and intake of vitamins, antioxidants or any drug influencing the immune system. All elderly subjects were selected according to the “SENIEUR” protocol (41). The participating women and men were not hospitalized during the course of the investigation, and they carried out an active life. They resided in their homes and consumed a physician-supervised balanced Mediterranean diet. There was no change in the diet throughout the study for any of the subjects. The adult control group (30 volunteers) was constituted by relatives, friends or colleagues of the research group. The inclusion criterion was to be 35 ± 5 years old in healthy condition. Exclusion criteria were the same as those for the experimental groups.

All participants received information about the purpose of the study and they gave their written consent for their blood samples to be used for scientific research. Informed consent was sought from potential participants before the beginning of any specific procedure relative to the study. Interviews were conducted in a private room of the Department of Internal Medicine of the La Paz Hospital by the Dr Francisco Arnalich. This study was approved by the Ethics Committee of the La Paz Hospital of Madrid and was in agreement with the principles of the Declaration of Helsinki (1989), the World Medical Association and the official current regulations.

Vitamin C, and vitamin C and E supplementations. A group of 22 elderly (12 women and 10 men) received a daily supplement of 500 mg of vitamin C (Bayer) and other group of 22 elderly (12 women and 10 men) received a daily supplement of 500 mg of that vitamin C and 200 mg of dl-alpha-tocopherol (Alcala Farma) for three months. The doses were chosen in base on previous studies (18,19,37,42).

Collection of blood samples. Peripheral blood samples were collected always at the same time, from 9 to 10 a.m., in order to control the effect of circadian variations in immune parameters, and during the course of each Clinical Interview, in tubes with EDTA (BD Vacutainer Systems, Spain). Blood samples of subjects from the experimental groups were taken before (BS), after 3 months of supplementation (S) and 6 months after the end of supplementation, without intake of vitamin C or vitamin C and E (post-supplementation, PS).

Samples from adult controls were drawn once only, spread along the whole study. At each time point 5 men and 5 women, all healthy adults, were studied and 15 men and 15 women were used as controls. The experiments were carried out without knowing if the samples were coming from the control or supplemented population.

Clinical interviews. A total of 3 interviews were performed to the subjects belonging to the experimental groups. The first interview was done on day 1 for the final selection of participants, whereas the following were carried out to check the correct development of the study. The second visit was done 3 months after the beginning of antioxidant intake (the last day of the treatment), the third was carried out 6 months after the end of the treatment. Blood samples were drawn during each clinical interview.

Separation of blood neutrophils and lymphocytes. Peripheral blood neutrophils and lymphocytes were obtained following a method previously described (43), by gradient sedimentation using 1.119 density Hystopaque (Sigma) for neutrophil separation and 1.077 density Hystopaque for lymphocytes. The cells were harvested, washed twice in Hank's medium for neutrophils or RPMI medium (Gibco, Burlington, Ontario, Canada) for mononuclear cells (principally lymphocytes), counted and adjusted to 5×10^5 neutrophils/ml medium and 1×10^6 lymphocytes/ml medium. Cell viability was checked by the trypan blue (Sigma) exclusion test before and after each assay, and it was equal or higher than 99% in all cases.

Assays of neutrophil functions. All the assays were carried out following methods previously described (37). The adherence capacity of neutrophils was measured following a method, which mimics *in vitro* (using nylon fiber columns) the adherence of neutrophils *in vivo* to the vascular endothelium, and the results were expressed as adherence index (A.I). The chemotaxis was evaluated measuring the mobility capacity of neutrophils towards an infectious focus, using chambers with 2 compartments separated by a polycarbonate filter (3 μ m pore diameter, Millipore Iberica, Madrid, Spain), and the results were expressed as chemotactic index (C.I). The phagocytosis of inert particles (latex beads) was carried out using migration inhibition factor (MIF) plates (Karter, Noviglio, Italy), and the number of particles ingested by 100 neutrophils was expressed as phagocytosis index (P.I). Superoxide anion levels were evaluated by their capacity to reduce nitroblue tetrazolium (NBT), and the results were expressed as Absorbances.

Assays of lymphocyte function. Lymphocyte adherence and chemotaxis methods were similar to the above described in neutrophils (37).

The lymphoproliferation assay was performed by a standard method, previously used by us (37). Lymphocyte suspensions were dispensed in plates of 96 wells (Costar, Cambridge, MA, USA) and phytohemagglutinin (PHA, Flor Laboratorios) at 25 µg/ml was added as mitogen in stimulated wells, and PBS in basal wells. After 48 h of incubation 2.5 µCi ³H-thymidine (ICN) were added to each well, followed by another incubation of 24 h. Cells were harvested in a semiautomatic harvester and thymidine uptake was measured in a beta counter (LKB, Upsala, Sweden) for 1 min. The results were expressed as counts per minute (cpm), both in basal and PHA stimulated cells.

The concentration of interleukin-2 (IL-2) released by lymphocytes was determined on supernatants of the above cultures of 48 h, following a method previously described by us (37). IL-2 was measured using an ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Assay of the natural killer (NK) activity. The natural killer (NK) activity was evaluated following an enzymatic colorimetric assay (Cytotox 96 TM Promega, Boeringher Ingelheim, Germany) based on the determination of lactate dehydrogenase (LDH) released by the cytolysis of tumor cells (target cells: human tumor K562 cells), using tetrazolium salts (37). The results were expressed as the percentage of target cells killed (% lysis).

Statistical study. The results are expressed as the mean ± standard deviation (SD) of the values corresponding to subjects, being each value the mean of duplicate assays (two samples from the same blood). The data were evaluated statistically by the one-way analysis of variance (ANOVA) for paired observations, used to evaluate vitamins supplementation in the aged groups, followed by the Scheffe's F post hoc procedure. The differences due to the treatment, in each experimental group, were evaluated by the Student's t test for related samples. The two-way ANOVA test for unpaired observations was used for age and gender groups, followed by the Scheffe's F test. Normality of the samples was confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test, while the homogeneity of variances was studied by the Levene test, being $P < 0.05$ the minimum level of significance. The Sidak test with a level of significance set at $P < 0.05$ was used for post hoc comparisons.

Results

The results of the neutrophil activities carried out in the phagocytic process (adherence to endothelium, the mobility directed to the infectious focus by a chemoattractant gradient (chemotaxis), ingestion of foreign agents, and their destruction with the help of oxygen free radicals, starting with superoxide anion) are shown in Figs 1 and 2. Regarding adherence capacity of PMN neutrophils, the aged groups before supplementation (BS) showed higher values of adherence indexes (AI) than adult controls (AC), statistical differences being higher in the men groups than in women groups. After vitamin supplementation (S), the values of AI were significantly decreased with respect to the corresponding BS values in all the women and men groups, showing similar values to those of cells from the adults. After 6 months without vitamin ingestion (PS) the values of AI are similar to those in BS in women, but they remained lower than those of BS in men. Comparing the effects of vitamin C versus vitamin C plus E, the AI was higher in neutrophils of men after supplementation (S) and after 6 months without vitamin ingestion (PS) with both vitamins than only with vitamin C.

The chemotaxis indexes (CI) of neutrophils of elderly women and men, before supplementation (BS), were lower than those of the adults in all the groups. After supplementation (S), these indexes showed significantly higher values than those found in BS, and similar to the corresponding values in adults, with the exception of the group of vitamin C in men, in which the values were still lower than in the corresponding AC. In the PS groups the CI brought the values near those of the BS.

The phagocytosis indexes (PI), lower in neutrophils from elderly women and men than in those from the corresponding adults, increased after supplementation with vitamins in all the groups, the values being similar to those in adults in all the groups or even higher as it occurs in the vitamin C group of women. In the PS groups the values decreased in women with respect to those after supplementation (S), being close to the values of the BS. However, in men the values of PS were similar to those in S.

The results corresponding to the levels of superoxide anion in non-stimulated and stimulated neutrophils are shown in Fig. 2. The values in the aged BS groups were significantly higher in all the groups with respect to those in the corresponding adults. After supplementation (S) there were significant decreases in all groups. Thus, the values were similar to those in adults or even lower than in adults (it is the case in women in both groups

of supplementation in non stimulated neutrophils and in the vitamin C+E group in stimulated cells, and in men in the group of vitamin C+E both in non-stimulated and stimulated neutrophils). In the PS groups the values were increased with respect to those after supplementation (S), but decreased with respect to those in BS, the values being similar to those in adults. Comparing the effects of vitamin C versus vitamin C plus E, the superoxide anion levels were lower after supplementation (S) with both vitamins than with vitamin C, in neutrophils of men, both stimulated and non-stimulated, and in stimulated neutrophils of women.

With respect to the lymphocyte functions studied, the results of adherence (A.I.) and chemotaxis (C.I.) are shown in Fig. 3. The values of A.I. of lymphocytes from elderly subjects before supplementation (BS) were higher than those from adults. After vitamin supplementation (S), the values of A.I. were decreased with respect to the corresponding BS values in women and men, showing similar values to those in cells from adults or even lower values as is the case of the group of vitamin C in men. In PS the values of A.I. were similar to those found before supplementation (BS) (in vitamin C+E group of women and in vitamin C group of men) or they maintained values lower than BS (in vitamin C group in women and in vitamin C+E group in men). Comparing the effects of vitamin C versus vitamin C+E, the AI was higher in neutrophils of men after supplementation (S) with both vitamins than only with vitamin C. The chemotaxis of lymphocytes was lower in elderly men and women than in the adults. With vitamin supplementation (S) this function increased in cells from women and men, the values being similar to those in adult controls. After 6 months without supplementation (PS) the values of CI decreased with respect to the values in S in all the groups, although preserving values higher than those before supplementation in the group of vitamin C in men.

The lymphoproliferative capacity in response to PHA, the IL-2 release and the NK activity are shown in Fig. 4. These parameters were lower in cells from elderly men and women than in adults. After the supplementation with vitamins (S) all these functions were stimulated, showing values similar to those in adults. After 6 months without supplementation of vitamins (PS) the values decreased, being similar to those found BS in all the groups and functions with the exception of lymphoproliferation of the group of vitamin C in women and men, and in the case of IL-2 release in the vitamin C group in men. In those cases the values

were higher than in BS. Comparing the effects of vitamin C versus vitamin C plus E, the proliferation was higher after supplementation (S) and after 6 months without supplementation (PS) with vitamin C than with both vitamins, in lymphocytes of women.

Discussion

This work describes for the first time that a short period (3 months) of supplementation with vitamin C (500 mg/day) in elderly men and women improves several relevant functions of the immune cells in human peripheral blood, which are those that suffer an impairment with age (2,5-7). In addition, this is the first research on the effects for the same short period of supplementation with vitamin C and E not only in elderly women, in which we had studied several immune parameters (44) and with a higher dose of vitamin C and period of supplementation than this used here (39), but in men, and with adult control groups. With vitamin C plus E similar results, in general, to those with only vitamin C have been obtained, although in functions such as the adherence and proliferation of lymphocytes, a more positive effect of the vitamin C supplementation alone was found. In the present work we have also investigated if after a period of 6 months without these supplementations the effects are maintained, which occurs in several functions. This is more frequently with vitamin C than with vitamin C plus E. Since in all the cases the values of the immune functions after intake of the vitamins were closer to those of adults, these antioxidants seem to be modulators of immune functions and not merely stimulators of them, as has been observed with these and other antioxidants (37,45).

The changes of the functions studied in elderly subjects with respect to those in adults confirm the immune senescence state of the healthy elderly men and women investigated before the intake of antioxidants. Thus, T cells, which are considered to be the most susceptible to immunosenescence (1,2), showed a clear decrease in the proliferation response to the mitogen PHA, one of the central events implicated in the development of the immune response, as well as in its IL-2 production in both elderly men and women, in agreement with previous results (1,2,5,37,43). As regards functions of the non-specific immune response carried out by phagocytes and NK cells, most previous research shows a decrease in NK cytotoxicity (2,4,23,37,43), and in other functions such as chemotaxis and ingestion of phagocytes (2,5,6,37,43). The chemotaxis of lymphocytes was also found to be impaired in

elderly subjects in agreement with previous results (2,37,43). However, adherence capacity, of both lymphocytes and phagocytes, increases with aging as several studies have shown (2,37). With respect to the age-related changes in the levels of superoxide anion, although there are contradictory data, previous results have also shown an increase of this anion in neutrophils from elderly men and women (37,43). Since the age-related changes in blood leukocytes from humans are similar to those in peritoneal leukocytes from mice (2,5,37,43), and using prematurely aging mice and extremely long-lived subjects, we have shown that those functions are biomarkers of the rate of aging, ie.: the biological age, and predictors of longevity (2,7), the men and women studied show the typical immunosenescence of their chronological age.

Since immunosenescence may be a consequence of oxidative stress (2), diet supplementation with antioxidants has been investigated as a way to prevent or even reverse that age-related immune dysfunction, thus increasing health and therefore life span (46). This has been confirmed in previous experiments with mice, in which the old animals that ingested diet supplemented with appropriated amount of antioxidants showed an improvement of immune cell functions, a better redox state and increased longevity (2,46). Although there is experimental evidence showing that antioxidants such as vitamin C and E may prevent or delay the oxidative stress and the physiological impairment associated with physiological and pathological aging, there are also controversial results, especially epidemiological evidence, on the effect of antioxidant vitamin supplementations increasing well-being and prolonging life span, being the doses of antioxidants one of the most relevant causes (46-48). Thus, a hormetic role of dietary antioxidants, with a U-shaped dose responses in the redox situation of the organism has been proposed (17). In fact, even in the case of vitamin C, although the results of several studies have recommended the use of high doses of this antioxidant to cure and prevent the common cold infections and to prevent the onset of cancer (49), and doses of 2.000 or 5.000 mg/day are well tolerated (50), safe and without negative or suppressive effects on immune cell function, the possible pro-oxidant role of high levels of ascorbic acid in certain circumstances (51), advices to be cautious with the amount of this antioxidant in the supplementation trials. However, 1000 mg/day intake of vitamin C supplementation, accompanied by a diet rich in fruit and vegetables has been recommended for an optimal health (52). Since intakes of up to 1.000 mg/day of vitamin C show a favorable effect on

immune response (19), and it has been indicated that at least an intake of 200 mg/day is needed for increasing immune functions (18), a dose of 500 mg/day of vitamin C was chosen in the present study. Moreover, it has been shown that higher doses did not increase the leukocyte incorporation of the vitamin (53). In the case of vitamin E, with which also offers controversial results (positive or without effect depending on the doses), the previously used dose of this vitamin with a good effect on the immune functions studied in the present work (37), was chosen.

With respect to the adherence capacity of leukocytes and the superoxide levels of neutrophils, the increases with aging in these functions were lowered bringing their values near those of adults after vitamin C intake. Adherence of lymphocytes or phagocytes is the first event in the immune and inflammatory response and it is a function that precedes the migration (i.e. chemotaxis) of immune cells. Leukocyte adherence increases in oxidative situations such as chronological aging, premature aging or endotoxic shock, because free radicals stimulate the expression of adherence molecules (2,45). Although there are some data in which these vitamins increase leukocyte adherence (22, 39), in agreement with the present results, a decrease of the adhesion of monocytes to endothelial cells (54) as well as the expression of adhesion molecules on these cells (55) has been observed with vitamin C supplementation. Moreover, a decrease of adherence in neutrophils and lymphocytes from elderly men and women has been found with vitamin E supplementation (37). Vitamin C and vitamin C plus E ingestion also decreased the intracellular superoxide levels of neutrophils. The ingestion of antioxidants such as vitamin E and N-acetylcysteine appears to slow down the age-related increase in superoxide production by neutrophils (37,43). An oral vitamin C therapy in chronic heart failure patients, with high levels of oxidative stress, decreased neutrophil superoxide anion generating capacity and concomitant oxidative stress (56). In this respect, although ROS production is an important mechanism of microorganism destruction by phagocytes, there is evidence of a positive correlation between low levels of superoxide anion and bactericidal activity (57), whereas the increased levels found by us in neutrophils from elderly men and women before antioxidant intake could be harmful for immune cells and the surrounding cells and tissues (2). Moreover, Wolach et al. (58) showed that excessive superoxide generation had no parallel effect on bactericidal capacity. Besides, the decrease in the oxidative status of elderly women after vitamin C and E supplementation is in agreement

with previous results showing a decrease of lipid peroxidation in serum, determined by the malondialdehyde (MDA) levels, in elderly women after supplementation with these antioxidants (39).

Other functions such as the chemotaxis of neutrophils and lymphocytes as well as the phagocytic capacity of neutrophils, which decrease with aging, are increased after vitamin C and vitamin C+E intake, improving their defense function. Vitamin C supplementation (2.000 mg/day) for 2 weeks restored the chemotaxis of monocytes from smokers, which was decreased with respect the non-smoker controls (25). With respect to the phagocytic function, in peritoneal macrophages of mice and guinea pigs ascorbic acid was used in the phagocytosis process and thus there was a decrease in its levels during the ingestion of foreign particles (20). In vitro, ascorbic acid increased the number of latex particles internalized by macrophages from adult mice (22) and vitamin C modulates phagocytosis activity in immune cells (59). These results could explain the increase of phagocytosis capacity after the vitamin C supplementation. In a previous study vitamin E intake also increased chemotaxis of neutrophils and lymphocytes as well as the phagocytosis of neutrophils in elderly men and women (37).

With respect to T-lymphocyte proliferation in response to mitogens and the release of IL-2 cytokine, two functions that clearly decrease with aging, the supplementation with vitamin E have shown a positive effect (37,60). Vitamin C has been seldom studied on these functions and contradictory results have been obtained, even no significant effect on proliferation (59,61), and showed a dose-dependent inhibition of IL-2 producing lymphocytes upon PMA/ionomycin stimulation (24). However, in the present work an increased proliferation of lymphocytes in response to PHA and of IL-2 release have been observed in elderly men and women after vitamin C supplementation, and the same occurs with the vitamin C and E intake. Since one important cause of the age-related impairment of lymphocyte response to mitogens is a progressively decreasing proportion of functional T cells, which could be due to the excessive apoptosis, it has been suggested that one potential mechanism underlying the enhanced immune response by vitamin C may be the inhibition of leukocyte apoptosis signaling pathways that cause this antioxidant (62).

With respect to the NK cytotoxicity against tumors, the stimulation found in the present study is in agreement with previous work using the same dose of vitamin C (500mg/day) (53). Vitamin E also improves NK activity in elderly men and women (37).

Because there are data supporting the idea that immune function in aging is similar to that in inflammatory conditions (2) and that antioxidants also have anti-inflammatory effects, they may act in this way on immune function (24,63). Thus, vitamin C could act as anti-inflammatory inhibiting the initial expression of pro-inflammatory cytokines and also their autocrine stimulation pathway via NFkB (24,64). The anti-inflammatory effect of vitamin E, which acts decreasing the production of prostaglandins by phagocytes (60), is also mediated via decrease of a high activation of NFkB (36). The levels of NFkB expression in peritoneal leukocytes of mice are related with the oxidative stress of these cells, with their function and with the span of life of the subjects (5). Therefore, the beneficial results obtained with vitamin C and vitamin C plus E supplementations could be due to their antioxidant and anti-inflammatory role. Thus, since an oxidative and inflammatory stress is in the base of the immunosenescence, which is involved in the rate of aging (2), the ingestion of adequate amounts of antioxidants such as vitamin C and vitamin E could regulate the immune cell functions and therefore oxi-inflamm-aging of the subjects. Although some research questions the positive role of the ingestion of antioxidant vitamins, especially in high doses, in the organism as consequence of a possible decrease that they cause on the endogen antioxidant defenses (48), other studies show the positive role of supplementation with moderate levels of antioxidant vitamins (2,34,37,38,43). Thus, vitamin C (1000mg/day) and E (400IU/day) ingestion prevented the induction by exercise of several endogen antioxidant defenses (65), whereas in other study vitamin C (152 mg/day) and E (50 mg/day) decreased the exercise-induced oxidative damage, without blocking the cellular adaptation (66). Moreover, vitamin C supplementation (4 times a day in a 500mg dose) suppressed lipid peroxidation process during exercise (67). If some work suggests that the improvement of immune parameters in a population with a generally good immune and nutritional status is limited (68), the results of the present study confirm, at least in elderly populations, the positive effects on the immune system of the supplementation used and thus, its possible role in the decrease of duration and severity of infections as was previously suggested (26). Moreover, these vitamin supplementations seem useful to rejuvenate the immune system, since bring the values of

immune parameters studied closer to those of adult subjects. In prematurely aging mice the ingestion of a diet enriched with nutritional doses of antioxidants such as vitamin C, vitamin E, zinc, selenium and β -carotenes improved the peritoneal leukocyte functions, restored their redox balance (38) and increased the life span of the animals (data sent to be published). Thus, since the age-related changes of immune functions such as those studied in the present work, are similar in peritoneal leukocytes of mice and in peripheral blood leukocytes of humans, and since these immune parameters are markers of health, biological age and longevity (2), it is possible to suggest that the supplementation used in the present study could improve the quality of life and increase a healthy longevity in elderly men and women.

If the effects obtained are consequence of the antioxidant properties of vitamin C and E or if they act as physiological-redox-signaling modulators is an interesting subject of future research.

Conflict of Interests: The authors declare no financial or other conflict of interests regarding the publication of this paper.

Statement of author's contributions to manuscript: All the authors (Mónica De la Fuente, Francisco Arnalich and Angel Hernanz) were responsible for design, writing, statistical analysis and final content of this manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments: The authors thank Ms. Sanchez for her invaluable help in performing several of the experiments.

Sources of Financial Support: This work was supported by MINECO (BFU2011-30336), and UCM Research Group (910379ENEROINN) grants and “Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad” (RETICEF) (RD12/0043/0018) from the ISCIII-FEDER of the European Union.

Abbreviations: AI, Adherence Index; CI, Chemotaxis Index; IL, Interleukin; LDH, Lactate Dehydrogenase; LPS, Lipopolysaccharide; MDA, Malondialdehyde; NBT, Nitroblue Tetrazolium; NF- κ B, Nuclear Factor κ B; NK, Natural Killer; PI, Phagocytic Index; PHA, Phytohemagglutinin; PBS, Phosphate-Buffered Saline; ROS, Reactive Oxygen Species; SD, Standard Deviation.

References

1. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fülöp T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R (2002) T cells and aging. *Front Biosci* 7: d1056-d1183.
2. 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: 3003-26.
3. Desai A, Grolleau-Julius A, Yung R (2010) Leukocyte function in the aging immune system. *J Leuk Biol* 87: 1001-1009.
4. Le Garff-Tavernier M, Béziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, Debré P, Merle-Beral H, Vieillard V (2010) Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* 9: 527-35.
5. Arranz L, Caamaño J, Lord JM, De la Fuente M. (2010). Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: Possible role of nuclear factor-kappa B. *J Gerontol A Biol. Sci.* 65A:941-950.
6. Wessels I, Jansen J, Rink L, Uciechowski P (2010) Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils. *Scientific Word J.* 10: 145-160.
7. Alonso-Fernandez P, De la Fuente M (2011) Role of the immune system in aging and longevity. *Curr Aging Sci.* 4 (2):78-100.
8. High KP (2004) Infection as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing Res Rev* 3: 1-14.
9. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM (2010) Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 22: 507-13.
10. Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS (1990) Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol.* 45: 45-48.
11. Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A (1995) The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today.* 16: 12-16.
12. Alonso-Fernandez P, Puerto M, Maté I, Ribera JM, De la Fuente M (2008) Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of adults *J Am Geriatr Soc* 56: 2244-51.
13. Pinti M, Nasi M, Lugli E, Gibellini L, Bertocelli L, Roat E, De Biasi S, Mussini C, Cossarizza A. (2010) T cell homeostasis in centenarians: from the thymus to the periphery. *Curr Pharm Des* 16: 597-603.
14. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.
15. Oliveira BF, Nogueira-Machado JA, Chaves MM (2010) The role of oxidative stress in the aging process. *Sci World J* 10: 1121-1128.
16. Paiva CN, Bozza MT (2014) Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens?. *Antiox Redox Signal* 20(6):1000-37.
17. Calabrese V, Cornelius C, Trovato A, Cavallaro M, Mancuso C, Di Rienzo L, Condorelli D, De Lorenzo A, Calabrese EJ (2010) The hormetic role of dietary antioxidants in free radical-related diseases. *Curr Pharm Des* 16(7):877-83.
18. Weber P, Bendich A, Schalch W (1996) Vitamin C and human health-are view of recent data relevant to human requirements. *Int J Vit Nutr Res* 66: 19-30.
19. Wintergerst ES, Maggini S, Horning DH (2006) Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *An Nutr Metabol* 50: 85-94.
20. 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 Appl Immunol* 1990; 91(2): 166-170.

21. Schwages J, Schulze J (1998) Modulation of interleukin production by ascorbic acid. *Vet Immunol Immunopathol.* 64: 45-67.
22. Del Rio M, Ruedas G, Medina S, Victor VM, De la Fuente M (1998) Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Sci* 63:871-81.
23. Ferrandez MD, Correa R, Del Rio M, De la Fuente M (1999) Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 34:675-85.
24. Härtel C, Strunk T, Bucszy P, Schultz C (2004) Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes. *Cytokine* 7: 101-106.
25. Stadler N, Eggermann J, Vöo N, Kranz A, Waltenberger J (2007) Smokin-induced monocyte dysfunction is reversed by vitamin C supplementation in vivo. *Arter Thromb Vas Biol.* 27:120-127.
26. Hemilä H (2003) Vitamin C, respiratory infections and the immune system. *TRENDS Immunol* 24(11): 579-580.
27. Maeng HG, Lim H, Jeong YJ, Woo A, Kang JS, Lee WJ, Hwang YI (2009) Vitamin C enters mouse T cells as dehydroascorbic acid in vitro does not recapitulate in vivo vitamin C effects. *Immunobiol* 214: 311-320.
28. Sies H, Murphy ME (1981) Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage, *J Photochem Photobiol B* 8: 211-224.
29. Kowdley KV, Mason JB, Meydani SN, Cornwall S, Grand RJ (1992) Vitamin E deficiency and impaired cellular immunity related to intestinal fat malabsorption. *Gastroenterol* 102: 2139-2142.
30. Hernandez J, Soto-Canevett E, Pinelli-Saavedra A, Resendiz M, Moya-Camarena SY, Klasing KC (2009) In vitro effect of vitamin E on lectin-stimulated porcine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 131: 9-16.
31. De la Fuente M, Carazo M, Correa R, Del Rio M (2000) Changes in macrophage and lymphocyte functions in guinea-pigs after different amounts of vitamin E ingestion. *British J Nutr* 84:25-29.
32. Field CJ, Johnson IR, Schley PD (2002) Nutrients and their role in host resistance to infection. *J Leuk Biol* 71:16-32.
33. Chernoff R (2005) Micronutrient requirement in older women. *Am J Clin Nutr* 81: 1240S-1245S.
34. Chandra RK (2004) Impact of nutritional status and nutrient supplements on immune responses and incidence of infection in older individuals. *Ageing Res Rev* 3(1): 91-104.
35. Fletcher AE, Breeze E, Shetty PS. (2003). Antioxidant vitamins and mortality in older persons: findings from the nutrition add-on study to the Medical research Council Trial of assessment and management of older people in the community. *Am J Clin Nutr.* 78: 999-1010.
36. Wu D, Meydani SN (2008) Age-associated changes in immune and inflammatory responses: impact of vitamin E intervention. *J Leuk Biol* 84(4):900-14.
37. De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F (2008) Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Rad Res* 42:272-280.
38. Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausserés N, Jimenez L, De la Fuente M (2006) Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* 22: 767-777.
39. De la Fuente M, Ferrandez MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A, Miquel J (1998) Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamin C and E. *Canad J Pharmacol* 76: 373-380.
40. Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, Stone SV, Gustafson D, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC; Cache County Study Group (2004) Reduced risk of Alzheimer Disease in user of antioxidant vitamin supplements. *Arch Neurol* 61: 82-88.
41. Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, Müller-Hermelink HK, Steinmann GG (1984) Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev* 28: 47-55.

42. Meydani SN, Leka LS, Fine BC, Dallal GE, Keusch GT, Singh MF, Hamer DH (2004) Vitamin E and respiratory tract infections in elderly nursing home residents. A randomized controlled trial. *JAMA* 292: 828-836.
43. Arranz L, Fernandez C, Rodriguez A, Ribera JM, De la Fuente M (2008) The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Rad Biol Med* 45: 1252-1262.
44. De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo C (2005) The immune system in the oxidative stress conditions of aging and hipertensión: favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antiox Redox Sig* 7(9&10): 1356-1366.
45. De la Fuente M, Victor VM (2000) Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol*. 78(1): 49-54.
46. Sadowska-Bartosz I, Bartosz G (2014) Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *Biomed Res Int* 2014:1-17.
47. Brambilla D, Mancuso C, Scuderi MR, Bosco P, Cantarella G, Lempereur L, Di Benedetto G, Pezzino S, Bernardini R (2008) The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. *Nutr J* 7: 29-38.
48. Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borras C (2007) Fostering antioxidant defences: up-regulation of antioxidant genes or antioxidant supplementation?. *British J Nutr* 98: S36-S40.
49. Verrax J, Calderon PB (2009) Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. *Free Rad Biol Med* 47: 32-40.
50. Jacob RA, Sotoudeh G (2002) Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutr Clin Care* 5: 66-74.
51. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C (2001) Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Rad Biol Med* 31:745-753.
52. Deruelle F, Baron B (2008) Vitamin C: is supplementation necessary for optimal health? J *Altern Compl Med* 14:1291-1298.
53. Vodjani A, Bazargan M, Vodjani E, Wright J (2000) New evidence for antioxidant properties of vitamin C. *Cancer Detec Preven* 24: 508-523.
54. Woollard KJ, Loryman CJ, Meredith E, Bevan R, Shaw JA, Lunec J, Griffiths HR (2002) Effects of oral vitamin C on monocyte: endothelial cell adhesion in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 1161-1168.
55. Rayment SJ, Shaw J, Woollard KJ, Lunec J, Griffiths HR (2003) Vitamin C supplementation in normal subjects reduces constitutive ICAM-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 339-345.
56. Ellis GR, Anderson RA, Lang D, Blackman DJ, Morris RH, Morris-Thurgood J, McDowell IF, Jackson SK, Lewis MJ, Frenneaux MP (2000) Neutrophil superoxide anion-generating capacity, endothelial function and oxidative stress in chronic heart failure: effects of short- and long-term vitamin C therapy. *J Am Coll Cardiol* 36(5):1474-82.
57. Boxer LA (1995) Neutrophil disorders: qualitative abnormalities of the neutrophil. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA (eds). *Hematology Fifth*, McGraw-Hill. New York.
58. Wolach B, Gavrieli R, Pomeranz A (2000) Effect of granulocyte and granulocyte macrophage colony stimulating factors (G-CSF and GM-CSF) on neonatal neutrophil functions. *Pediatric Res* 48: 369-373.
59. Ströle A, Wolters M, Hahn A (2011) Micronutrients at the interface between inflammation and infection-ascorbic acid and calciferol: part 1, general overview with a focus on ascorbic acid. *Inflamm Allergy Drug Target*. 10: 54-63.
60. Meydani SN, Han SN, Wu D (2005) Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications. *Immunol Rev* 205: 269-284

61. Douzief N, Seres I, Larbi A, Szikszay E, Roy PM, Arcand M, Dupuis G, Fulop T Jr (2002) Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging. *Exp Gerontol* 37: 369-387.
62. Perez-Cruz I, Carcamo JM, Golde DW (2003) Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. *Blood* 102:336-343.
63. Singh U, Devaraj S, Jialal I (2005) Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Ann Rev Nutr* 25: 151-174.
64. Carcamo JM, Pedraza A, Borquez-Ojeda O, Golde DW (2002) Vitamin C suppresses TNF α -induced NF κ B activation by inhibiting I κ B α phosphorylation. *Biochemistry* 41: 12995-13002.
65. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehnopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M (2009) Antioxidants prevent health-promoting effect of physical exercise in humans. *PNAS* 106:8665-8670.
66. Sureda A, Tauler P, Aguiló A, Cases N, Llompart I, Tur JA, Pons A (2008) Influence of an antioxidant vitamin-enriched drink on pre-and post-exercise lymphocyte antioxidant system. *Ann Nutr Metab* 52: 233-240.
67. Popovic LM, Mitic NR, Miric D, Bisevac B, Miric M, Popovic B (2015) Influence of vitamin C supplementation on oxidative stress and neutrophil inflammatory response in acute and regular exercise. *Oxid Med Cell Longev* 2015: 295497. doi: 10.1155/2015/295497.
68. Wolvers DA, van Herpen-Broekmans WM, Logman MH, van der Wielen RP, Albers R (2006) Effect of a mixture of micronutrients, but not of bovine colostrums concentrate, on immune function parameters in healthy volunteers: a randomized placebo-controlled study. *Nutr J* 5: 28-39.



Figures

Fig. 1. Neutrophil adherence (adherence index (AI): percentage of neutrophil adherence to nylon fiber) (A), chemotaxis (chemotaxis index (CI): number of neutrophils on filter) (B) and phagocytosis (phagocytic index (PI): number of latex beads/100 neutrophils) (C) capacities of cells from adult controls (AC) and elderly subjects before (BS), after 3 months of vitamin C or vitamin C plus vitamin E supplementations (S) and 6 months after the end of supplementations without vitamin intake (PS). Each column represents the mean \pm standard deviation of the values corresponding to elderly (12 women or 10 men), and adult (15 women and 15 men) subjects and each value being the mean of duplicate assays. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ with respect to the corresponding BS or S values. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ and ^c $P < 0.001$ with respect to the corresponding AC values.

Fig. 2. Superoxide anion levels in non-stimulated and stimulated samples (Absorbances) of human peripheral neutrophils from adult (controls) (AC) and elderly women and men before (BS), after 3 months of vitamin C or vitamin C plus vitamin E supplementations (S) and 6 months after the end of supplementations without vitamin intake (PS). Each column represents the mean \pm standard deviation of the values corresponding to elderly (12 women or 10 men) and adult (15 women and 15 men) subjects and each value being the mean of duplicate assays. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ with respect to the corresponding BS or S values. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ and ^c $P < 0.001$ with respect to the corresponding AC values.

Fig. 3. Lymphocyte adherence (adherence index (AI): percentage of lymphocyte adherence to nylon fiber) (A) and chemotaxis (chemotaxis index (CI): number of lymphocytes on filter) (B) capacities of cells from adult controls (AC) and elderly subjects before (BS), after 3 months of vitamin C or vitamin C plus vitamin E supplementations (S) and 6 months after the end of supplementations without vitamin intake (PS). Each column represents the mean \pm standard deviation of the values corresponding to elderly (12 women or 10 men), and adult (15 women and 15

2
3
4 men) subjects and each value being the mean of duplicate assays. * $P < 0.05$,
5 ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ with respect to the corresponding BS or S values.
6
7
8 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ and $^cP < 0.001$ with respect to the corresponding AC values.
9

10
11 Fig. 4. Proliferation in response to PHA (counts per minute: cpm) (A), IL-2 levels
12 (U/ml) in supernatants of PHA-stimulated cultures of lymphocytes (B) and NK
13 activity (lysis % of human tumoral cells) (C) of human peripheral lymphocytes from
14 adult controls (AC) and elderly subjects before (BS), after 3 months of vitamin C or
15 vitamin C plus vitamin E supplementations (S) and 6 months after the end of
16 supplementations without vitamin intake (PS). Each column represents the mean \pm
17 standard deviation of the values corresponding to elderly (12 women or 10 men),
18 and adult (15 women and 15 men) subjects and each value being the mean of
19 duplicate assays. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ with respect to the
20 corresponding BS or S values. $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ and $^cP < 0.001$ with respect to the
21 corresponding AC values.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

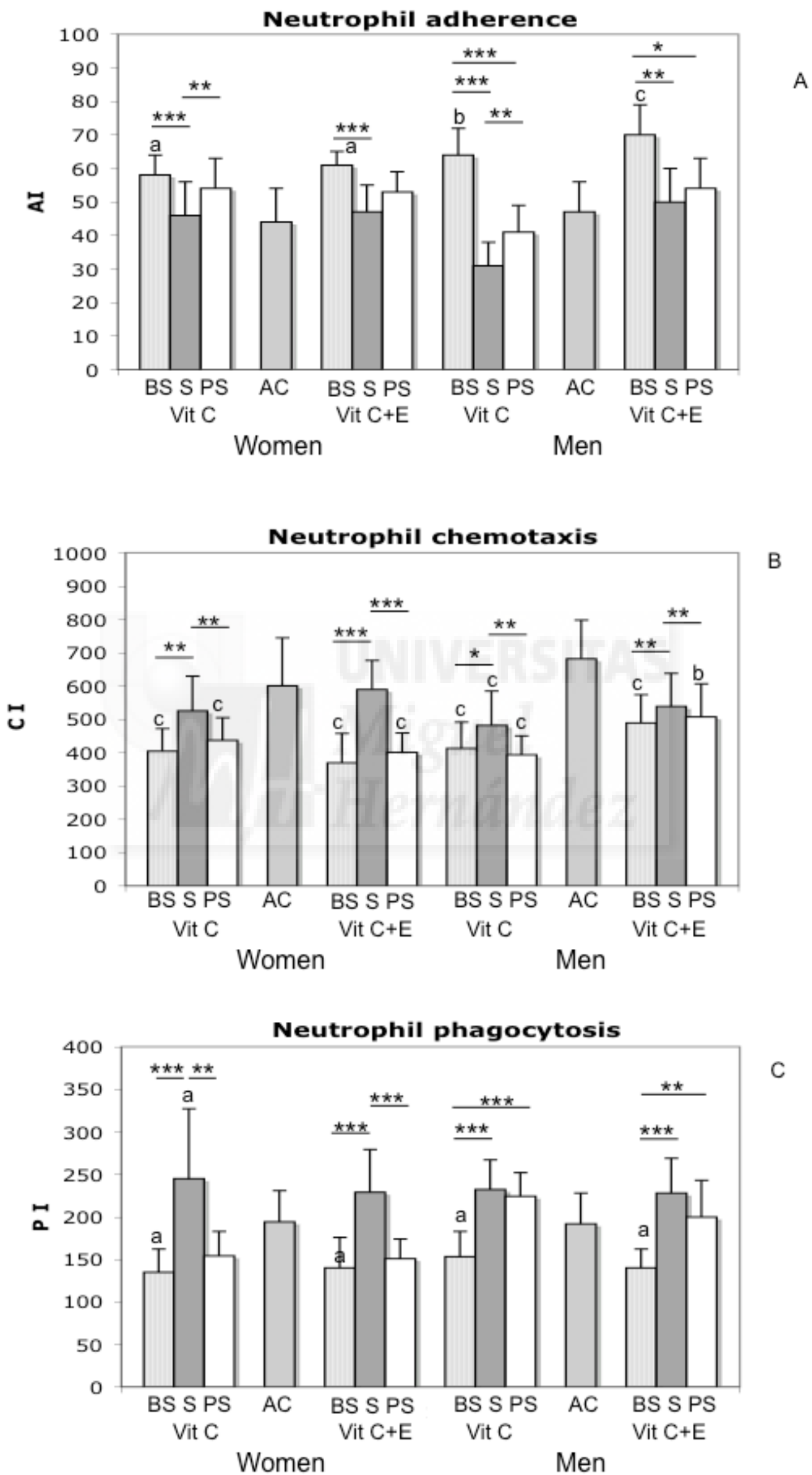
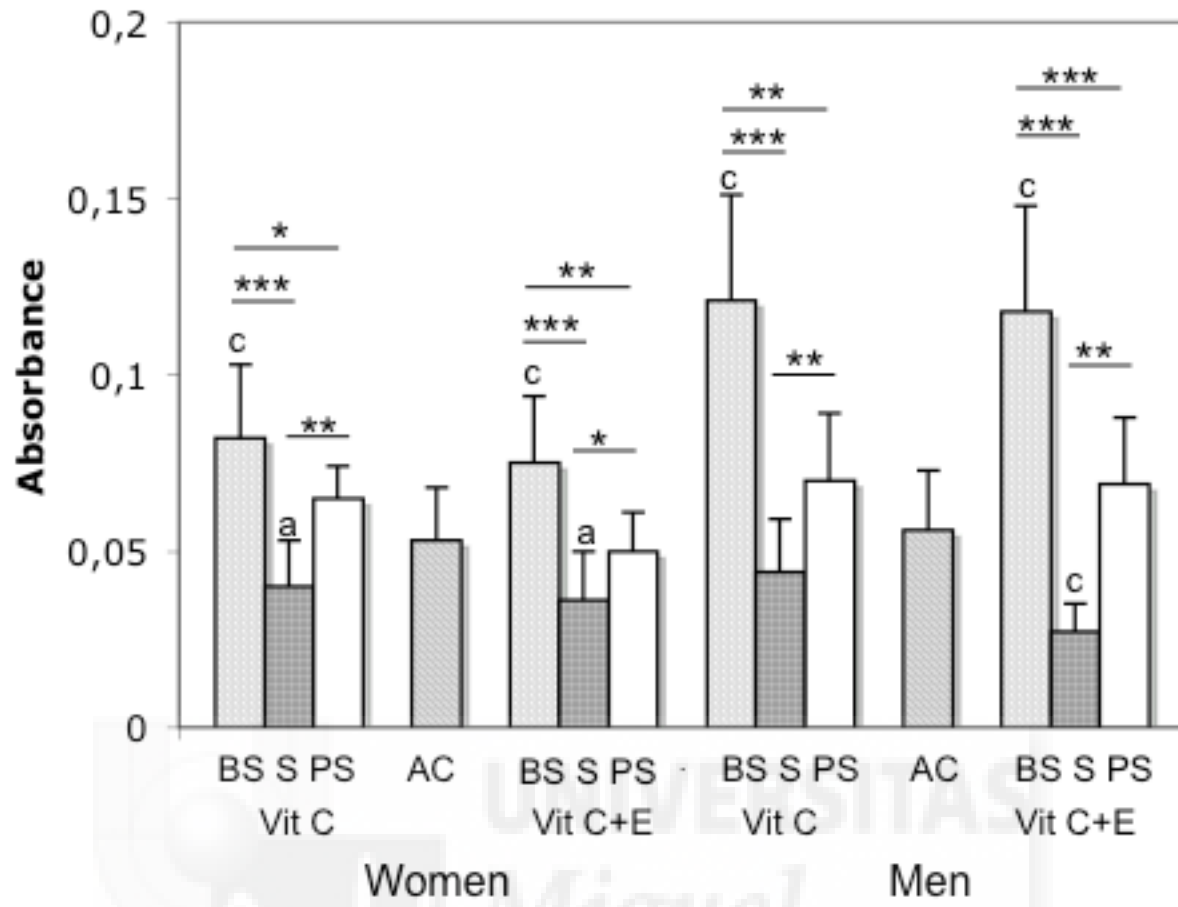


Fig1.

Non-stimulated superoxide anion levels



Stimulated superoxide anion levels

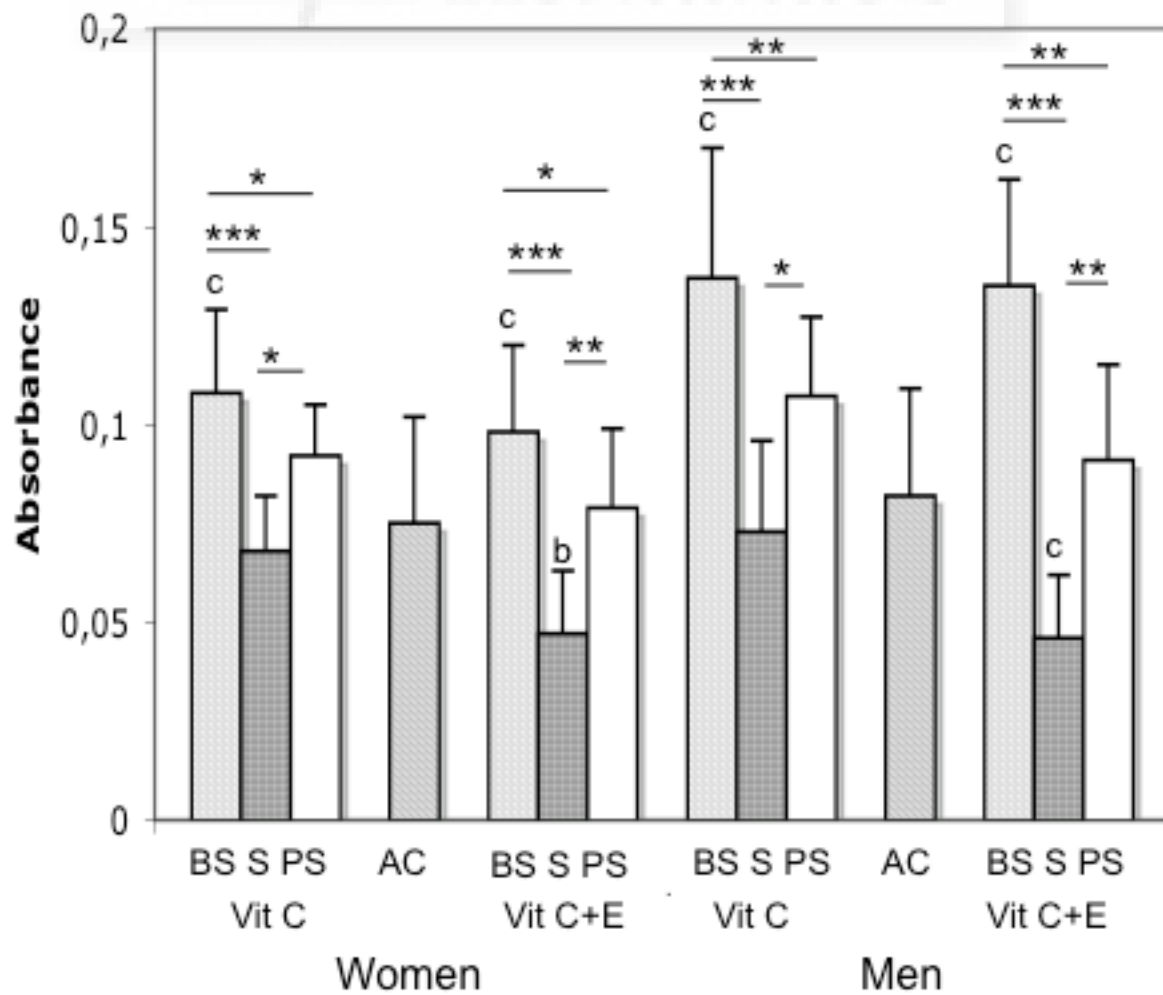


Fig2.

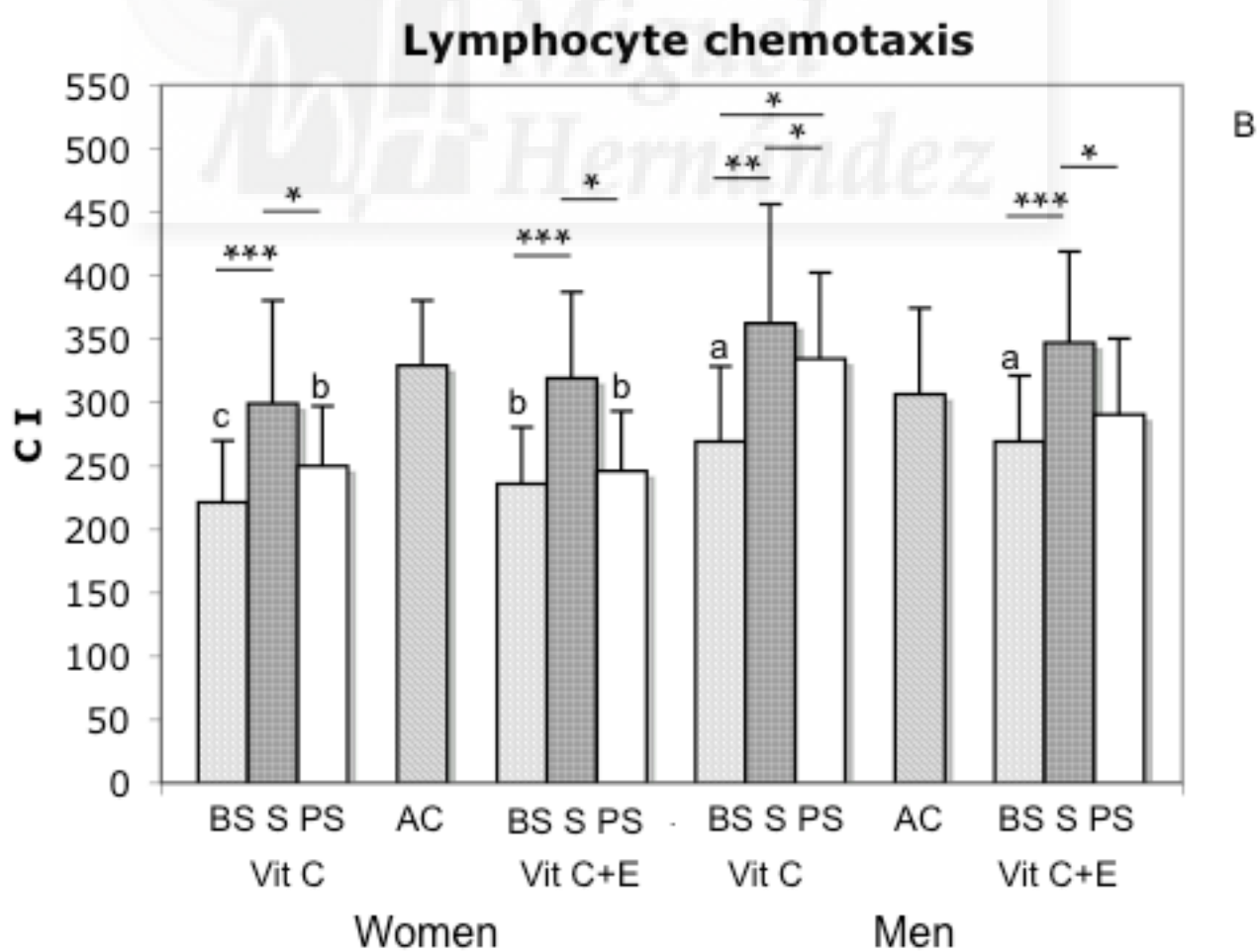
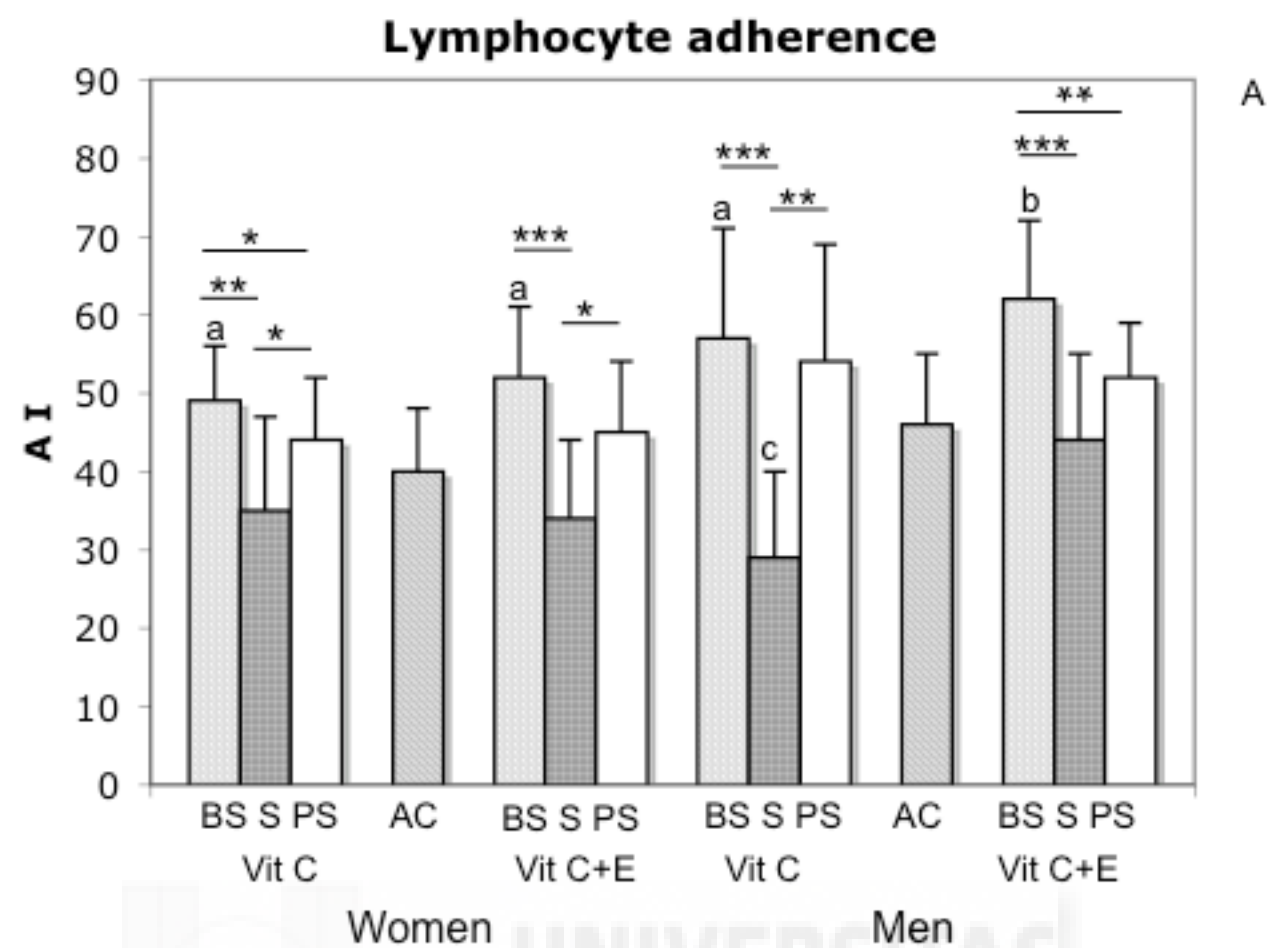


Fig.3.

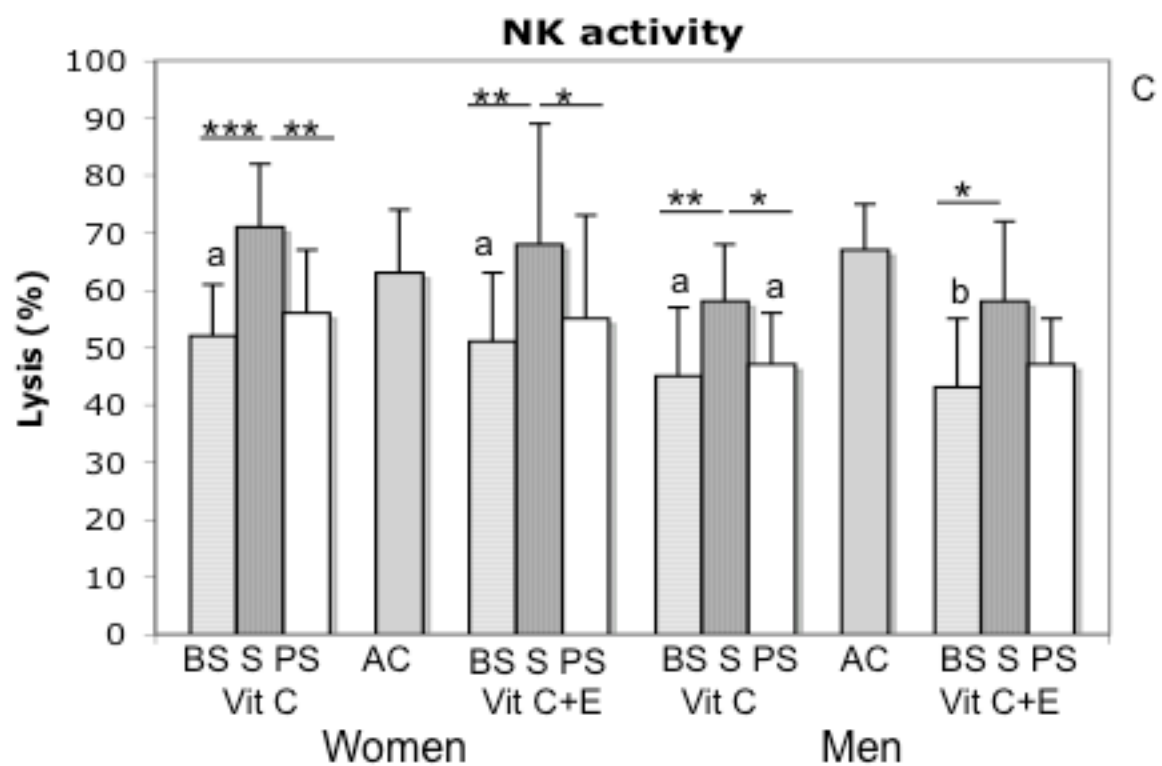
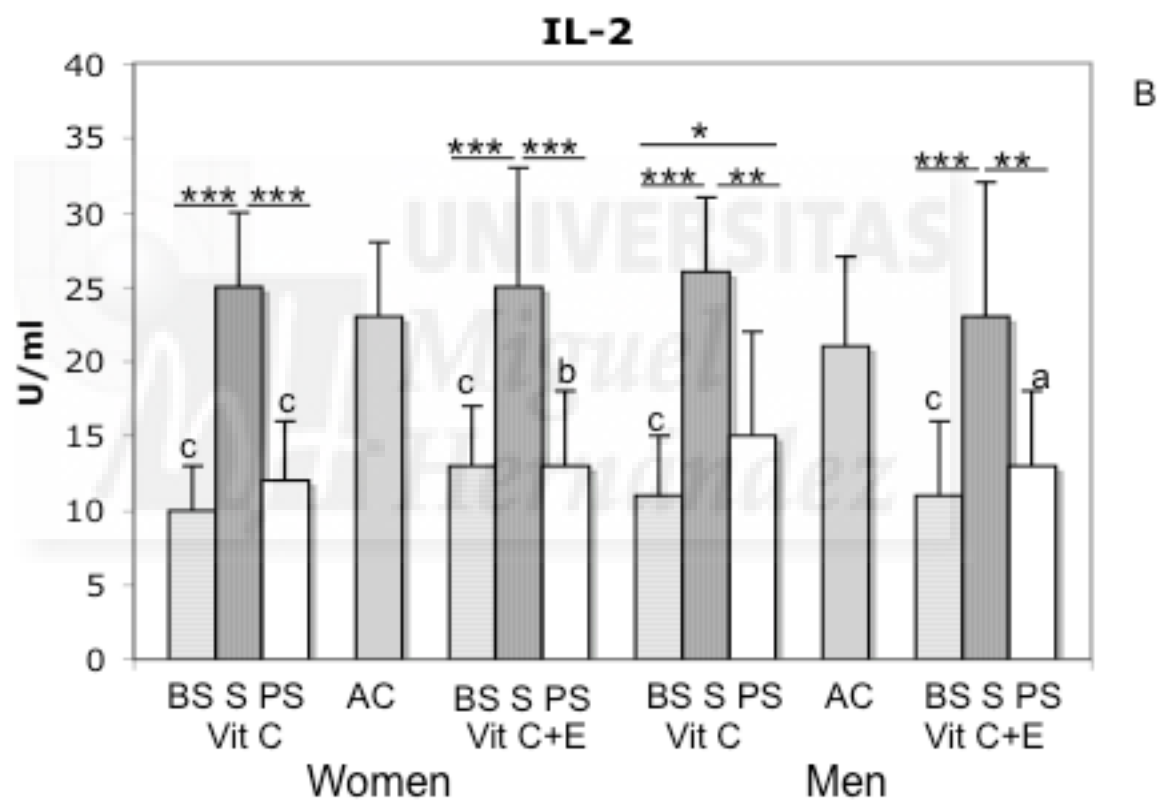
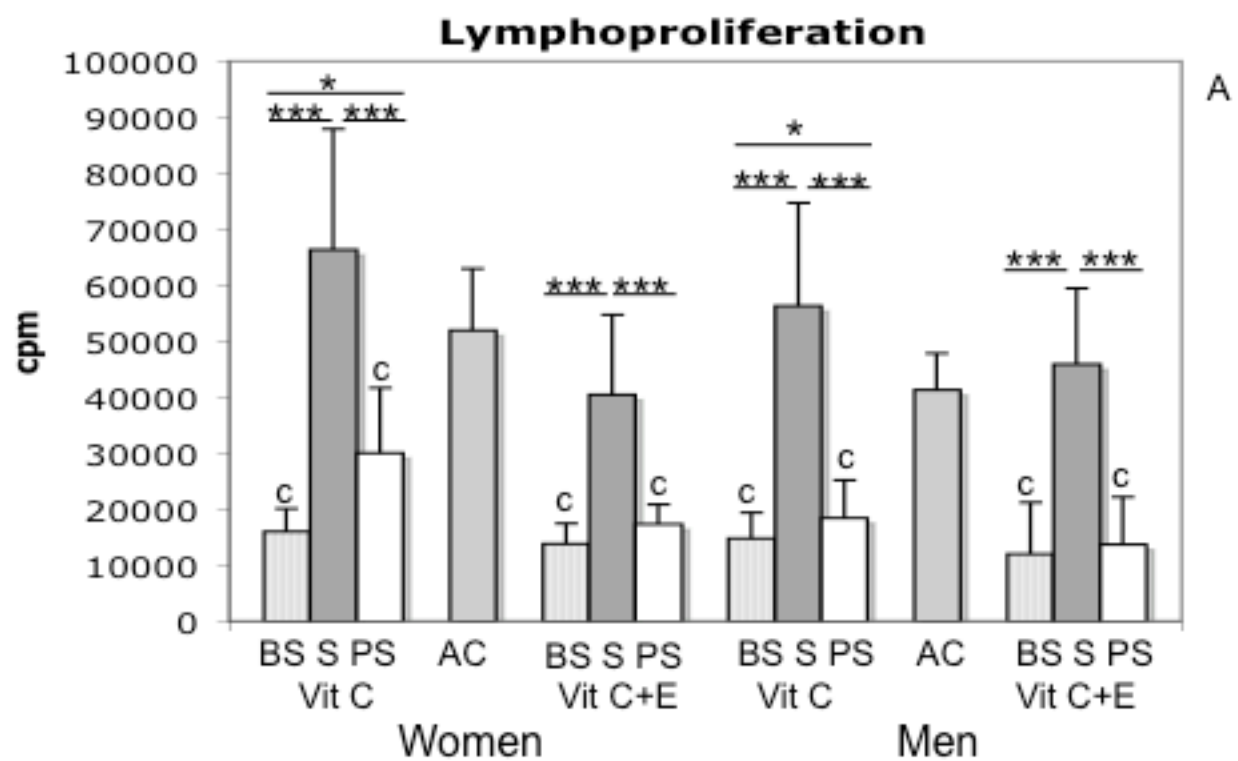


Fig. 4

Please wait...

If this message is not eventually replaced by the proper contents of the document, your PDF viewer may not be able to display this type of document.

You can upgrade to the latest version of Adobe Reader for Windows®, Mac, or Linux® by visiting http://www.adobe.com/go/reader_download.

For more assistance with Adobe Reader visit <http://www.adobe.com/go/acrreader>.

Windows is either a registered trademark or a trademark of Microsoft Corporation in the United States and/or other countries. Mac is a trademark of Apple Inc., registered in the United States and other countries. Linux is the registered trademark of Linus Torvalds in the U.S. and other countries.



Please wait...

If this message is not eventually replaced by the proper contents of the document, your PDF viewer may not be able to display this type of document.

You can upgrade to the latest version of Adobe Reader for Windows®, Mac, or Linux® by visiting http://www.adobe.com/go/reader_download.

For more assistance with Adobe Reader visit <http://www.adobe.com/go/acrreader>.

Windows is either a registered trademark or a trademark of Microsoft Corporation in the United States and/or other countries. Mac is a trademark of Apple Inc., registered in the United States and other countries. Linux is the registered trademark of Linus Torvalds in the U.S. and other countries.



Please wait...

If this message is not eventually replaced by the proper contents of the document, your PDF viewer may not be able to display this type of document.

You can upgrade to the latest version of Adobe Reader for Windows®, Mac, or Linux® by visiting http://www.adobe.com/go/reader_download.

For more assistance with Adobe Reader visit <http://www.adobe.com/go/acrreader>.

Windows is either a registered trademark or a trademark of Microsoft Corporation in the United States and/or other countries. Mac is a trademark of Apple Inc., registered in the United States and other countries. Linux is the registered trademark of Linus Torvalds in the U.S. and other countries.



Editorial Office <em@editorialmanager.com>

Dear Dr De la Fuente,

Your submission entitled "Vitamin C and vitamin C plus E improve the immune function in the elderly" has been received by JNHA - The Journal of Nutrition, Health and Aging

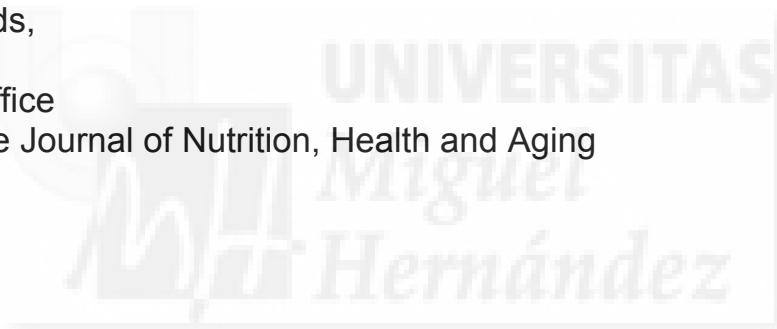
You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an Author. The URL is <http://jnha.edmgr.com/>

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Editorial Office
JNHA - The Journal of Nutrition, Health and Aging



ORIGINAL COMMUNICATION

Effects of antioxidants on immune system ageing

M De la Fuente^{1*}

¹Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

One of the most widely accepted theories proposed to explain ageing is the free radical theory, according to which oxygen-derived free radicals cause age-related impairment through oxidative damage to biomolecules, with mitochondria being the main target of free radical attack. Since oxygen radicals are needed for many metabolic and physiological processes, an equilibrium between radical production and their antioxidant-linked inactivation is required to preserve health. Thus, senescence is the result of an imbalance between free radical production and antioxidant defences, with concomitant oxidative stress and age-dependent functional decline. This process is especially evident in the immune cells, which use free radicals in their functions and suffer a senescent deterioration probably linked to oxygen stress. Conversely, several laboratories, including our own, have shown that antioxidants preserve an adequate function of immune cells against homeostatic disturbances caused by oxidative stress, such as that involved with age. Therefore, since the immune system is an indicator of health and a longevity predictor, the protection of this system afforded by dietary antioxidant supplementation may play an important role in order to achieve a healthy ageing.

European Journal of Clinical Nutrition (2002) 56, Suppl 3, S5–S8. doi:10.1038/sj.ejcn.1601476

Keywords: ageing; antioxidants; immune system

The free radical theory of ageing

More than 300 theories have been proposed to explain the ageing process (Medvedev, 1990), and although none has yet been generally accepted by gerontologists, one of them, namely the free radical theory, proposed by Harman in 1956, has steadily gained acceptance as a plausible explanation of the primary chemical reactions involved in ageing. Presently, due in part to further contributions by authors such as Harman (1986) and Miquel (1998), the free radical (or oxygen stress) theory is almost generally accepted. According to this molecular theory, oxygen-derived free radicals are responsible (due to their high reactivity) for the age-associated damage at the cellular and tissue levels through the oxidative modification of biological molecules (lipids, proteins and nucleic acid), which leads to functional impairment. Moreover, mitochondria, in which there is a continuous generation of free radicals throughout cell life, and especially mitochondrial DNA, are key targets of free radical attack. Cells which use oxygen and consequently

produce reactive oxygen species (ROS) had to evolve complex antioxidant defence systems to neutralize ROS and protect themselves against free radical damage. Thus, the increasing oxidative stress in ageing seems to be a consequence of the imbalance between free radical production and antioxidant defences with a higher production of the former (Sastre *et al*, 2000).

Ageing and the immune system

A wealth of data support the view that the above mechanisms are associated with a decline of many physiological functions, including those of the immune system, which leads to a loss of homeostasis. The importance of senescence of the immune system is evidenced by the high incidence of tumours and the greater susceptibility to infections from pathogens shown by the aged. Moreover, aged subjects who maintain their immune functions at an exceptionally high level probably have a long life span and may even become centenarians (Pawelec *et al*, 1999). Thus, the immune system has been proposed as a marker of biological age and life span since a suboptimal immune function may significantly contribute to morbidity and mortality in the elderly. Moreover, an association between immune function and individual longevity has been suggested (Wayne *et al*, 1990).

*Correspondence: M de la Fuente, Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, E-28040 Madrid, Spain.
E-mail: mondelaf@bio.ucm.es

Ageing of the immune system involves many changes in all aspects of the immune response. It is now well known that in general the activity of the immune system declines with age, with the most pronounced alterations being found in cell-mediated immunity, especially in the T lymphocyte functions, with a decrease in their proliferative capacity as well as in the production of IL-2. These changes have been associated with alterations in the intracellular signalling pathways (Pawelec *et al*, 1999). However, age does not affect all aspects of the immune response equally, since the influence of age on the non-specific immune response mechanism is not always negative. Thus, some studies suggest that the phagocytic cell functions do not change throughout life, while others have observed a senescent decrease or increase in them (Ortega *et al*, 2000). These different results have been attributed to an inappropriate choice of the age of the animals, which were considered old when really they were still not so. Therefore, we have studied several immune functions of phagocytes (non-specific functions such as adherence, chemotaxis, ingestion and superoxide anion production as well as the production of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β), of lymphocytes (adherence, chemotaxis, lymphoproliferations and IL-2 production) and NK activity in a range of ages in mice and humans (Ortega *et al*, 2000; De la Fuente & Victor, 2000; Guayerbas *et al*, 2002a,b). The changes of those functions with ageing are summarized in Table 1. It is possible that nearly every component of the immune system undergoes dramatic age-associated restructuring, leading to changes that include enhanced as well as diminished function. Nevertheless, it seems that the functions more related to oxidative stress such as adherence, free radical or proinflammatory cytokine production (Victor & De la Fuente, 2002), are those that increase with age. Accordingly, we feel that ageing could be considered a chronic inflammatory process.

On the other hand, it is generally accepted that a bidirectional communication exists between the nervous and the immune system (Besedovsky & Del Rey, 1996). Therefore, ageing would be associated not only with a functional decline in the immune and the nervous system, but also

with an impaired relationship between these two regulatory systems (Fabris, 1991; De la Fuente *et al*, 2001), with resulting loss of homeostasis that enhances the probability of death.

Ageing does not affect all individuals in the same way, ie inter-individual differences in the rate of ageing suggest that chronological and biological age do not necessarily coincide. Thus, several studies on mice have related the response in behavioural tests to biological age and to life span (Guayerbas *et al*, 2000; Viveros *et al*, 2001).

In agreement with the above, we have shown inter-individual differences in life span among members of Swiss outbred mouse or BALB/c inbred mouse populations which are related to their behaviour in a simple T-maze test (Guayerbas *et al*, 2000). Furthermore, a relation between T-maze performance and immune status of those animals has been shown. Thus, mice with a 'slow' performance show an impaired immune function, hyperemotional response to stress and a shorter life span when compared to the 'fast' mice, ie those which quickly explore the maze (Correa *et al*, 1999; Viveros *et al*, 2001; Guayerbas *et al*, 2002a,b). These observations led us to propose the 'slow' mice as a model of premature-ageing mice (PAM). Indeed, these PAM, in Swiss and BALB/c strains of mice, show all the immune functions studied (those indicated in Table 1) more aged in these mice than in 'fast' mice (with the same chronological age as the PAM), which are considered non-prematurely ageing mice (NPAM).

Free radicals and antioxidants in the immune system

The immune cell functions such as those involved in the cytotoxic activity and particularly in phagocytes as regards their microbicidal activity, are specially linked to reactive oxygen species (ROS) generation. However, as mentioned above, excessive amounts of ROS which are not counteracted by the antioxidant defenses of the cell, can become a source of tissue damage, since free radicals can attack cellular components and lead to death because of the molecular damage resulting from oxidative stress.

Thus, the immune cell functions are strongly influenced by the antioxidant/oxidant balance and, therefore, the antioxidant levels in these cells play a pivotal role in maintaining immune cells in a reduced environment and in protecting them from oxidative stress and preserving their adequate function (Knight, 2000). More specifically, antioxidants maintain the integrity and function of membrane lipids, cellular proteins, and nucleic acids and the control of signal transduction of gene expression in immune cells. For this reason the immune cells are particularly sensitive to changes in their antioxidant status. Moreover, since the immune system cells have a high percentage of polyunsaturated fatty acids in their plasma membrane, it is not surprising that these cells usually contain higher concentrations of antioxidants than do other cells (Knight, 2000). Indeed, since the early years of the twentieth century the history of

Table 1 Changes with ageing in different functions of immune cells. Effects of a diet supplemented with antioxidants

Cells	Function	Ageing	Antioxidants in age
1. Phagocytes	Adherence	Increase	Decrease (= adult)
	Migration	Decrease	Increase (= adult)
	Phagocytosis	Decrease	Increase (= adult)
	ROS production	Increase	Decrease (= adult)
	TNF- α production	Increase	Decrease (= adult)
	IL-1 production	Increase	Decrease (= adult)
2. Lymphocytes	Adherence	Increase	Decrease (= adult)
	Migration	Decrease	Increase (= adult)
	Proliferation	Decrease	Increase (= adult)
	IL-2 production	Decrease	Increase (= adult)
3. NK cells	Cytotoxicity	Decrease	Increase (= adult)

the relationship between antioxidants and immunology began with an appreciation that antioxidant nutrient deficiencies may cause disease, and that antioxidants have an immunostimulating action. Although recent results throw doubt on this concept, since a total neutralization of ROS could block their functional role and higher levels of antioxidants can produce oxidant effects, the administration of antioxidants has been shown to improve several immune functions.

Antioxidants, namely ascorbic acid (vitamin C in humans and guinea pigs, which is an important cytoplasmic antioxidant), vitamin E (which is considered the principal antioxidant defense against lipid peroxidation in the cell membrane of mammals), glutathione (GSH, which is the most abundant nonprotein thiol-containing substance in living organisms and, in its reduced form, is one of the key links in the chain of antioxidant defenses protecting molecules against ROS damage) or other compounds which raise the tissue levels of thiol groups, such as thioproline (which is anti-toxic in the liver and increases life span in mice) or N-acetylcysteine (NAC, which shows a wide range of effects at all cellular levels such as inhibitory action on apoptosis, pro-inflammatory cytokine production, carcinogenic action of some compounds and metastasis), seem to be excellent controllers of injurious oxidation. Moreover, the levels of these antioxidants decrease during oxidative stress. All these antioxidants have been shown to improve the immune functions *in vitro* and *in vivo* (Correa *et al*, 1999; De la Fuente & Victor, 2000; Victor & De la Fuente, 2002). Furthermore, they inhibit the activation of the nuclear transcription factor NF- κ B produced by oxidative stress, which could result in a decrease of free radicals and pro-inflammatory cytokine production. Therefore, the above-mentioned antioxidants also have an anti-inflammatory action.

Antioxidants and the immune system with ageing

As pointed out above it is accepted that ROS may contribute to cell ageing, and that immunosenescence could result from the continuous oxidative stress with age. Normal senescence is accompanied by a decline in the levels of antioxidants, as occurs for example with GSH, in the blood and organs of humans and experimental animals (Miquel & Weber, 1990). Moreover, a great longevity may be associated with an optimal antioxidant protection. The senescent decrease in antioxidant levels supports the free radical theory of ageing, and provides a rationale for decreasing the rate of ageing by supplementing the diet with these antioxidants (Miquel & Weber, 1990). Previous studies from our laboratory, in old mice as well as in elderly men and women, have demonstrated the beneficial effects *in vitro* and *in vivo*, on the immune functions, of the antioxidants mentioned above (De la Fuente *et al*, 1998a,b; De la Fuente & Victor, 2000; Ferrández *et al*, 1999), and we should emphasize that an adequate immune system is a marker of health and longevity (Wayne *et al*, 1990). Moreover, the antioxidant doses should

be higher in old animals than in the adult in order to improve the immune system (De la Fuente *et al*, 2002).

In the premature ageing model commented on above the supplementation of the diet with thioproline and/or NAC improved immune function in PAM bringing the values of the immune functions near those found in the NPAM (Correa *et al*, 1999).

Apparently the antioxidants are able to raise the decreased functions and lower the very stimulated functions in immune cells from aged animals. This immunomodulatory role of antioxidants has been shown in immune cell functions in ageing and in an oxidative stress experimental model, namely endotoxic shock, in which the immune functions are altered in a way similar to ageing (De la Fuente & Victor, 2000; Victor & De la Fuente, 2002).

In Table 1 changes in several immune functions with ageing are shown as well as their response to ingestion of a diet supplemented with antioxidants.

In summary, since the immunostimulant effects of antioxidants depend on the age and immune state of organisms as well as on the kind of immune function studied, we hypothesize that antioxidants, such as the above-mentioned compounds, do not exert an indiscriminate stimulating effect on the immune cell function, but instead they are homeostatic factors. Thus, since the immune system is a health indicator and longevity predictor, the protection of this system by antioxidant diet supplementation may be useful for health preservation in the aged.

Acknowledgements

This work was supported by FIS (99/0815) and MCYT (BFI2001-1218) grants.

References

- Besedovsky H & Del Rey A (1996): Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrinol. Rev.* **17**, 64–102.
- Correa R, Blanco B, Del Río M, Victor V, Guayerbas N, Medina S & De la Fuente M (1999): Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. *Biofactors* **10**, 195–200.
- De la Fuente M & Victor VM (2000) Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 49–54.
- De la Fuente M, Ferrandez MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A & Miquel J (1998a): Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **76**, 373–380.
- De la Fuente M, Ferrandez MD, Del Rio M, Burgos MS & Miquel J (1998b): Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline. *Mech. Ageing Devl.* **104**, 213–225.
- De la Fuente M, Del Rio M & Medina S (2001): Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J. Neuroimmunol.* **116**, 156–167.
- De la Fuente M, Miquel J, Catalán MP, Victor VM & Guayerbas N (2002): The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Rad. Res.* **36**, 119–126.
- Fabris N (1991): Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to ageing. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **12**, 219–230.

- Ferrández MD, Correa R, Del Rio M & De la Fuente M (1999): Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp. Gerontol.* **34**, 675–685.
- Guayerbas N, Sánchez AI, Gamallo A, Miquel J & De la Fuente M (2000): Mouse performance in an exploratory activity test as a longevity biomarker. In *Animal Research and Welfare A Partnership*, pp 159–161. UK: Lab Animals Ltd.
- Guayerbas N, Catalán M, Victor VM, Miquel J & De la Fuente M (2002a): Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav. Brain Res.* (in press).
- Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J & De la Fuente M (2002b): Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp. Gerontol.* **37**, 249–256.
- Harman D (1956): Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300.
- Harman D (1986): Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging and disease processes. In: *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases* ed. JE Johnson Jr, R Walford, D Harman, J Miquel, pp 3–49. New York: Liss.
- Knight JA (2000): Review: free radicals, antioxidants and immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **30**, 145–158.
- Medvedev ZA (1990): An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol. Rev.* **65**, 375–398.
- Miquel J (1998): An update on the oxygen stress–mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp. Gerontol.* **33**, 113–126.
- Miquel J & Weber H (1990): Aging and increased oxidation of the sulfur pool. In *Glutathione* ed. J Viña Boca Raton, FL: RC Press.
- Ortega E, García 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.
- Pawelek G, Effros C, Caruso C, Remarque E, Barnett Y & Solana R (1999): T cells and aging. *Front. Biosci.* **4**, 216–269.
- Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J & Viña J (2000): Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Rad. Res.* **32**, 189–198.
- Victor VM & De la Fuente M (2002): N-acetylcysteine improves in vitro the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Rad. Res.* **36**, 33–45.
- Viveros MP, Fernández B, Guayerba N & De la Fuente M (2001): Behavioral characterization of mouse model of premature immunosenescence. *J. Neuroimmunol.* **114**, 80–88.
- Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ & Goodwin JS (1990): Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J. Gerontol.* **45**, M45–48.



A Model of Premature Aging in Mice Based on Altered Stress-Related Behavioral Response and Immunosenescence

María-Paz Viveros · Lorena Arranz · Angel Hernanz · Jaime Miquel
Mónica De la Fuente

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Key Words

Aging · Immunosenescence · Stress · Behavioral response ·
Premature aging model · Mice · Oxidative stress

Abstract

The intensity of behavioral and neuroendocrine responses to stressful stimuli in rodent strains seems to be inversely related to their life span. We have previously shown that interindividual differences in members of outbred Swiss and inbred BALB/c mouse populations, both male and female, may be related to their behavior in a simple T-maze test. The animals that explore the maze slowly show impaired neuromuscular vigor and coordination, decreased locomotor activity, increased level of emotionality/anxiety, decreased levels of brain biogenic amines as well as immunosenescence and decreased life span, when compared to their control counterparts, which quickly explore the maze. These traits are similar to some of the alterations previously observed in aging animals and therefore we proposed that those 'slow mice' are biologically older than the fast animals and may be a model of prematurely aging mice (PAM). Although most of our work on this model has been performed on chronologically adult-mature animals, we have also shown that certain characteristics of PAM, such as increased anxiety and deficient immune response, are already present in chronologically young animals. Thus, it is tempting to hy-

pothesize that chronic hyperreactivity to stress (trait anxiety) leading to immune dysfunction may have a causal relationship with impaired health and premature aging. In view of the link between oxidative stress and the aging process, the redox state of peritoneal leukocytes from PAM has been studied, showing an oxidative stress situation. In the present work we have determined the levels of a key antioxidant, reduced glutathione (GSH), and the oxidant malondialdehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation, both in the spleen and brain of male and female PAM and non-PAM (NPAM). We found that GSH and MDA are decreased and increased, respectively, in PAM with respect to NPAM. Moreover, diet supplementation with antioxidants showed to be an effective strategy for protection against early immune and behavioral decline, altered redox state of leukocytes and premature mortality in PAM, which supports the validity of this model of premature aging as well as its link with oxidative stress.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

Stress, Health and Disease: The Psychoneuroendocrine-Immune Network

A correct function and adequate interactions between the 3 main regulatory systems, that is, the nervous, endocrine and immune system, that are mediated by cytokines, hormones and neurotransmitters, are crucial for

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2007 S. Karger AG, Basel
1021-7401/07/0144-0157\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/nim

Maria-Paz Viveros
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología
Universidad Complutense de Madrid
ES-29040 Madrid (Spain)
Tel. +34 91 394 4993, Fax +34 91 394 4935, E-Mail pazviver@bio.ucm.es

health and therefore for longevity. In this review we focus on 2 conditions, aging and stress, in which the neuroendocrine-immune communication becomes altered, resulting in immune suppression and loss of homeostasis [1, 2]. Aging has been associated with immunological changes (immunosenescence) including thymic involution, lower number of naive T cells, decrease in several cell immune functions and increase in others, and poor vaccination response to new antigens [3, 4]. Moreover, the immune function is presently considered a good marker of health, longevity [5] and biological age [4]. The immunological changes observed in healthy aging may be closely related to both psychological distress and stress hormones. Particularly, the changes in cellular trafficking as well as cell-mediated immunity observed in aging are similarly found following stress or chronic glucocorticoid exposure [2]. These data raise the question of whether mood disorders might be associated with accelerated aging. Indeed, there is evidence suggesting a link between chronic psychological stress, impaired immune function and a higher risk for several diseases [6–9]. It has also been proposed that chronic stress associated with mood disorders may contribute to higher vulnerability to diseases of aging such as cardiovascular disease and possibly some cancers through accelerated organismic aging [10]. Epel et al. [11] have investigated the hypothesis that stress impairs health by modulating the rate of cellular aging. They reported that psychological stress – both perceived stress and the chronicity of stress – is significantly associated with higher oxidative stress, lower telomerase activity and shorter telomere length, which are known determinants of cell senescence and longevity, in peripheral blood mononuclear cells from healthy premenopausal women. In fact, recent work suggests that chronic mood disorders may contribute to an acceleration of the aging process and provides a novel mechanistic explanation contributing to the excessive age-related morbidity and mortality seen in mood disorders [10].

A Model of Premature Aging in Mice

In view of the above we can hypothesize that psychological stress may lead to earlier onset of aging-related diseases and premature aging and that animal studies may be useful to test this hypothesis. The life span of rodent strains appears to be inversely related to the intensity of their behavioral and neuroendocrine responses to stressful stimuli. In particular, animals that exhibit immobility or ‘freezing behavior’ (that is, high levels of anx-

ety) when placed in a new environment usually show a short life span. It has been proposed that hyperreactivity to stressors might be genetically linked to a shorter life span and accelerated age-dependent neurodegeneration [12, 13]. Previous studies from our laboratory showed that interindividual differences in life span among members of outbred Swiss mouse populations may be related to their behavior in a simple T-maze test, with most mice which quickly explored the maze (fast mice) reaching a longer life span than mice that took longer to accomplish this task (slow mice) [14, 15]. This slow performance was accompanied by an impaired immune function as regards mobility of both macrophages and lymphocytes and lymphoproliferative response to the mitogen Con A in old female Swiss mice [16]. The slow adult female mice also showed a worse peritoneal macrophage phagocytic activity than the fast animals [17]. These findings led us to propose the slow mice as a model of immunosenescence. Moreover, a slow performance in the T-maze was accompanied by a lower ability to perform in the tight-rope test [14], a vigor and neuromuscular coordination marker [18]. The use of a battery of behavioral tests involving diverse stressful conditions allowed us a more complete behavioral characterization of fast and slow mice. Thus, slow mice showed decreased locomotor activity and increased level of emotionality/anxiety in diverse standard behavioral tests (holeboard, open field and plus-maze), when compared to fast mice. The differences in their behavioral responses are compatible with an increased emotionality and a less adaptive response to stress in the slow animals [19]. Thus, slow or hyperemotional mice, in which immune and neurobehavioral functions appeared to be impaired, emerged as a probable and useful model of premature aging. Accordingly, we proposed that the slow mice are biologically older [prematurely aging mice (PAM)] than the fast animals [non-PAM (NPAM)], and that PAM may be a model of premature aging. In more recent studies, we have observed that in peritoneal leukocytes from PAM the above-mentioned immune functions and others show values similar to those of chronologically older animals (table 1) [14, 15, 20–23]. Moreover, we also compared the monoaminergic systems of PAM with those of NPAM in discrete brain regions, that is hypothalamus, hippocampus, striatum, frontal cortex and midbrain. In order to investigate possible relationships between the behavioral and neurochemical parameters, we have analyzed the brains of the same animals used in our previous behavioral study [19]. PAM showed a number of modifications in their monoaminergic systems, which clearly resemble some of the

alterations previously reported for aging animals, and the altered brain biogenic amines of PAM appear to be related to their behavioral features [24]. Thus, the neurochemical characterization of PAM further supported the hypothesis that these mice may be considered a useful model of premature aging. Although most of our work on this model has been performed on chronologically adult-mature animals, we have also shown that certain characteristics of PAM, such as increased anxiety and deficient immune response, are already present in chronologically young animals. Moreover, PAM showed increased baseline corticosterone and blunted stress response when compared to NPAM [21].

The Role of Oxidative Stress

Progressive dysregulation of immune responses associated with aging may be a result of increased oxidative stress [4]. Accordingly, we have also evaluated certain parameters of oxidative stress in our animal model. In particular, we assessed the oxidative stress status of peritoneal leukocytes from PAM in comparison to NPAM, as well as the effects on oxidative stress of dietary supplementation with biscuits rich in antioxidants [23, 25]. We found that in the peritoneal leukocytes, the levels of several parameters of oxidation and inflammation such as extracellular superoxide anion, prostaglandin E2, tumor necrosis factor- α (TNF- α), nitric oxide, oxidized glutathione (GSH), lipid peroxidation (malondialdehyde, MDA) and DNA oxidation (8-oxo,7,8-dehydro-2'-deoxyguanosine) were higher in PAM than in NPAM, whereas the antioxidant defenses such as superoxide dismutase, catalase, GSH peroxidase and GSH reductase activities, as well as the reduced GSH levels, were decreased (table 1). Therefore, PAM showed oxidative stress in their leukocytes that is characteristic for mice of an older chronological age [4, 26]. This is another confirmation that PAM are biologically older, at the same chronological age, than NPAM. Moreover, as indicated above, the life expectancy of PAM is lower than that of NPAM [14, 15, 20]. Therefore, not only the immune functions studied are good markers of biological age and longevity, but also the parameters of oxidative stress and damage that we have determined in leukocytes may represent useful biomarkers of aging [4]. In addition, it is known that females live longer and produce less oxidants than males [27]. We have analyzed the levels of a very important antioxidant (GSH) and of an oxidant and marker of lipid peroxidation (MDA) in the brain and spleen from female

Table 1. Changes in immune functions and oxidative stress parameters in peritoneal leukocytes from PAM versus NPAM and effects of a diet supplemented with antioxidants

	PAM	Anti-oxidant supplementation
<i>Immune functions</i>		
Adherence of macrophages and lymphocytes	increase	decrease
Mobility of macrophages and lymphocytes	decrease	increase
Phagocytosis capacity of macrophages	decrease	increase
Intracellular superoxide anion and ROS	decrease	increase
Lymphoproliferative response to mitogens	decrease	increase
Natural killer activity	decrease	increase
Interleukin-2 release	decrease	increase
<i>Oxidant and pro-inflammatory compounds</i>		
Extracellular superoxide anion	increase	decrease
Oxidized glutathione	increase	decrease
Oxidized/reduced glutathione	increase	decrease
Tumor necrosis factor- α	increase	decrease
Prostaglandin E2	increase	decrease
Nitric oxide	increase	decrease
<i>Antioxidant defenses</i>		
Reduced glutathione	decrease	increase
Superoxide dismutase	decrease	increase
Catalase	decrease	increase
Glutathione peroxidase	decrease	increase
Glutathione reductase	decrease	increase
<i>Oxidative damage</i>		
Malondialdehyde	increase	decrease
8-oxo,7,8-dehydro-2'-deoxyguanosine	increase	decrease

and male PAM and NPAM. The results show that in general, GSH and MDA decreased and increased, respectively, in PAM with respect to NPAM and in males with respect to females, with these effects being more evident in the brain than the spleen (fig. 1). Thus, subjects from a strain of mice with higher oxidative stress in the nervous and immune cells, such as PAM versus NPAM and males versus females, show worse neurochemical and behavioral response to stress as well as worse immune cell functions and, consequently, a shorter life expectancy.

We also found that antioxidant diet supplementation was able to improve the immune functions as well as restore redox homeostasis, increasing the antioxidant and decreasing the oxidant levels in PAM (table 1) [22, 23, 25, 28, 29]. Moreover, antioxidant diet supplementation reverses age-related behavioral dysfunction in PAM [30] and has been able to extend the life span of PAM (data in the process of publication).

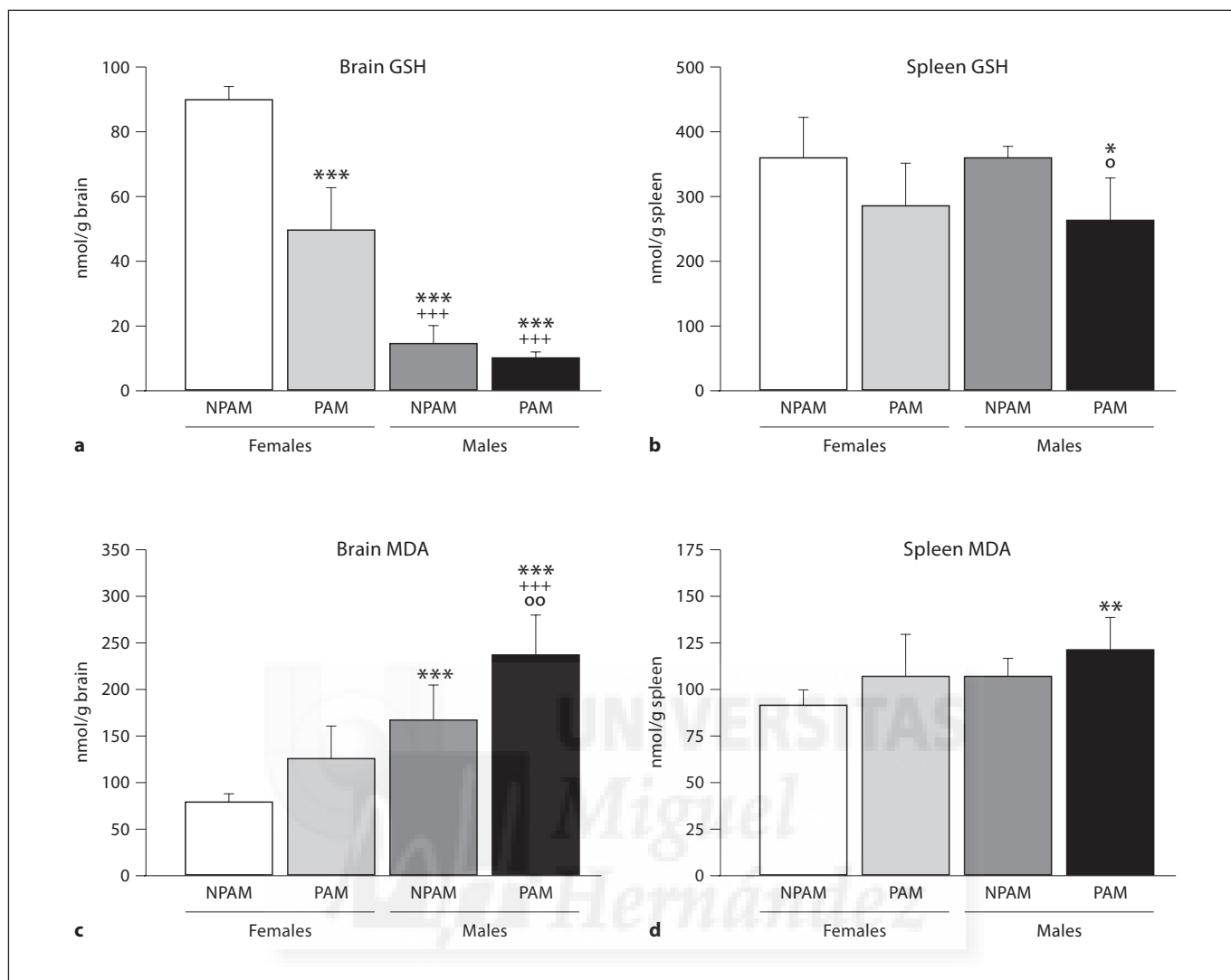


Fig. 1. Histograms showing means \pm SD ($n = 7$ for each experimental group) of female and male NPAM and PAM (anxiety animals). **a** Brain GSH levels, statistically significant overall effect of gender and premature aging (anxiety, $p < 0.001$). **b** Spleen GSH levels, significant overall effect of premature aging (anxiety, $p < 0.001$). **c** Brain MDA levels, significant overall effect of gender and premature aging (anxiety, $p < 0.001$). **d** Spleen MDA levels, significant overall effect of gender and premature aging (anxiety, $p < 0.05$). ANOVA and Tukey test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. female NPAM; +++ $p < 0.001$ vs. female PAM; ° $p < 0.05$; °° $p < 0.01$ vs. male NPAM.

We have recently studied important lymphocyte and neutrophil functions, cytokine release, plasma cortisol and total antioxidant capacity in anxious women versus nonanxious controls of the same age. The results showed a deficient immune function in anxious women, that is diminished chemotaxis, phagocytosis, lymphoproliferation in response to phytohemagglutinin mitogen, natural killer activity and interleukin-2 release. Further they showed signs of oxidative stress such as increased super-

oxide anion levels and TNF- α release. These changes are similar to those we have found in elderly women. The impaired immune function and cytokine release in anxious women might be related to their increased cortisol secretion, which would lead to oxidative stress reflected in lowered total plasma antioxidant capacity [31]. It is worth mentioning that the results obtained in this study resemble those obtained when PAM (with increased levels of anxiety) are compared to NPAM of the same chronolog-

ical age. A recent study by Bouayed et al. [32] provides further support for a link between oxidative stress and anxiety. They studied the relationship between the level of intracellular reactive oxygen species in peripheral granulocytes and the anxiety level of mice determined using the behavioral light/dark choice test. The results indicated a linear and significant relationship between the intracellular redox status of peripheral blood granulocytes and different parameters of anxiety-related behavior. These findings suggest a positive relationship between peripheral oxidative status and level of anxiety in mice.

Concluding Remarks

As pointed out by Bauer [2], because there are a number of similarities among age- and stress-related immunological alterations, further studies on the role of stress factors on human immunosenescence are absolutely nec-

essary. Thus, the use of animal models such as the PAM model reviewed here appears to be of special interest. It is worth noting that this model may be particularly useful, since it is based on naturally occurring phenotypes within mouse populations that are not submitted to any genetic manipulation or special selective breeding process. This kind of 'natural' models may be particularly useful for identification of biological markers of physiological aging. Unraveling the relationships between chronic stress (or perhaps more likely a diminished ability of coping with stressful situations) and accelerated biological aging may facilitate the introduction of adequate preventive and therapeutic strategies.

Acknowledgments

This work was supported by grants of the Ministerio de Educación y Ciencia, MEC (BFU 2005-06777) and RETICEF (RD06/0013/0003) (ISCIII). L.A. has a predoctoral fellowship from the MEC.

References

- Butcher SK, Lord JM: Stress responses and innate immunity: aging as a contributory factor. *Ageing Cell* 2004;3:151-160.
- Bauer ME: Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress* 2005;8:69-83.
- De la Fuente M: Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:S5-S8.
- De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo, MC: The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension: favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1356-1366.
- Wayne SL, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS: Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 1990;45:M45-M48.
- Barak Y: The immune system and happiness. *Autoimmun Rev* 2006;5:523-527.
- McEwen BS: Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry* 2003;54:200-207.
- McEwen BS: Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci* 2006;8:367-381.
- Thaker PH, Lutgendorf SK, Sood AK: The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. *Cell Cycle* 2007;6:430-433.
- Simon NM, Smoller JW, McNamara KL, Maser RS, Zalta AK, Pollack MH, Nierenberg AA, Fava M, Wong KK: Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol Psychiatry* 2006;60:432-435.
- Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM: Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:17312-17315.
- Dellu F, Mayo W, Vallée M, Le Moal M, Simon H: Reactivity to novelty during youth as a predictive factor of cognitive impairment in the elderly: a longitudinal study in rats. *Brain Res* 1994;653:51-56.
- Gilad GM, Gilad VH: Strain, stress, neurodegeneration and longevity. *Mech Ageing Dev* 1995;78:75-83.
- Guayervas N, Catalan M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M: Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* 2002;134:41-48.
- Guayervas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M: Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002;37:249-256.
- De la Fuente M, Miñano M, Victor VM, Del Río M, Ferrández MD, Díez A, Miquel J: Relation between exploratory activity and immune function in aged mice: a preliminary study. *Mech Ageing Dev* 1998;102:263-277.
- Correa R, Blanco B, Del Río M, Victor V, Guayervas N, Medina S, De la Fuente M: Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. *Biofactors* 1999;10:195-200.
- Miquel J, Blasco M: A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice by testing their muscular coordination and vigor. *Exp Gerontol* 1978;13:389-396.
- Viveros MP, Fernandez B, Guayervas N, De la Fuente M: Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J Neuroimmunol* 2001;114:80-88.
- Guayervas N, De La Fuente M: An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol* 2003;27:339-350.
- Perez-Alvarez L, Baeza I, Arranz L, Marco EM, Borcel E, Guaza C, Viveros MP, De la Fuente M: Behavioral, endocrine and immunological characteristics of a murine model of premature aging. *Dev Comp Immunol* 2005;29:965-976.
- Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L, De la Fuente M: Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1203-1210.

- 23 Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausserés N, Jimenez L, De la Fuente M: Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* 2006;22:767–777.
- 24 De la Fuente M, Hernanz A, Medina S, Guayerbas N, Fernandez B, Viveros MP: Characterization of monoaminergic systems in brain regions of prematurely ageing mice. *Neurochem Int* 2003;43:165–172.
- 25 Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L, De la Fuente M: Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants. *Dev Comp Immunol* 2006;30:1168–1180.
- 26 De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, Alvarado C: Changes with age in peritoneal macrophage functions: implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol* 2004;50:OL683–OL690.
- 27 Viña J, Sastre J, Pallardo FV, Gambini J, Borras C: Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders: protective effect of estrogens. *Free Rad Res* 2006;40:1359–1365.
- 28 Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, De la Fuente M: Improvement of the macrophage functions in premature ageing mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. *Cell Mol Biol* 2004;50:OL677–OL681.
- 29 Alvarez P, Alvarado C, Puerto M, Schlumberger A, Jimenez L, De la Fuente M: Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals. *Nutrition* 2006;22:913–921.
- 30 Guayerbas N, Puerto M, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M: Thiolic antioxidant supplementation of the diet reverses age-related behavioral dysfunction in prematurely ageing mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80:45–51.
- 31 Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M: Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res* 2007;62:1–8.
- 32 Bouayed J, Rammal H, Younos C, Soulimani R: Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *Eur J Pharmacol* 2007;564:146–149.





The Immune System as a Marker of Health and Longevity

Dr. Mónica De la Fuente

Professor of Physiology, Faculty of Biological Sciences, Complutense University

SUMMARY

The function of the immune system is to recognize the "self" or identity of each individual and to destroy foreign microorganisms and tumor cells. It has been shown that a well preserved function of the immune cells is an excellent marker of health and, accordingly, we have confirmed that the functional competence of leucocytes, determined by means of a battery of parameters that change with age, is a marker of "biological age" in human subjects as well as in laboratory animals. Further, we have found that in our model of premature ageing in mice the immune function biomarkers are good predictors of longevity. Thus, the mice showing immune parameters characteristic of animals of older chronological age have a lower life expectancy than those which as regards their immune function are "biologically younger". In relation to the above, it is proper to consider why the immune functions are altered in the aged organisms. In our opinion, the senescence of immune cells, like that of other cell types, is probably due to the oxidative stress (linked to raised production of free radicals and decreased antioxidant defense) that occurs with age. Moreover, we suggest that the immune system, because of its need to produce free radicals (FR) and other oxidant and inflammatory compounds in order to support its functions, is very involved in the oxidation/inflammation process that underlies senescence. This view justifies present attempts to prevent age-related oxidative stress by diet supplementation with antioxidants. Accordingly, as regards the immune system a number of studies, performed both in human subjects and in experimental animals, has shown that the ingestion of antioxidants by aged individuals changes the functional parameters of leucocytes, bringing them to levels similar to those of the adult. This immune "rejuvenation", that

is accompanied by an increased longevity in the experimental animals, supports the oxidation/inflammation theory of ageing and the useful role of the investigated leucocyte functions as markers of life expectancy and health.

Key words: Immune System. Aging. Oxidative stress. Antioxidants.

THE IMMUNE SYSTEM

Since we are born we are continuously exposed to suffer infectious and carcinogenic processes that might result in death if the organism did not have at its disposal a complex physiological system that protects us against those processes, namely the immune system. This system is composed by a large variety of cells and molecules able to recognize and eliminate a great number of different agents foreign to the organism, which comprise not only the invading microorganisms but also our own cells that are continuously exposed to tumorigenic mutations. The immune cells have a wide functional competence and present multiple and complex forms of communication. The mechanisms used by the leucocytes in order to carry out their functions, the so-called "immune response", are based on the following steps: (a) recognition of the foreign, i.e., the antigen. (b) Activation against this antigen, that is very well regulated, since an uncontrolled activation of the immune system may be the cause of pathological processes and mortality. (c) Destruction of the foreign agents (infectious microorganisms or cells that have suffered a malignant transformation).

In view of the above, the immune system is uniquely suited to recognize our integrity, i.e., our own self and thus be able to defend us from foreign pathogenic agents. On the basis of the above, since



it is obvious that an adequate leucocyte function is essential to insure a correct organismic function, the functional competence of leucocytes has been recommended as one of the best biomarkers of the health of a subject and therefore of his life expectancy (1). Moreover, since the immune system has a key role in the preservation of homeostasis, this system is presently considered a genuine regulatory system, comparable to the "classic" regulatory systems, namely the nervous and the endocrine systems (2-4).

THE NEUROENDOCRINE-IMMUNE SYSTEM

It is worth mentioning that the immune system (IS) does not work in isolation but it functions in close relationship with the other regulatory systems of the organism, namely the nervous and the endocrine system. This bidirectional communication between the regulatory systems was confirmed in the seventies by Besedowski et al., who found that the glucocorticoid levels, which increased during the immune response, had a suppressor effect on that response (5). Further work by Besedowsky and other workers confirmed the above mentioned system connections (6-8). Thus it was accepted that the IS represents a system of reception of information of non-cognition related stimuli that appear in the organism (infections, tumor cells or other types of foreign cells) and response to those stimuli, accompanied by transfer of that information (by means of the cytokines produced by I.S. cells) to the neuroendocrine system. On the other hand, the neuroendocrine system is a receptor of cognitive stimuli (light, sound, stress situations, etc.) to which it responds, and its mediators (neurotransmitters and hormones) reach the I.S. to inform it about the situation. Thus, there is a neuroendocrine-immune system that allows the preservation of organismic homeostasis and therefore of health. The scientific confirmation of this communication has allowed to understand, on the basis of the experimental data, a number of facts of everyday life. Thus it is well known that the situations of depression, emotional stress or anxiety, provoked for instance by the loss of the job or of a close relative, are accompanied by a

greater vulnerability to conditions ranging from infectious processes to cancer or autoimmune diseases, which agrees with the concept that the IS is impaired, which results in worse health and a shorter life span. By contrast, pleasurable situations and an "optimistic outlook" on life help us to overcome IS-related diseases and enjoy a better overall health. Conversely, it has been shown that IS changes such as found in infectious processes alter nervous system functions, which can even lead to psychotic disorders. Presently it is accepted that the three above mentioned regulatory systems share receptors and therefore any influence exerted on the IS will have an effect on the nervous and endocrine systems and viceversa.

AGE-RELATED CHANGES IN THE IMMUNE SYSTEM

The impairment of the IS with age, i.e. the immunosenescence, exerts a great influence on the increasing morbidity and mortality observed in aging human subjects (1). In fact, it is well known that with the passage of time there is a decrease in the resistance to infections, and an increase in autoimmune processes and cancer, which indicates the presence of a less competent I.S. Moreover, the increased death rate found in aged populations is due in great proportion to infectious processes (9-10). In view of the key role of an optimum immune function in the preservation of health, it seems logical that one of the theories on the cause(s) of aging, namely the "immunological theory", maintains that the responsibility for the changes that take place in the organism with the passage of time lies on the impairment of the immune defense system (11,12). Nevertheless, despite the fastly-increasing amount of data on immunosenescence, the changes in the immune functions with age as well as the specific role played by the IS in organism ageing is not well understood. This may be due to the great complexity of both organismic ageing and of the aging process of the IS, with its diverse cell populations and subpopulations, and the interactions among themselves as well as with other physiological systems.

Although the immune cells change their functio-



nal competence with increasing age, not all immune cell types show a significant impairment. In fact, several cell types are more functional with age whereas other types do not show substantial age-related changes. Because of the conflicting observations, there is no general agreement on the immune response changes that occur during senescence, although most data support the view that aging is associated with a restructuration involving each component of the IS, as well as their interactions (2,9,13-15).

In order to establish the reference values, our group has performed a study on the age-related changes both in laboratory animals (mice) and in human subjects in the most representative immune cell types, i.e. the phagocytes (peritoneal macrophages from mice and neutrophils from peripheral human blood), lymphocytes (from peritoneum and the immunocompetent organs of laboratory animals and from human peripheral blood) and "natural killer" (NK) from the same locations that the lymphocytes. In these three cell types we have analyzed different functions, which are listed in Table 1. In the phagocytes, the following functions linked to the phagocytic process have been investigated: (a) Adherence to tissues. (b) Mobility to infectious focus or chemotaxis. (c) Ingestion or phagocytosis of foreign material and (d) digestion capacity of this material through the production of intracellular free radicals, namely superoxide anion. In lymphocytes the functions analyzed have been: (a) Adherence to tissues. (b) Migration ability that allows arrival to the site of antigen recognition. (c) Proliferative response to the "foreign", antigens or mitogens. (d) Production of cytokines needed to support proliferation, such as the IL-2. In the NK cells, the study has focused on its cytotoxic action against tumour cells.

It has been pointed out that human immunosenescence may differ from that of mice because of the difference in many physiological characteristics between the two species. Nevertheless, the experimental data from several laboratories, including our own, show similar age related immune changes in humans and mice, although, because of their great differences in life span, approximately 100 years for humans and 2 years for mice. The senes-

cent changes of the above mentioned functions are summarized in Table 1. It seems that some functions (like adherence) increase continuously with age, whereas other (such as lymphoproliferative response, production of IL-2 and NK) increase in the adult, with respect to the young, and decrease significantly in the aged. On the other hand there are functions, like chemotaxis and phagocytosis that decline progressively since youth to old age. This explains that for a function that follows the same kinetics that lymphoproliferation, when a comparison is performed between the values found in very young subjects (2-3 months old mice, which are usually used in immunological studies) and the values obtained in old mice (22 months of age), no significant differences are found. Likewise, the comparison of the values obtained in very young mice and those from "mature" mice (14-17 months old, which some researchers may consider old animals) could lead us to accept that this immune function increases with age. The above may explain many of the contradictory results, which as previously noted are obtained in the study of immunosenescence.

It is also very interesting that, in human subjects, the proliferative response of lymphocytes to the mitogen phytohemagglutinin, PHA (a typical mitogen for human T lymphocytes) and the production of IL-2 (two fundamental functions which are the most sensitive to the psychological and physiological factors that influence the immune system and health) shows the greatest response at the age of 30-39 years in men and at 40-49 years in women. Afterwards there is a significant decline in these functions, in both genders, until the seventies. It is worth noting that in this decade when the maximum mortality rate occurs in the developed countries (in which mean life expectancy is 72 and 78 years for men and women, respectively). Another interesting finding is that the above mentioned two functions, the lymphoproliferative response and the production of IL-2, are found at the same level in human subjects in the age range 80-104 year old than in the adult. This confirms the opinion already offered by some authors that the individuals who reach that advanced age are those endowed with a very adequate IS, and more espe-



cifically have lymphocytes T showing a very good functional competence. This may be due to the fact that these cells are better preserved, by themselves or as the result of other factors that influence their correct functioning. In any case, these results confirm that the IS is an excellent marker of health and longevity.

In short, we can conclude that with the passage of time the IS "restructures" itself, as suggested by some researchers. It is interesting that, in general, the age-related changes in the IS are expressed, on the one hand in a lower response in those aspects that could be of benefit, and on the other hand in an exaggerated response in those activities that, although initially have a defensive role, become detrimental if they are produced in excess (2,9,15). Thus, in senescence, immune functions such as adherence to tissue substrates, and production of cytokines of the proinflammatory type like TNF α , are those that show a stimulation (Table 1). The activated functions are precisely those more markedly related to an oxidative state of the subject (16,17), in agreement with the hypothesis that the aged organism is more oxidized (18), as we will discuss below.

THE IMMUNE SYSTEM AS A MARKER OF BIOLOGICAL AGE

The concept of "biological age" or "functional age" arises as a consequence of the different rate of the physiological changes in every member of a population of the same chronological age (19). This concept, first introduced by the insurance companies of the USA, is useful to assess the level of aging experienced by each individual, and therefore his life expectancy. In order to calculate the "biological age", a number of parameters should be determined. Aging is associated with a great number of changes at all levels of biological organization, influencing in different ways the diverse systems of each subject and the diverse individuals of each species. Therefore, there is a need to select a number of biochemical, physiological and psychological parameters that change with age and can be subjected to statistical analysis to reveal the relations between "biological age", chronological

age, health loss and life expectancy. The most exhaustive investigation on these subjects has been performed by Borkan and Norris (20) on about one thousand men enrolled in the study of human aging of the Gerontological Center of Baltimore. This study showed that, although it is not possible to calculate an "integrated biological age" for an individual (since each physiological system may have a particular biological age different of that of the other systems), the finding that certain parameters or biomarkers are "more aged" than those of the majority of the subjects of the same chronological age is linked to a greater probability to die prematurely. These biomarkers include those related to respiratory function, systolic arterial tension and reaction times in psychometric tests. The Baltimore study did not include the above mentioned immune parameters, which presently are considered essential and very representative of the "true" biological age of a subject. Thus, a positive relation has been shown between a good function of the T cells or the NK and longevity. Accordingly, a fact that confirms the key role of the IS on health and longevity is that the centenarians who reach that very advanced age in good health are those showing a perfect preservation of the immune cell functions, that show values like those of adult subjects (21), as already noted.

In relation to the above, our group planned several years ago to test if the above immune parameters, standardized in mice and humans, can be used as markers of biological age. This requires that the parameters show a relation with life expectancy, which could be only demonstrated in mice (because of its short life span of approximately two years). In order to carry out this project, we have relied on a model of premature aging, in the mouse, in which is quite evident the relation between the immune competence of a subject and its life span. This model, that provides another proof of the relation between the nervous and the immune system, relies on the differences in performance among mice of the same sex and chronological age when subjected to a behavioral (exploration) test in a simple T-maze. We have shown that the animals that fail the test, are "biologically older", i.e. suffer premature senescence. This concept is in



agreement with the fact that these mice have a prematurely aged IS, with the diverse functional parameters investigated (phagocytes, NK cells and lymphocytes) showing values characteristic of animals of an older chronological age. Moreover, these prematurely aging mice also showed higher levels of anxiety and emotionality and a neurochemistry similar to that of an older chronological age. The confirmation that such parameters were markers of biological age was provided by the fact that the mice showing a prematurely aged behavioral competence had a significantly decreased life span (22-28).

WHY DOES IMMUNOSENESCENCE OCCUR?

It has been demonstrated that aging is accompanied by changes in the immune function and that these changes are excellent markers of biological age and therefore of probable longevity. This justifies many studies, including our own, to identify the mechanisms responsible for the age-related immune dysfunctions. It is obvious that when these mechanisms are elucidated it will be possible to develop strategies to retard immunosenescence and thereby to preserve health and obtain a satisfactory longevity. Before reviewing the mechanisms of immunosenescence, we will summarize the main facts that underlie the aging process.

Aging is linked to a decline of the homeostasis mechanisms of the body with concomitant functional changes, which trigger diverse pathologies that are quite frequent in old age and may even cause death. Of the about 300 theories that, according to Medvedev (29) have been enunciated to explain why takes place the general deterioration of aging, that of the "free radicals", proposed by Harman in 1956 (30), and developed by him (31) and other researchers, among whom stands out Miquel (32-33), probably is the most widely accepted. According to this theory, the progressive deleterious oxidation, that is a result of the use of oxygen in respiration to support the life-maintaining metabolic processes, leads to the functional decline linked to aging. The oxygen free radicals (FR) produced in our cells are highly reactive, and therefore they injure all kind of biomolecules, i.e.: lipids, proteins and genetic materials. Since the

greatest production of FR and reactive oxygen species (ROS) takes place in the cellular organelles that carry out respiration, i.e. the mitochondria, these organelles are probably the main target of the *respiration-linked oxygen stress*. In agreement with this view, a fast-increasing amount of data shows that the mitochondrial damage caused by the FR results in a loss of bioenergetic competence that leads to the aging and death of cells and therefore of the organism (33).

In order to protect themselves against oxygen toxicity, the cells have developed a variety of antioxidant mechanisms that prevent the formation of FR or neutralize them after they are produced. However, these defensive systems are not perfect and thus when the formation of ROS exceeds the antioxidant protection there is an oxidative stress, with resulting cell injury (34).

Despite the above, we should consider that oxygen is essential for life and that ROS, in certain amounts, are needed for many physiological processes that are essential for our survival (16-18). Therefore, the functions of our organisms are based on a perfect balance between the levels of pro-oxidants (ROS) and those of antioxidants. It is the loss of this balance, because of an excess in the production of the first or an insufficient availability of the last, what leads to the oxidative stress that underlies ROS-related disease and aging (35).

Despite the yet scant work on this subject, but based on it and on the work of our laboratory, it can be maintained that immunosenescence is produced by the same mechanisms responsible for aging of all cellular components of the organism, i.e.: the oxidation resulting from the necessary use of oxygen and the damaging effects of FR in uncontrolled amounts (36).

The IS provides a good example of the need to maintain oxidation under control to preserve an adequate functional state. In order to carry out a great proportion of their functions, the immune cells must produce ROS, with the activated leucocytes being a very important source of oxidation (16-18). Moreover, it should be considered that these cells are especially vulnerable to oxidation



because of the high content of polyunsaturated fatty acids of their membranes, the key role of intracellular signalling related with these membranes and the gene expression required for their defensive function. In view of this, if it is important to preserve in any cell the mentioned antioxidant/oxidant balance, it is even more important to preserve that balance in the cells of our defensive system, since that equilibrium conditions their functional competence. The changes that occur in the function of the immune cells with aging are due in great proportion to the "chronic oxidative stress" to which they are exposed in the course of time. We have been able to confirm this in a study of the evolution experimented by the immune functions, testing them along the months of life of the mice in the hours of survival to an "acute oxidative stress" caused by a septicemia (Table 1). Thus, in animals in which an "endotoxic shock" is induced by injection of bacterial lipopolysaccharide (LPS, from *E. coli*), which show a 100% mortality in 30 hours after provoking the infection, the kinetics of the investigated function is basically the same observed in the study of aging (17). It is well known that the endotoxic shock, one of the main causes of death in the intensive care units, is the oxidative stress produced by immune cells in their attempt to protect us against infections, that leads to death of the patient. Moreover, recent studies of our group have widened this parallelism not only to the immune functions, but also to the levels of oxidant and proinflammatory compounds as well as of antioxidants in the cells of the defensive system (Table 2), which evolve in a similar fashion in the hours after LPS injection than in several months of normal aging.

INVOLVEMENT OF THE IMMUNE SYSTEM IN THE PROCESSES OF AGING: THEORY OF THE OXIDATION/INFLAMMATION

A logical question, once the role of the immune system is known, is if the age-related changes and the cause of these changes, namely a "chronic oxidative stress" are only one more of the results of the oxidative alterations that take place with the passage of time or if they can be an important cause of those changes.

We must remember that the immune cells in order to fulfill their defensive function show an inflammatory response, producing factors (such as TNF α and ROS) which support the inflammation and oxidation processes that allow the elimination of the "foreign". Since, as already pointed out, the oxidant and pro-inflammatory factors are increased with age, a new theory of aging, namely the "inflammation theory", is being developed. In fact, a transcription factor as ubiquitous as the NF- κ B, which is involved with the expression of genes of oxidant and inflammatory compounds (such as the TNF α , the enzymes of the inducible nitric oxide synthase type (iNOS, producer of nitric oxide, or the cyclooxygenase 2 (COX-2), show a great activation in the immune cells in situations of oxidative stress (16-18), as it happens in aging (37). This could lead to a "vicious circle" that would stimulate even more the oxidative stress. A personal view of the facts in support of this inflammation/oxidation theory of aging is that our IS, with the passage of time, has had to face numerous foreign agents, which has resulted in a "wear-and-tear" condition and concomitant "chronic oxidative stress", which although generally present in all cells of the organism, would be more striking in those of the IS because of their role as producers of oxidant and inflammatory factors to support their everyday work. With the passage of time, this increase in inflammatory and oxidant factors would involve all cells of the organism, with the differentiated-post-mitotic populations being the most vulnerable.

On the other hand, as a result of the oxidative injury that immune cells suffer with age, these cells would lose some of their capacity to regulate their own redox balance, which would result in the above mentioned vicious circle or, more precisely, in "a vicious spiral", since as a matter of fact the situation becomes progressively worse and there is no possibility of returning to the initial oxidative-inflammatory homeostasis. Those senescent changes of the immune cells could also become evident as an altered intracellular signalling, that makes them respond in a different way to the incoming stimuli (9). Therefore, the communication between the regulatory systems would be impaired, in agreement with a concept proposed at the begin-



ning of the past decade as one of the most logical theories of aging, according to which senescence is associated with a failure of the neuroendocrine-immune communication (38). In agreement with this theory, the experimental data confirm that with age not only there is an alteration of the responses of the nervous, the endocrine and the immune system, but also of the ability to communicate between them (39-40). Our group has confirmed that the functional impairment of immune cells with aging renders them "deaf" to the messages from the nervous system that reaches them (37-39). It seems probable that the cause of this impairment of the regulatory systems and their communication is the oxidative stress that results in the above mentioned changes and associated homeostatic failure leading to the age-related increase in morbidity and mortality.

STRATEGIES TO REVITALIZE THE IMMUNE FUNCTION IN AGING: INGESTION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS

Since there is already some understanding of the mechanisms responsible for immunosenescence, it is possible to develop procedures to modulate them in order to preserve a better immune function in the aging organism. In this respect, one of the most adequate strategies relies on the use of antioxidant compounds. Presently, there is a wealth of experimental data suggesting that indeed the administration of antioxidants, many of which also possess anti-inflammatory properties, can normalize the balance between the levels of oxidation and inflammation and those of the antioxidant defenses, thus decreasing the oxidative stress.

THE ANTIOXIDANTS IN THE AGING IMMUNE SYSTEM

The antioxidant compounds, which are able to prevent the production of ROS or to neutralize them, can be endogenous or exogenous. The first are present in our organism in order to insure the presence of the right levels of ROS compatible with adequate physiological functions, preventing both an excessive production or accumulation of

ROS and the pathological processes triggered by them (41). When there is a decrease in the levels of endogenous antioxidants, often caused because they are spent neutralizing an excess of ROS, the antioxidant defenses can be raised by administering in the diet the adequate amounts of endogenous or exogenous antioxidant compounds.

Among the exogenous antioxidants, probably the best known are the vitamins C and E and the carotenenes, although others such as the flavonoids and the lipid acid and other thiolic compounds (which raise the intracellular levels of reduced glutathione, GSH) are being incorporated to the already long list of antioxidants used in gerontological research (41).

Vitamin C or ascorbic acid and GSH, the two most important intracellular water-soluble antioxidants, which act in collaboration, are very effective against the growth of virus, and play a key role in the defense system, protecting the organism against infections, cancers and many other diseases. Vitamin E, the main antioxidant in cell membranes (to which it protects against peroxidation damage), works synergistically with ascorbic acid and GSH in the defense against virus infections and protects the circulating LDL against an excessive oxidation (42). The carotenoids also have a protective role against cancer and coronary disease. Similar functions have the flavonoids, which act inhibiting the enzymes implicated in the metabolism of arachidonic acid, thus preventing many pathological processes like cancers and vascular diseases (41). A group of compounds like taurine, thioproline and N-acetylcysteine, among others, provide GSH to our organism, showing important favorable effects on health owing to both their ability to increase the GSH levels, and to its direct antioxidant and anti-inflammatory action, which results in preservation of mitochondrial function (41) and improved cell survival. Considering that all cell functions depend to a high degree on the redox reactions of the thiol compounds, the preservation of adequate levels of GSH or of other thiols during aging is essential for an adequate activity of cells in general and especially of those of the IS, and therefore for health of the aging subjects.

In agreement with the above, the favorable action



on the aging process of antioxidants like vitamins C and E, the thiolic precursors of GSH and the flavonoids is precisely their ability to raise the reducing power, thereby protecting against the oxidative stress associated with aging. In fact it has been shown that the organelles and cells of the aged animals contain less GSH than those of the young, and this decrease becomes more striking at the age when mortality shows a marked increase. Thus the administration of antioxidants able to increase life expectancy in experimental animals may be effective because of their protective effect against oxidative stress and more specifically against the effects of this stress on the DNA of mitochondria and the GSH loss in these organelles (35). These favorable effects, at least as regards the vitamins C and E are obtained with the administration of doses much higher than those indicated in the RDA and present in the usual vitamin nutritional supplements (37).

Many research groups, including our own, have confirmed that these antioxidants are consumed to support the functions of our immune system. Therefore, in the performance of their function the immune cells may exhaust their reserves of antioxidants (43). This could explain, both in experimental animals and in human subjects, the improvement of the functional competence of the IS, in the adult age, after the *in vitro* incorporation or the supplementation *in vivo* of several exogenous antioxidants such as vitamin C, vitamin E, and thiols like thioproline or N-acetylcysteine (41-48).

If we consider that aging is associated with a production of higher amounts of ROS, often accompanied by nutritional deficiencies and significant declines in the levels of antioxidant defense (35,41), it seems evident that diet supplementation with these kind of compounds could have a favorable effect on the neutralization of oxidative stress, thus restoring the lost oxidant/antioxidant balance. This justifies the present studies to find out if the administration of antioxidants might have a stimulating effect on the functions of our defense system in old age. This line of work has provided very encouraging results (Table 1 and 2), with improvement of health conditions and prevention of many

pathological conditions linked to oxidative stress (49-52). This is agreement with the fact that one of the most convincing observations that support the oxidation theory of aging is that there is an increase in the life expectancy of some laboratory animals which consumed antioxidant-supplemented diets (28,53). Moreover the positive effects of the antioxidants is more evident in the immune cells of aged subjects than in those of the adult, with larger doses being required to observe the same favorable effect with increasing age (54). Thus, in a Spanish population the ingestion of vitamin C and vitamin E improved significantly the functional competence of immune cells in aged subjects (37,48-49). Indeed, the antioxidant supplementation brought up the levels of immune function to the values found in 30-35 years old individuals (at which age humans show the most competent IS function), with the supplementation being able to stimulate those functions which were depressed and to depress those that were overstimulated (Table 1). The regulatory action of these vitamins lasted approximately six months, with most values obtained in the aged subjects returning to the initial levels after spending that period of time without the antioxidant supplementation. The modulating action of the antioxidants on the immune functions is more striking in those subjects in which it is more impaired, as ascertained by us both in humans and in experimental animals. In elderly subjects showing depression or cardiopathy, diet supplementation with antioxidant vitamins was more effective for IS function improvement than in subjects of the same age, who, although having the impaired immune function characteristic for that age, could be considered quite healthy (49). On the other hand, the thiolic antioxidants showed a more significant favorable effect on the immune functions of mice suffering an infectious process after injection of LPS (48,55), increasing their survival, as well as in mice showing premature aging, in which the antioxidant supplementation of the diet increased their longevity (28).

Since the positive action of the antioxidants on the IS is expressed in an increase of the functions that are depressed and a decrease of those that are excessively active, the antioxidants can not be con-



sidered general immunostimulants. In fact they may bring each immune function to its optimum level in situations in which it is impaired by oxidative stress, thus acting as immunomodulators (48). This modulating ability appears to be focused at the level of the ubiquitous intracellular factors implicated in oxidation and inflammation, such as the NF- κ B (37). This regulatory role would be performed not only by the IS, but also by the other regulatory systems. As a matter of fact it is accepted that the antioxidants play a role in the recovery of a great number of nervous functions (35,41). In addition, in the prematurely aging mice the ingestion of antioxidants decreases the oxidative stress (Table 2), improves the behavioral response and increases longevity. This suggests that the oxidative stress that appears to play a fundamental role in the aging of both the IS and the nervous system, can be counteracted to certain degree by antioxidant administration and that antioxidant diet supplementation may be a useful procedure to neutralize or retard the age-related homeostatic impairment, which would provide an explanation for its favorable role in reducing the morbidity and mortality of aging populations.

CONCLUSIONS

In view of the essential role of the immune system in the preservation of health and functional longevity, it is assumed that the usefulness of diet supplementation with antioxidants for preventing pathological aging and increasing longevity may be due to the fact that this supplementation causes a "rejuvenation" of the immune function. It may be that a better immune system is the cause of a greater longevity, or on the other hand it is also possible that the better immune functions may be only a consequence of an improved general homeostasis of the organisms. In any case there is no doubt that preserving a functionally "young" immune system, despite the passing years, is an excellent strategy for preserving the quality of life.

Acknowledgements

This work has been supported in part by MCYT (BF12001-1218) and CM (08.5/0061/2001) grants. I wish to thank Dr. Miquel for his help in the preparation of this manuscript.

TABLE 1. Changes with ageing in different functions of immune cells. Effects of a diet supplemented with antioxidants



REFERENCES

1. Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS (1990) Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 45, M45-48.
2. De la Fuente M (1998) Las defensas contra la infección, inmunidad y envejecimiento. En: El problema del envejecimiento (Barja, G.ed.) Madrid AKAL. pp. 61-89.
3. Delves PJ, Roitt IM (2000) The immune system. *New England J Med* 37-49.
4. Delves PJ, Roitt IM (2000) The immune system. *New England J Med* 108-117.
5. Besedovsky H, Sorkin E (1977) Network of the immune-neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol* 27, 1-12.
6. Besedovsky H, Del Rey A (1996) Immune-neuroendocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrin Rev* 17, 64-102.
7. De la Fuente M (1999) Modulation of immune function by neuropeptides. *Current Trends Immunol* 2, 111-22.
8. Downling JEG, Mitan JA (2000) Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol Today* 21, 281-289.
9. Pawelek G, Effros C, Caruso C, Remarque E, Barnett Y, Solana R (1999) Tcells and aging. *Front Biosci* 4, 216-69.
10. Aspinall R (2000) Longevity and the immune response. *Biogerontol* 1, 273-278.
11. Makinodan T, Kay M M B (1980) Age influence on the immune system. *Adv Immunol* 29, 287-331.
12. Walford RL (1987) MHC-regulation of aging: An extension of the immunologic theory of aging. En *Modern Biological Theories of Aging*. Warner HR, Butler RN, Spratt RL, Schneider EL eds. pp 243-260. Raven Press New York.
13. Ortega E, García JJ, De la Fuente M. (2000) Ageing modulates some aspects of the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes. *Exp Physiol* 85.5, 519-525.
14. Globerson A, Effros R.B (2000) Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today* 21, 515-521.
15. Lord J M, Butcher S, Killampati V, Lascelles D, Salmon M (2001) Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Develop* 122, 1521-1535.
16. Knight JA (2000) Review: Free Radicals, Antioxidants, and Immune System. *Ann Clin Lab Sci* 30, 145-158.
17. Victor VM, De la Fuente M (2002) N-acetylcysteine improves in vitro the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radical Res* 36, 33-45.
18. Cascales M (1999) Estrés oxidativo. Envejecimiento y enfermedad. Instituto de España. Madrid.
19. Benfante R, Reed R, Brody J (1985) Biological and social predictors of health in an aging cohort. *J Chron Dis* 38, 175-181.
20. Borkan A, Norris AH (1980) Assessment of biological age using a profile of physiological parameters. *J Gerontol* 35, 177-184.
21. Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A (1995) The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today* 16, 12-16.
22. Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. (2002) Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 37, 249-256.
23. Guayerbas N, Catalan M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M (2002) Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* 134, 41-48.
24. De la Fuente M, Miñano M, Victor V M, Del Rio M, Ferrandez M D, Diez A, Miquel J (1998) Relation between exploratory activity and immune function in aged mice: a preliminary study. *Mech Ageing Dev* 102, 263-77.
25. Viveros MP, Fernandez B, Guayerbas N, De la Fuente M (2001) Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J Neuroimmunol* 114, 80-88.
26. 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.
27. De la Fuente M, Hernanz A, Medina S, Guayerbas N, Fernández B, Viveros MP (2003) Characterization of monoaminergic systems in brain regions of prematurely ageing mice. *Neurochem. Int.* 43, 165-172.
28. 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.
29. Medvedev ZA (1990) An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* 65, 375-98.
30. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300.
31. Harman D. (1986) Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging and disease processes. En *Free Radicals, Aging and degenerative diseases* (Eds JE Johnson Jr, Walford R, Harman D, Miquel J, Alan R, Liss, New York. pp:3-49
32. Miquel J (1998) An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 33, 113-26.
33. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE. (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*



- 15: 575-91.
34. Sies H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem* 25, 1058-71.
 35. Sastre J, Pallard_ FV, Garcia de la Asuncion J, Viña J (2000) Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Rad Res* 32, 189-98.
 36. Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC (1999) Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult?. *Mutat Res* 428, 17-22.
 37. De la Fuente M (2002) La nutrición y el sistema inmunitario en el envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 37, 17-25.
 38. Fabris N (1991) Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to ageing. *Arch Gerontol Geriatr* 12, 219-30.
 39. Medina S, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A, De la Fuente M (1998) Changes with age in the modulation of natural killer activity of murine leukocytes by gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystinin octapeptide. *Neuropeptides* 32, 549-55.
 40. De la Fuente M, Del Rio M, Medina M (2001) Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J Neuroimmunol* 116, 156-167.
 41. De la Fuente M (2000) Papel de los antioxidantes en la nutrición del anciano. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 35 (S4), 63-71.
 42. De la Fuente M, Carazo M, Correa R, Del Rio M (2000) Changes in macrophage and lymphocyte functions in guinea-pigs after different amounts of vitamin E ingestion. *British J Nutr* 84, 25-29.
 43. Hernanz A, Collazos M E, De la Fuente M (1990) Effect of age, culture media and lymphocyte presence in ascorbate content of peritoneal macrophages from mice and guinea pigs during phagocytosis. *Int Arch Allergy appl Immunol* 91, 166-70.
 44. Del Rio M, Ruedas G, Medina S, Victor V M, De la Fuente M (1998) Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Sci* 63, 871-81.
 45. Ferrandez MD, Correa R, Del Rio M, De la Fuente M (1999) Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 34, 675-85.
 46. Blanco B, Ferrandez MD, Correa R, Del Rio M, Guaza C, Hernanz A, De la Fuente M (1999) Changes in several functions of murine peritoneal macrophages by N-acetylcysteine and thioprolin ingestion. Comparative effect between two strains of mice. *BioFactors* 10, 179-185.
 47. Correa R, Del Rio M, De la Fuente M (1999) Improvement of murine immune functions in vitro by thioprolin. *Immunopharmacology* 44, 281-291.
 48. De la Fuente M, Victor V M (2000) Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 78, 49-54.
 49. De la Fuente M, Ferrandez MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A, Miquel J (1998) Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. *Can J Physiol Pharmacol* 76, 373-80.
 50. De la Fuente M, Ferrandez MD, Del Rio M, Burgos MS, Miquel J (1998) Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioprolin. *Mech Ageing Dev* 104, 213-25.
 51. Correa R, Blanco B, Del Rio M, Victor V, Guayerbas N, Medina S, De la Fuente M (1999) Effect of a diet supplemented with thioprolin on murine macrophage function in a model of premature ageing. *BioFactors* 10, 195-200.
 52. Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, De la Fuente M (2002) Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 797-804.
 53. Miquel J, Economos AC (1979) Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol* 14, 279-85.
 54. De la Fuente M, Miquel J, Catalan MP, Victor VM, Guayerbas N (2002) The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Rad Res* 36, 119-126.
 55. Victor VM, Guayerbas N, Garrote D, Del Rio M, De la Fuente M (1999) Modulation of murine macrophage function by N-acetylcysteine in a model of endotoxic shock. *BioFactors* 10, 347-357.

Role of Neuroimmunomodulation in Aging

Mónica De la Fuente

Department of Animal Physiology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

© S. Karger AG, Basel

**PROOF Copy
for personal
use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Key Words

Aging • Biological age • Immunosenescence • Neuroimmunomodulation • Oxidation-inflammation theory • Phagocytic cells • Antioxidants

Abstract

Aging is accompanied by an impairment of the physiological systems including the nervous, endocrine and immune systems, as well as of the nervous-immune communication. This impairment could explain the loss of homeostasis as well as the increased morbidity and mortality that appear with age. In the context of neuroimmunomodulation, it is now accepted that the age-related impairment of immune functions is the cause of the increased vulnerability to infection, cancer and autoimmune diseases of aged animals. Moreover, since the functional capacity of the immune cells has been proposed as a marker of health, our group, using mice with premature senescence, long-lived mice and human centenarians, has ascertained that several immune functions are good markers of biological age and predictors of longevity. Surprisingly, although there is presently considerable research on the changes of the immune system with age, denominated immunosenescence, the data supporting the role of this system in aging are very scarce. With aging, the immune cells show an increase in oxidant and inflammatory compounds and a decrease in antioxidant defenses, which is more evident in phagocytic cells. This chronic oxi-

dativ stress, which has among its intracellular mechanisms the activation of NF- κ B in the leukocytes, affects all cells and especially those of the regulatory systems. Thus, we have proposed a key involvement of oxidative changes of the immune system in aging. Accordingly, the administration of antioxidants improves both the nervous and immune functions, decreasing their oxidative stress, and consequently there is a significant increase in longevity.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Main Characteristics of the Aging Process and Theories of Aging

For elucidation of the role of the immune system (IS) and neuroimmunomodulation in the aging process, it is essential to understand the mechanisms of this process. Aging may be defined as a degenerative process that progressively deteriorates biological systems, with irreversible accumulation of adverse changes and increased vulnerability to disease and finally to death. Thus, although aging should not be considered a disease, it strongly increases the chances of suffering many degenerative diseases. The understanding of the aging process has been improved by the enunciation by Strehler [1] of the so-called 4 rules of aging. They state that aging is universal, progressive, intrinsic and deleterious. The concept of the universality of aging can be applied to practically all an-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2008 S. Karger AG, Basel
1021-7401/08/0155-0213\$24.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/nim

Dr. Mónica De la Fuente
Department of Animal Physiology, Faculty of Biology
Complutense University of Madrid, C/ Jose Antonio Novais 2
ES-28040 Madrid (Spain)
Tel. +34 91 394 49 86, Fax +34 91 394 49 35, E mail mondela@bio.ucm.es

imal species, including the metazoans showing sexual reproduction. Aging is a progressive process and its rate is approximately similar at different ages. Aging is an intrinsic process since, even if animals are exposed to optimal environmental conditions throughout life, they still experience the aging process at the rate characteristic for their species. Aging is obviously detrimental to the individuals since with increasing age, molecular and cellular deterioration leads to declines in maximal tissue functions, thus decreasing homeostasis and capacity to adaptively react to stress. However, at the species level, the detrimental character of aging could be argued as it is counteracted by a continuous replacement of the members of the population.

Presently, human aging is a serious problem in developed countries because the mean life span in these countries is very high (75–83 years). Since we start aging at about 18 years of age we spend most of our life aging. This aging process is finished at the end of the maximum life span, that for instance in human subjects may reach about 122 years, whereas in some laboratory mouse and rat strains it is only 3 and 4 years, respectively. Maximum longevity is the longest time that a member of a population or species can live. In addition, mean longevity is the mean length of time that the members of a population live. We can increase the mean life span by factors of life-style that contribute to maintain good health and approach maximum life span in good conditions. However, presently it is impossible to increase the maximum life span.

The key questions of gerontology are: How does aging happen? Where does aging start? Why does aging occur? A great number of theories have dealt with these questions, justifying the cynical comment that there are as many theories of aging as there are gerontologists. Indeed, more than 300 theories have been proposed to explain the process of aging [2], although it is possible to consider only 2 types of theories to which they belong. Thus, the 2 fundamental ways by which age changes can occur are (1) as the result of a purposeful program driven by the genes (as proposed by the genetic program theories) or (2) as events that are not guided by a program but are stochastic or random events (epigenetic theories). Presently, despite the claims to the contrary of many researchers, there is no conclusive evidence that genes directly drive the age changes. Therefore, it seems that the aging process, which appears after reproductive maturation, is caused by random events and is not genetically programmed [3].

According to the epigenetic theories, the basis of aging is a great number of changes that affect morphology,

physiology and behavior at all levels of organization, namely molecular, cellular, tissue, organic and that of the whole subject. Among the epigenetic theories the neuroendocrine and the immunological theories of aging stand out. The crucial role of the nervous and endocrine systems in our life is evident, and so is the unquestionable importance of the IS, but the theories focusing on these physiological systems, as they were published, do not follow the universality rule, since not all animal species have complex immune and neuroendocrine systems like mammals. Among all gerontological theories, the free radical concept proposed by Harman [4] attracts a lot of attention and is probably the most widely accepted to explain how the aging process functions. This theory, which was further developed by Miquel et al. [5–7] and others [8, 9], proposes that aging is the result of damage accumulation (by deleterious oxidation) in biomolecules, caused by the high reactivity of the free radicals and reactive oxygen species (ROS) produced in our cells as a result of the use of oxygen. Since oxygen is mainly used in cell respiration to support the life-maintaining metabolic processes, the mitochondria, and more concretely their DNA (mtDNA), are probably the first targets of this oxidation. As first pointed out by Miquel et al. [5–7], it is in the postmitotic cells that cannot fully regenerate those organelles where the aging process starts. Moreover, it is worth noting that the rate of mitochondrial oxygen radical generation, as well as the degree of membrane fatty acid unsaturation and oxidative damage to mtDNA are lower in long-living than in short-living species [10]. In essence, the mitochondrial damage caused by free radicals results in a loss of bioenergetic competence that leads to aging and death of cells and therefore of the organism [6, 7]. The cells, in order to protect themselves against oxygen toxicity, have developed a variety of antioxidant mechanisms that prevent the formation of ROS or neutralize them after they are produced. However, these defensive systems are not perfect, and thus when the formation of ROS exceeds the antioxidant protection, there is an oxidative stress with resulting cell injury [11]. Despite the above, we should consider that oxygen is essential for aerobic life and that ROS, at certain levels, are needed for many life-supporting physiological processes [12]. Therefore, an optimal function of the organism is based on a perfect balance between the levels of ROS and those of antioxidants. It is the loss of this balance, resulting from irreversible cell differentiation, with impaired mitochondrial regeneration through normal organelle turnover, that is the most probable mechanism of aging. This concept that highlights the genetic damage of mitochondria as the first-

step target of the ROS attack, has been presented as the missing link that justifies the proposal of a theory that integrates early concepts which offer a partial explanation of the mechanism of aging [13–15].

We feel that the reviewed theoretical concepts and experimental data provide answers to the above-mentioned key questions. Thus, it seems that the ‘how’ of aging is related to uncontrolled oxidative processes, the ‘where’, at least its beginning, is probably linked to mtDNA damage and ‘why’ organisms age is satisfactorily explained by the species evolution theories of aging. Thus, we agree with the concept of Williams [16] that senescence is the result of genes that program maximal vigor at the age of reproduction, but with the passage of time trigger cellular and organ degeneration. The resulting loss of bioenergetic competence and physiological performance is involved in the senescence and death of the members of the metazoan species, the genes of which, housed in a series of ‘disposable somas’ [17], have an unlimited survival in their normal habitat thanks to sexual reproduction.

Biological Age

The aging process is very heterogeneous. Thus, it is well known that the molecular and cellular disorganization as well as the decrease in physiological performance associated with aging do not proceed at the same rate in all members of a population of the same chronological age. This justifies the introduction of the concept of ‘biological age’ or ‘functional age’. This concept, first introduced by insurance companies and experts in aviation medicine of the USA, is useful to assess the level of aging experienced by each subject and therefore his life expectancy. In order to determine the biological age, a number of parameters should be determined. Aging is associated with a great number of changes at all levels of biological organization, influencing in different ways the several physiological systems of the members of different species as well as of the diverse individuals of each species. Therefore, it is convenient to select a number of biochemical, physiological and psychological parameters that change with age and can be useful as biomarkers of aging, revealing the level of senescence suffered by the physiological systems of a particular subject and therefore the relations between biological age, chronological age, health loss and life expectancy.

The most complete investigation on biological age was performed by Borkan and Norris [18] on over 1,000 men in the longitudinal study on human aging of the Geron-

tological Center of Baltimore. The retrospective analysis of this study showed that subjects presenting certain parameters that were ‘more aged’ than those found in the majority of subjects of the same chronological age had a shorter life expectancy. These biomarkers include those related to respiratory function, systolic arterial tension and reaction times determined by psychometric tests. Most research on biological age, such as the Baltimore study, did not include immune parameters, which presently are considered essential and very representative of the true biological age of a subject. Thus, a positive relation between a good function of the T cells, the natural killer (NK) cells and phagocytic cells and longevity has been shown [19–24].

Immunosenescence

As mentioned above, aging is accompanied by a decline of the physiological systems including the immune functions. In fact, it is well known that with the passage of time there is a decrease in resistance to infections as well as an increase in autoimmune processes and cancer, which indicates the presence of a less competent IS. Moreover, the increased death rate found in aged populations is due in great proportion to infectious processes [25]. The impairment of the IS with age, that is, immunosenescence, exerts a great influence on the increasing morbidity and mortality observed in aging human subjects [26]. In view of the key role of an optimal immune function in the preservation of health, it seems logical that one of the theories on the cause(s) of aging, namely the immunological theory, maintains that the responsibility for the changes that take place in the organism with the passage of time lies in the impairment of the IS [27]. Nevertheless, despite the fast-increasing amount of data on immunosenescence [28, 29], the changes in the immune functions with age and particularly the specific role played by the IS in aging of the organisms are not wholly understood.

The immune cells change their functional competence with aging, but not all immune cell types or all functions of an immune cell show a significant impairment. In fact, several cell types and functions of a cell are more activated with age, whereas others do not show significant age-related changes. Presently, although there are conflicting observations on this subject, it is accepted that almost every component of the IS undergoes striking age-associated restructuring, leading to changes that may include enhanced as well as diminished functions, involving each component of the IS, as well as their interactions [24, 28–

30]. Thus, although the most pronounced decrease with age has been found in the specific T cell functions [28] and the age-related alterations of phagocyte cell functions have been less studied and the results obtained are often contradictory [31, 32], these cells also show a significant decrease in several of their functions [23, 24].

The Psychoneuroendocrine-Immune Network and the Loss of Homeostasis in Aging

We know that there is a neuroendocrine-immune system that allows the preservation of homeostasis and therefore of health [33, 34]. With age, all regulatory systems involved in homeostasis, that is, the nervous system, the endocrine system and the IS, as well as the communication between them, show an impairment [35]. This important observation justified the proposal of another theory of aging, according to which the changes in this communication between the IS and the nervous system (and concomitant loss of homeostasis and resistance to stress) is the probable cause of physiological senescence [36]. Recent studies of our group support this hypothesis [37, 38] as well as the idea that the impairment of the IS with aging could affect the functions of the other regulatory systems through increased oxidative stress, resulting in age-related homeostasis alteration and increase in morbidity as well as mortality [30].

In relation with the above, an inadequate response to stress is one of the conditions leading to an acceleration of aging accompanied by poor health of the IS and other physiological systems [39]. Thus, our group has shown recently that mice exposed to the stressful condition of isolation have behavioral responses that reveal an impairment of cognition, a certain degree of depression and a more evident immunosenescence than control animals of the same age housed in groups [unpubl. data]. Likewise, human subjects suffering chronic anxiety [40] or depression show a significant premature immunosenescence. It is known that changes in the density of innervation as well as in the neurotransmitter content of lymphoid tissues occur with aging. Thus, the sympathetic innervation as well as the concentration of norepinephrine decrease in spleen and lymph nodes with age, while as a compensatory mechanism the expression of β -adrenergic receptors on the immune cells increases with age. It is difficult to determine whether with aging neural changes induce immunological changes, whether an altered IS induces nervous changes or whether both processes occur simultaneously, which is the most likely mechanism according to some authors

[35]. In addition, we have observed that the in vitro response of immune cells to a wide range of neurotransmitter concentrations changes with the age of the subject [37], which demonstrates that although the levels of neurotransmitters that contact with the immune cells are maintained with age, the response of the cells of the IS to them would be different.

The IS as a Marker of Biological Age and Predictor of Longevity: Research on a Model of Premature Aging in Mice, in Very Long-Living Mice and in Human Centenarians

It has been demonstrated that the competence of the IS is an excellent marker of health [26] and several age changes in immune functions have been related to longevity [19–24]. Based on the above, our group decided to assess if some immune functions could be useful as markers of biological age or as biomarkers and therefore as predictors of longevity. We felt that this project was worthwhile, since biological age is a more adequate parameter than chronological age to measure the rate of aging of a subject, although very seldom the proposed batteries of biomarkers have included immune functions.

Among all functions of immune cells, we have focused on those listed in table 1. In lymphocytes, we focused on their ability to adhere to the vascular endothelia, migrate towards the site of antigen recognition (chemotaxis), proliferate in response to mitogens and release cytokines such as IL-2. In phagocytes, we concentrated on the process of adherence to tissues, chemotaxis, ingestion or phagocytosis of foreign particles and destruction of pathogens by means of the intracellular production of free radicals such as the superoxide anion and other ROS located in the phagosome of these cells. In this process of phagocytosis, free radicals can be released to the extracellular space with concomitant damage to the structure of phagocytes and neighboring tissues. Further, in the NK cells we have analyzed their capacity to destroy tumoral cells of the same animal species investigated. The same parameters have been determined in the various decades of life of human subjects from the adult age of 20 until 80, in leukocytes of peripheral blood, and throughout the life of mice in their peritoneal leukocytes. This type of longitudinal studies, which despite their high cost can be carried out on mice (that have a mean life span of 2 years), is almost impossible to perform on human subjects. Surprisingly, our results have shown that in the members of both species similar age-related changes of

the above-mentioned immune parameters take place. Thus, with aging, there is a decrease in the functions that are more beneficial, such as the lymphoproliferative response or the NK activity that protect us against tumoral cells. There is also a decline in IL-2, that regulates the two mentioned functions, as well as the chemotaxis, phagocytosis and adequate levels of ROS in the phagosomes. On the other hand, there is an increase in the functions that could become noxious, if active in excess, such as those promoting adherence of immune cells to tissue, maybe preventing their arrival to the site where they have to perform their organism-protecting task. Furthermore, there is an increase with age in other potentially harmful immune functions that will be dealt with below, such as the extracellular release of the superoxide anion and pro-inflammatory cytokines like TNF- α (table 1) [24, 30].

Obviously, in order to identify the above parameters as markers of biological age and predictors of longevity, we need to demonstrate that the values they show in a particular subject reveal their real health and senescent conditions. This has been achieved in the following two ways: (1) ascertaining that the individuals with an IS older than that of most subjects of the same population, sex and chronological age died before their counterparts with a less impaired (younger) immune function and (2) confirming that the subjects reaching a very advanced age preserve the immune functions at levels similar to those of the adults.

Further support for the key role of immunocompetence on the rate of aging, biological age and longevity has been gained by our group in a model of premature senescence in mice. Thus, in mice showing premature aging we have observed that the above-mentioned immune functions performed at the levels characteristic of older mice. In fact, the animals that we have denominated PAM (prematurely aging mice), in contrast to the NPAM (non-prematurely aging mice) of the same population, sex and chronological age, are identified by its poor response in a simple T maze exploration test. This provides strong support for the concept that the nervous system and the IS are closely linked. In addition to a more significant immunosenescence, the PAM showed high levels of anxiety and a brain neurochemistry characteristic of older animals. Nevertheless, the most convincing evidence that the above-mentioned parameters are useful markers of biological age is that the PAM showed a shorter life span than their counterpart NPAM of the same age, sex and chronological age (table 1) [21–23, 41].

An additional way to confirm the key role of the IS in health and longevity is the finding that human subjects

Table 1. Changes in immune functions and oxidative stress parameters in peritoneal leukocytes from old mice versus adults and PAM versus NPAM; effects of a diet supplemented with antioxidants in old mice and in PAM

	Old mice and PAM	Antioxidant supplementation
<i>Immune functions</i>		
Adherence of macrophages and lymphocytes	increase	decrease
Mobility of macrophages and lymphocytes	decrease	increase
Phagocytosis capacity of macrophages	decrease	increase
Intracellular superoxide anion and ROS	decrease	increase
Lymphoproliferative response to mitogens	decrease	increase
NK cell activity	decrease	increase
IL-2 release	decrease	increase
<i>Oxidant and pro-inflammatory compounds</i>		
Extracellular superoxide anion	increase	decrease
Oxidized glutathione	increase	decrease
Oxidized glutathione/GSH	increase	decrease
TNF- α	increase	decrease
PGE2	increase	decrease
Nitric oxide	increase	decrease
<i>Antioxidant defenses</i>		
GSH	decrease	increase
Superoxide dismutase	decrease	increase
Catalase	decrease	increase
Glutathione peroxidase	decrease	increase
Glutathione reductase	decrease	increase
<i>Oxidative damage</i>		
Malondialdehyde	increase	decrease
8oxo-7,8dihydro-2deoxiguanosine	increase	decrease

who reach a very advanced age show a satisfactory immunocompetence, at a level similar to that of the adults. Accordingly, our group has ascertained that in healthy centenarians the immune functions summarized above perform as well as in young adults (30 years old) and much better than in 70-year-old human subjects [unpubl. data]. A similar finding of ‘youthful’ conditions has been obtained on peritoneal immune cells of very long-living mice [38, unpubl. data].

All the above results confirm that the IS is a good marker of biological age and predictor of longevity.

Why Does Immunosenescence Occur? The Role of Oxidative Stress

If, as is generally accepted, the mechanisms that underlie aging must be of general application, it seems logical to accept that the cause of immunosenescence is the

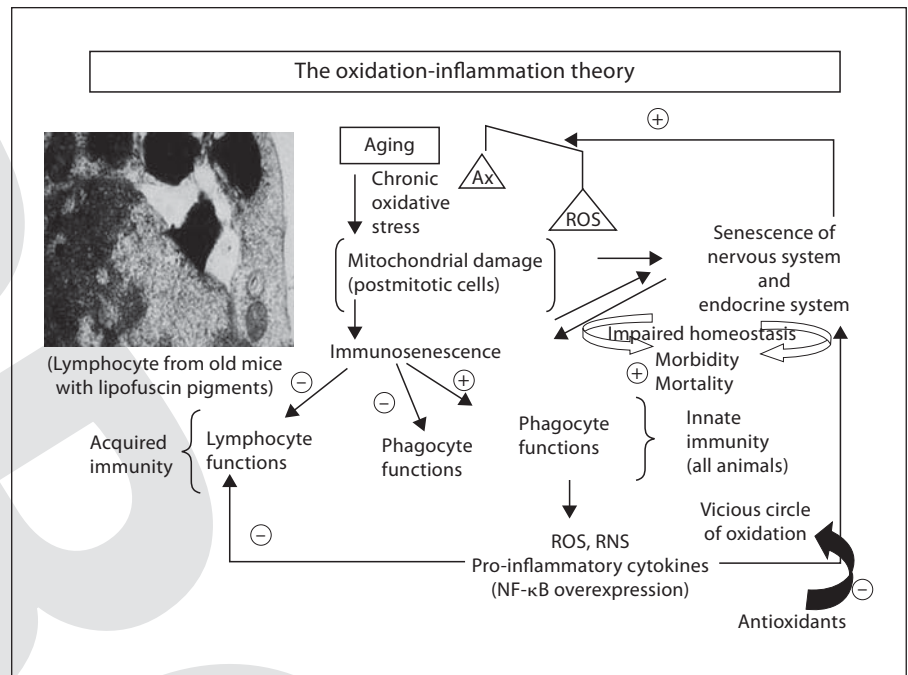


Fig. 1. A more developed scheme of the oxidation-inflammation theory than that published previously [30]. Aging is a chronic oxidative stress condition (presence of more oxidant than antioxidant compounds) affecting all cells, especially those of the regulatory systems, that is, the nervous system, the endocrine system and the IS, and therefore the communication among them. This explains the impaired homeostasis and the increase in morbidity and mortality found in old age. According to the oxidative mitochondrial theory of aging, the cells of the nervous system, which are postmitotic, are the first to suffer damage with age. In animals with a complex IS, the T lymphocytes, and especially the memory T cells (most T cells in aged subjects and besides the most postmitotic cells of the IS), suffer the effects of the oxidative stress of aging. In the age-associated restructuring of the immune cells or immunosenescence, there is a decrease in several lymphocyte and phagocyte functions (more related to the acquired immunity), but an increase in other functions, specially those carried out by

phagocytic cells generating continuously oxidative and inflammatory compounds (cells and functions) responsible for the innate immunity and present in all animals). These compounds, produced in order to eliminate foreign agents, could activate the transcription factor NF- κ B, which after reaching a certain level of activation stimulates the expression of genes programming the production of higher amounts of those compounds. If this fact is not well regulated, a vicious circle of oxidation-inflammation could be established, which would increase the oxidative stress and consequently accelerate aging. Thus, we could conclude that in all animal species, the immune cells modulate the rate of aging of each subject. In agreement with this concept, the administration of antioxidants has been shown to break the above-mentioned vicious circle, improving both the nervous and immune functions, decreasing their oxidative stress, and consequently improving homeostasis and increasing longevity.

same responsible for the senescence of the other cells of the organism, namely the oxidative disorganization linked to the unavoidable use of oxygen to support cellular functions. Further, we should remember that the immune cells need to produce free radicals and other oxidant and inflammatory compounds in order to perform some of their defensive functions, and this, together with their membrane characteristics, makes them very vulnerable to oxidative damage [12, 24, 30]. Therefore, if any cell needs to maintain a balance between the production of oxidants and the antioxidant defense in order to prevent an excess of the first and the resulting oxidative

stress, this balance is even more essential to preserve the functional capacity of leukocytes and, consequently, the health of the organism.

Based on the above, our group decided to investigate the age-related changes in the redox state of immune cells. Thus, we have analyzed in peritoneal immune cells of mice a variety of oxidant and inflammatory compounds (extracellular superoxide anion oxidized glutathione, TNF- α , PGE2) and antioxidant protectors, namely reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase and catalase, as well as oxidative damage to biomolecules such as

lipids and DNA (table 1). Our results indicate that aging leukocytes suffer oxidative stress, resulting in higher levels of the parameters of oxidation and inflammation, decreased antioxidant defense and increased oxidative damage to lipids and DNA (table 1) [30]. Increased oxidative stress has also been found in the immune cells of PAM with respect to those of NPAM, and in the leukocytes of male mice with respect to those of female mice [41]. Further, very long-living mice and human centenarians show a redox condition in their immune cells similar to that of healthy adult subjects [unpubl. data].

Role of the IS and Neuroimmunomodulation in the Aging Process: A Hypothesis and Several Examples Supporting this Role

On the basis of the above results showing an age-related increase in oxidant and pro-inflammatory compounds, we have proposed a new theory of aging, the oxidation-inflammation theory in which the IS would play a key role in aging [30]. Although all cells of the organism are exposed to chronic oxidative stress with aging, those of the regulatory systems, that is, the nervous system, endocrine system and IS, would show the greatest oxidative damage and, being unable to preserve their redox balance, would suffer functional losses incompatible with an adequate preservation of homeostasis, with a resulting increase in morbidity and mortality like that found in old age. In addition, our IS, because of its need to continuously generate oxidative and inflammatory compounds, could activate the transcription factor NF- κ B, which after reaching a certain level of activation stimulates the expression of genes programming the production of higher amounts of those compounds. In fact, recent research from our group has shown that NF- κ B is quite active in the leukocytes of aged subjects in contrast to its lack of activation in the adults and individuals with great longevity. Further, the level of activation of this factor in leukocytes is significantly related to the life expectancy of the subject from which the cells were obtained [unpubl. data]. Thus, it is likely that if the production of oxidative and inflammatory compounds is not well controlled, the organism may enter a vicious circle in which the great amount of oxidant and inflammatory compounds produced by the IS would activate even more the further production of the same noxious compounds by factors such as the above-mentioned NF- κ B. If this harmful circle is not well controlled, the IS-noxious compounds would not only disorganize the im-

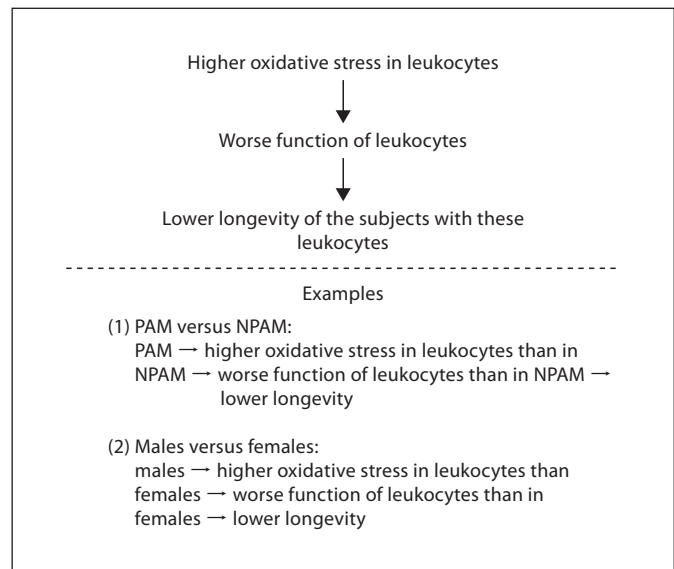


Fig. 2. Relation of the oxidative state of leukocytes, their function and the longevity of the subjects.

mune cells with the passage of time, but also all other cells of the organism, especially the nervous cells, as a consequence of the immune-nervous communication, thus contributing to maintain its chronic oxidative stress (fig. 1) [30]. In view of all the above, it seems evident that the IS can play a role in the uncontrolled oxidation process linked to aging. In fact, as we have already noted, the human centenarians and the laboratory mice with a high mean life expectancy are those that better maintain the redox state of their immune cells and therefore their immune functions [38, unpubl. data]. Interestingly, in our mouse model of premature aging, the PAM, with a shorter life span than the NPAM, show a greater oxidative stress not only in their IS, but also in the brain, liver, heart and kidney [41]. Moreover, in the mammalian species, the females, that have better immune functions than the males [42], also have a longer mean life span owing to the effects of the estrogens that allow them to live in a less oxidized condition [43], as reflected in the better redox state of their leukocytes [unpubl. data]. Thus, there is a relation between the redox state of the immune cells, their functional capacity and the life span of the subject (fig. 2).

It is well known that from the moment we are born, our IS has to face a great variety of foreign agents and, in order to protect the organism against them, needs to release toxic oxidant and inflammatory compounds. An

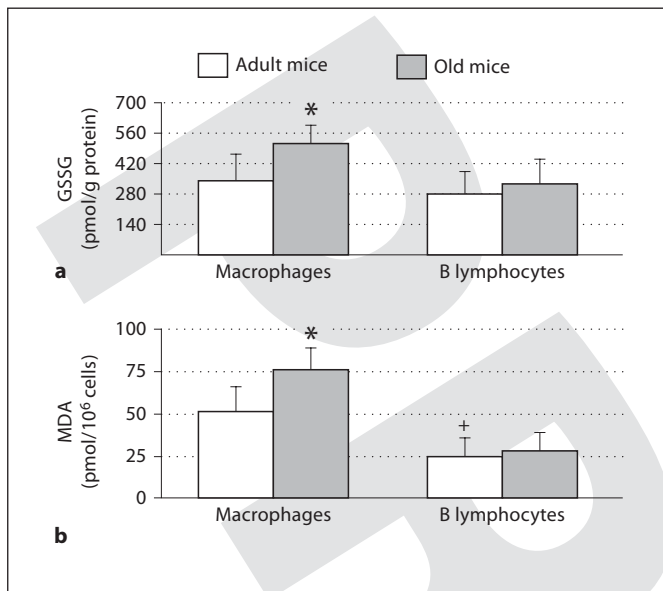


Fig. 3. Levels of oxidized glutathione (GSSG; **a**) and malondialdehyde (MDA; **b**) in isolated macrophages and B lymphocytes of peritoneal suspensions from adult and old mice. * $p < 0.05$ with respect to the corresponding values in adult animals; ⁺ $p < 0.05$ with respect to the corresponding values in macrophages.

adequate production of these noxious products is needed to increase the probability that a subject survives to reach the age of reproduction, which is essential for survival of the species. Obviously, the IS has not been designed by evolution to preserve their defensive functions in subjects that show exceptionally long life spans. This may be quite evident in the members of the human species living in developed countries which show considerable increases in their mean life span. This evolution-related view of immunosenescence [44] could explain why the acquired immunocompetence, which is more specialized and obtained more recently in evolution, is most impaired with age, whereas the innate immune response, older and less specific, is better preserved and may be even stimulated in excess in aging organisms (fig. 1) [45]. As it happens with oxygen use, which allows a very active life-style but has as its side effect the production of noxious ROS, a very active IS is designed to provide protection against the risk of contracting infections and tumors to which we are chronically exposed. However, this has a price, that is, if the oxygen-supported functions and resulting stress are not well controlled or the aging organism lacks a satisfactory individual adaptation to this stress, the senescent process accelerates.

Based on the above, 'the immune theory of ageing' as originally proposed [27], cannot be accepted, since this theory suggested as the cause of organism senescence the impairment of the IS, a concept that does not follow the principle of universality of Strehler [1]. We should keep in mind that not all animal species have an IS as complex as that of the mammals. Nevertheless, it seems evident, based on the above information, that the leukocytes play a fundamental role in aging. Confirmation of this concept could be found in the fact that the immune cells producing oxidant and inflammatory compounds in the highest amounts are those responsible for the innate immunity, especially the phagocytic cells which are found in all animals, including the invertebrates which lack an acquired immunity based on the presence and function of lymphocytes (fig. 1). In agreement with the above, we have observed (fig. 3) that in the peritoneal immune cell population of mice the macrophages are the immune cells responsible for the generation of the higher levels of oxidant compounds (malondialdehyde and oxidized glutathione levels are shown in fig. 3) than that caused by lymphocytes, and these levels significantly increase with age in those phagocytic cells. Thus, it is probable that the macrophages, which, as already pointed out, are found in all animals, are implicated in the chronic oxidative stress of senescence due to their high age-related increase in the production of ROS and inflammatory cytokines (table 1; fig. 1) [30, 32, 46]. Thus, we could conclude that in all animal species the immune cells modulate the rate of aging of each subject.

Compatibility and Integration of the Oxidative-Mitochondrial and the Oxidation-Inflammation Theories of Aging

In view of the convenience of attempts to integrate compatible and complementary concepts on the mechanisms of aging at the various levels of biological organization [2, 6, 47], it seems opportune to consider if the above summarized oxidation-inflammation theory is compatible with the concept of the oxygen stress-mitochondrial genetic injury (or oxidative-mitochondrial theory) proposed by Miquel's group [5–7, 13–14] and updated in a recent revision by Viña et al. [15]. In agreement with the above, it is logical to accept that the oxygen stress due to the generation of ROS in immune cells in order to support their functions (especially the ROS produced in the cytoplasmic membranes of phagocytes) is involved in the senescent dysfunction of these cells. In addition, the oxi-

ductive stress linked to the production of ATP in mitochondria may contribute to the senescent involution of at least one type of immune cells, namely the T lymphocytes, especially the memory T cells that can survive for a long time in the postmitotic condition like the fixed postmitotic cells of the nervous and endocrine systems, which are affected by mitochondrial damage. Moreover, an increase in memory T cells and a decrease in the relative proportion of naïve T cells occur with advancing age. In addition, it is interesting to remember that the secretions of the cells of those systems, that is, neurotransmitters and hormones, modulate the immune functions and this modulation changes with age [35].

In agreement with the above, an electron-microscopic study by our group has shown that the lymphocytes from aged mice accumulate abundant granules of lipofuscin (fig. 1), a pigment that is the end product of the oxidative disorganization and autodigestion of mitochondria [48]. Therefore, we can conclude that the oxidation-inflammation and the oxidative-mitochondrial theories can be integrated in order to gain a better understanding of the subcellular and cellular mechanisms of senescence of the IS, which, like other physiological systems, relies on a symbiosis of often-dividing and fixed postmitotic cells. In our opinion, this new integration of two theories may allow a better understanding of the key role played by the two above-mentioned kinds of oxygen stress (of cytoplasmic membrane or mitochondrial origin) in the aging of both the neuroimmune-endocrine network and the organism (fig. 1).

Strategies to Revitalize the Immune Function and the Neural-Immune Interaction in Aging: Confirmation of the Oxidation-Inflammation Theory

The above theory can be supported by research showing that a regulation of the IS and of the nervous system by strategies of life-style allowing to break the vicious circle of oxidation-inflammation injury could result in increased longevity.

The ingestion of a diet enriched with antioxidants seems adequate for maintaining an optimum redox balance and therefore protecting the aging organism against oxygen stress. Thus, in both laboratory animals and human subjects, the administration of compounds such as vitamins C and E, polyphenols and thiolic antioxidants such as taurine, thioproline and N-acetylcysteine, which are precursors of GSH, either in isolation or in nutritional formulations containing several compounds, may be

recommended because of their antioxidant and anti-inflammatory action. In fact, those antioxidants show important favorable effects on health, acting on the nervous system and the IS [49–52]. In addition, in the performance of their function, the leukocytes may exhaust their reserves of antioxidants [53]. This could help to explain why in both laboratory animals and human subjects the homeostasis-linked functional competence of the IS in the adult age improves after diet supplementation with appropriate amounts of antioxidants such as vitamins C and E, thiol antioxidants and polyphenols [54, 55]. Moreover, our research has shown that in elderly men and women, in chronologically old control mice and in PAM, the above antioxidant compounds exert a favorable effect, improving the functional capacity of the IS as well as neutralizing the redox state, leaving them at levels similar to those of human adults and nonprematurely aging healthy adult mice (table 1) [24, 30, 41, 50–52, 56]. In fact, our group has observed that the lymphocytes from old mice after ingestion of a diet supplemented with thiol antioxidants did not show the lipofuscin pigments present in control animals.

Since the favorable action of the antioxidants on the IS is expressed in an increase in the functions that are depressed and a decrease in those that are excessively active, the antioxidants cannot be considered general immunostimulants. In fact they may bring each immune function and redox state to its optimum, thus acting as immunomodulators [57]. This modulating ability appears to be focused at the level of the ubiquitous intracellular factors implicated in oxidation and inflammation, such as NF- κ B [58]. This regulatory role of the antioxidants would be performed not only in the IS, but also in the other regulatory systems, including the nervous system, in which the oxidative stress also underlies its senescent impairment. Thus, as a matter of fact, it is accepted that the antioxidants play a role in the recovery of a great number of nervous functions [9]. Moreover, in the PAM, the ingestion of thiolic antioxidants not only improves the immune function, but also the behavioral response [41, 59]. Moreover, interestingly, this immune rejuvenation as well as the improvement of the nervous system are apparent in the laboratory mice showing the greatest longevity [30]. A possible explanation is that since all cell functions depend to a high degree on the redox reactions of the thiol compounds, the preservation of adequate levels of GSH or of other thiolic compounds during aging is essential for an adequate activity of cells in general and especially for those of the nervous system and the IS, and therefore for the health of the aging subjects. In fact, it has been

shown that the organelles and cells of the aged animals contain less GSH than those of the young, and this decrease becomes more striking at the age when mortality shows a marked increase. Thus, the administration of GSH, because of its protective effect against the oxidative stress of the mtDNA and GSH loss in these organelles with age, is able to increase life expectancy in laboratory animals [60].

This suggests that the oxidative stress that appears to play a fundamental role in the aging of both the IS and the nervous system, can be counteracted to a certain degree by antioxidant administration and that antioxidant diet supplementation may be a useful procedure to neutralize or retard the age-related homeostatic impairment (fig. 1). In view of the above it seems reasonable to propose that the administration of antioxidant compounds, in adequate amounts, may be effective to neutralize or slow down the loss of homeostasis that occurs with age.

Concluding Remarks

The IS in the context of neuroimmune communication plays a key role in the preservation of health and longevity of animals and human subjects and, if its regula-

tion is impaired, contributes to the chronic oxidative stress that underlies aging. An adequate regulation of this system, by administration of the appropriate amounts of antioxidants, can, through a better neuroimmunomodulation, improve the redox condition of the cells of the involved systems and therefore organism homeostasis, resulting in a decrease in morbidity and mortality. No matter if the responsibility lies on the improved functions of the IS and/or the organism in general, and especially of the nervous and endocrine systems, it is evident that the preservation of a functionally youthful IS throughout the years is the best way to gain longevity accompanied by good quality of life.

Acknowledgments

The author thanks Dr. Miquel for his assistance in the writing of the manuscript as well as his expert comments on some aspects of this review. The author would also like to express her gratitude to Dr. Medina, Dr. Victor, Dr. Vallejo, Dr. Guayerbas, Dr. Puerto, Alvarado, Dr. Alvarez, Dr. Alonso, Ms. Arranz and Ms. Baeza for their invaluable help in performing the experiments which have allowed the author to arrive at the ideas expressed in this article.

This work was supported by grants of the Ministerio de Educación y Ciencia, MEC (BFU 2005-06777) and RETICEF (RD06/0013/0003) (ISCIII)

References

- 1 Strehler BL: Time, Cells and Aging. New York, Academic Press, 1977.
- 2 Medvedev ZA: An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* 1990; 65:375–398.
- 3 Hayflic L: Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1100:1–13.
- 4 Harman D: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;2:298–300.
- 5 Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr: Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980;15:575–591.
- 6 Miquel J, Economos AC, Johnson JE Jr: A systems analysis-thermodynamic view of cellular and organismic aging; in Johnson JE Jr (ed): *Aging and Cell Structure*, vol 2. New York, Plenum Press, 1984, pp 247–280.
- 7 Miquel J, Fleming JE: Theoretical and experimental support for an oxygen radical-mitochondrial damage hypothesis of cell aging; in Johnson JE Jr, Harman D, Walford R, Miquel J (eds): *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*. New York, Alan R Liss, 1986, pp 51–74.
- 8 Barja G: Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 2004;27:595–600.
- 9 Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Viña J: Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Rad Res* 2000;32:189–198.
- 10 Pamplona R, Barja G: 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*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2003, pp 47–64.
- 11 Sies H: Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem* 1986;25:1058–1071.
- 12 Knight JA: Free radicals, antioxidants, and immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30: 145–158.
- 13 Miquel J: An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr* 1991;12:99–117.
- 14 Miquel J: An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 1998;33:113–125.
- 15 Viña J, Borrás C, Miquel J: Critical review: theories of aging. *IUBMB Life* 2007;59:249–254.
- 16 Williams GC: Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 1957;2:397–411.
- 17 Kirkwood TBL, Holliday R: The evolution of aging and longevity. *Proc R Soc London* 1979;205:531–546.
- 18 Borkan A, Norris AH: Assessment of biological age using a profile of physical parameters. *J Gerontol* 1980;35:177–184.
- 19 Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B: Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995;50:B378–B382.
- 20 Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, et al: Natural killer cells in the later decades of human life. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84:269–275.
- 21 Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M: Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002;37: 249–256.

- 22 Guayerbas N, Catalan M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M: Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* 2002;134:41–48.
- 23 Guayerbas N, De La Fuente M: An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol* 2003;27:339–350.
- 24 De la Fuente M: Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:S5–S8.
- 25 High KP: Infection as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing Res Rev* 2004;3:1–14.
- 26 Wayne SL, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS: Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 1990;45:M45–M48.
- 27 Walford L: *The Immunologic Theory of Aging*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1969, pp 70–75.
- 28 Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fulop T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R: T cells and aging. *Front Biosci* 2002;7:d1056–d1183.
- 29 Aw D, Silva AB, Palmer DB: Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* 2007;120:435–446.
- 30 De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo, MC: The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension: favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1356–1366.
- 31 Ortega E, García JJ, De la Fuente M: Ageing modulates some aspects on the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes. *Exp Physiol* 2000;85:519–525.
- 32 Sebastian C, Espia M, Serra M, Celada A, Lloberas J: MacrophAging: a cellular and molecular review. *Immunobiol* 2005;210:121–126.
- 33 Besedovsky HO, Del Rey A: Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun* 2007;21:34–44.
- 34 Wrona D: Neural-immune interactions: an integrative view of bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* 2006;172:38–58.
- 35 Bellinger DL, Madden KS, Lorton D, Thyagarajan S, Felten DL: Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in immunosenescence; in Ader R, Felten DL, Cohen N (eds): *Psychoneuroimmunology*. San Diego, Academic Press, 2001, pp 241–286.
- 36 Fabris N: A neuroendocrine-immune theory of aging. *Int J Neurosci* 1990;51:373–375.
- 37 De la Fuente M, Medina S: NPY and phagocytic cell functions; in Zukowska Z, Feuerstein GZ (eds): *The NPY Family of Peptides in Immune Disorders, Inflammation, Angiogenesis and Cancer*. Basel, Birkhäuser Verlag, 2005, pp 107–122.
- 38 Puerto M, Guayerbas N, Alvarez, P, De la Fuente M: Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol* 2005;165:33–40.
- 39 McEwen BS: Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci* 2006;8:367–381.
- 40 Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M: Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res* 2007;62:1–8.
- 41 Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M: A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:157–162.
- 42 De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, F-Tresguerres JA: Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontol* 2004;5:389–400.
- 43 Viña J, Sastre J, Pallardo FV, Gambini J, Borras C: Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders: protective effect of estrogens. *Free Radic Res* 2006;40:1359–1365.
- 44 Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, Barbi C, Bonafe M: Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp Gerontol* 1999;34:911–921.
- 45 Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T: Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev* 2008;7:83–105.
- 46 De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, Alvarado C: Changes with age in peritoneal macrophage functions: implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol* 2004;50:OL683–OL690.
- 47 Vijg J, Müller WEG: The science of aging and the need for a mechanistic approach. *Mech Ageing Dev* 2000;114:1–3.
- 48 Miquel J, Lundgren PR, Johnson JE: Spectrophotometric and electron microscopic study of lipofuscin accumulation in the testis of aging mice. *J Gerontol* 1978;33:5–19.
- 49 Miquel J: Can antioxidant diet supplementation protect against age-related mitochondrial damage? *Ann NY Acad Sci* 2002;959:508–516.
- 50 Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausserés N, Jimenez L, De la Fuente M: Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* 2006;22:767–777.
- 51 Alvarez P, Alvarado C, Puerto M, Schlumberger A, Jimenez L, De la Fuente M: Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals. *Nutrition* 2006;22:913–921.
- 52 De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F: Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic Res* 2008;42:272–280.
- 53 Hernanz A, Collazos ME, De la Fuente M: Effect of age, culture media and lymphocyte presence in ascorbate content of peritoneal macrophages from mice and guinea pigs during phagocytosis. *Int Arch Allergy Appl Immun* 1990;91:166–170.
- 54 De la Fuente M, Guayerbas N, Catalán MP, Victor VM, Miquel J: The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve the immunefunctions is higher in aged than in adult mice. *Free Radic Res* 2002;36:119–126.
- 55 Alvarez P, Alvarado C, Mathieu F, Jimenez L, De la Fuente M: Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leukocytes. *Eur J Nutr* 2006;45:428–438.
- 56 Baeza I, De Castro NM, Alvarado C, Alvarez P, Arranz L, Bayon J, De la Fuente M: Improvement of immune cell functions in aged mice treated for 5 weeks with soybean isoflavones. *Ann NY Acad Sci* 2007;1100:497–504.
- 57 De la Fuente M, Victor VM: Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 2000;78:49–54.
- 58 Victor VM, Rocha M, Esplugues JV, De la Fuente M: Role of free radicals in sepsis: Antioxidant therapy. *Curr Pharm Des* 2005;11:3141–3158.
- 59 Guayerbas N, Puerto M, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente, M: Thiolic antioxidant supplementation of the diet reverses age-related behavioral dysfunction in prematurely ageing mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80:45–51.
- 60 Miquel J, Economos AC: Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol* 1979;14:279–285.

An Update of the Oxidation-Inflammation Theory of Aging: The Involvement of the Immune System in *Oxi-Inflamm-Aging*

Mónica De la Fuente* and Jaime Miquel

Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

Abstract: The aging process is one of the best examples of the effects of a deterioration of homeostasis, since aging is accompanied by an impairment of the physiological systems including the homeostatic systems such as the immune system. We propose an integrative theory of aging providing answers to the how (*oxidation*), where first (*mitochondria of differentiated cells*) and why (*pleiotropic genes*) this process occurs. In agreement with this oxidation-mitochondrial theory of aging, we have observed that the age-related changes of immune functions have as their basis an oxidative and inflammatory stress situation, which has among its intracellular mechanisms the activation of NF κ B in immune cells. Moreover, we have also observed that several functions of immune cells are good markers of biological age and predictors of longevity. Based on the above we have proposed the theory of oxidation-inflammation as the main cause of aging. Accordingly, the chronic oxidative stress that appears with age affects all cells and especially those of the regulatory systems, such as the nervous, endocrine and immune systems and the communication between them. This fact prevents an adequate homeostasis and, therefore, the preservation of health. We have also proposed a key involvement of the immune system in the aging process of the organism, concretely in the rate of aging, since there is a relation between the redox state and functional capacity of the immune cells and the longevity of individuals. Moreover, the role of the immune system in senescence could be of universal application. A confirmation of the central role of the immune system in oxi-inflamm-aging is that the administration of adequate amounts of antioxidants in the diet, improves the immune functions, decreasing their oxidative stress, and consequently increases the longevity of the subjects.

Key Words: Aging, oxidative stress, inflammation, immune system, oxi-inflamm-aging, antioxidants.

INTRODUCTION

Although in a now classic article published in 1957 Medawar [1] describes “aging” as an “unsolved problem of biology”, the great amount of research carried out since that time allows us to approach an understanding of aging. However, often if an excess of information is not well understood, it can blur the field of study and lead to wrong conclusions. In this review, after a brief exposition of the general characteristics of aging, the difference between maximum and mean longevity, and the theories that have tried to explain this biological process, we suggest an integrative theory of aging in which the vulnerability of the mitochondrial genome to oxidative injury in differentiated postmitotic cells [2,3] has a key relevance. Moreover, we define more clearly our oxidation-inflammation theory and the role that the immune system can have modulating the rate of aging [4,5]. Since immune cells are present in all animals, this role of the immune system can be of universal application. We suggest an evolutionary mechanism for the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. Health maintenance, which is the base of a functional longevity, depends on the preservation of homeostasis, and balance at all physiological levels, the typical characteristic of homeostasis, is more difficult to maintain with aging. In fact, the homeostatic systems such as the nervous, endocrine and immune systems

suffer an impairment with aging. This loss of homeostasis is established at a different rate in each subject, which is shown by a different biological age. Moreover, this rate is the result of individual epigenetic mechanisms acting on genes, from fetal life, throughout the life of the subject (Fig. 1).

Aging can be neither “cured” nor “eliminated”, it can only be mitigated, i.e.: to make the process slower. This is possible through the modulation of environmental factors such as nutrition. Thus, based on the oxidation-inflammation that underlies the aging process, the administration of adequate amount of antioxidants, which also show anti-inflammatory properties, could be a good strategy to avoid the excessive oxidative and inflammatory stress of aging and, consequently to improve health and increase longevity. Since the immune function is a good marker of health and biological age and a predictor of longevity, the effects of strategies using environmental factors or life style, such as the adequate ingestion of antioxidants, can be analyzed through the study of this homeostatic immune system. The last part of this review collects information in this regard and we present original data on the effects *in vitro* of thiolic antioxidants on several functions of lymphocytes from old mice.

CHARACTERISTICS OF THE AGING PROCESS

The aging process is one of the best examples of the effects of an impaired homeostasis. Thus, aging may be defined as a progressive and general decrease of the organism functions that leads to a lower ability to adaptively react to

*Address correspondence to this author at the Departamento de Fisiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, José Antonio Novais 2, 28040 Madrid, Spain; Tel: 913944989; Fax: 913944935; E-mail: mondelaf@bio.ucm.es

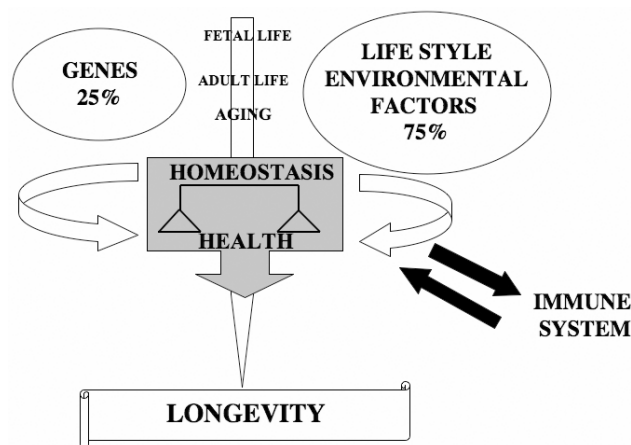


Fig. (1). How a good and long mean longevity can be reached?.

The base of a functional longevity is health maintenance and this depends on preservation of homeostasis (balance at all physiological levels). This health preservation depends on the genes (approximately in a proportion of 25%) and on the style of life and environmental factors (in a 75%). With aging it is more difficult to maintain the homeostasis as a consequence of deterioration of the regulatory systems. This loss of homeostasis is established at different rate in each subject, and this rate is the result of individual epigenetic mechanisms acting on genes from fetal life throughout the life of the subject. Since the functions and redox states of the immune system are good markers of health and predictors of longevity, we propose their study in order to determine each particular rate of aging and its response to changes in the style of life and environmental factors.

changes and preserve homeostasis. This accumulation of adverse changes with the passing of time increases the risk of disease and finally results in death. Thus, although aging should not be considered a disease, it strongly increases the chances of suffering many degenerative diseases. As Strehler [6] pointed out, there are four rules that define aging. It is universal (practically all animal species including the metazoans showing sexual reproduction suffer aging), progressive (the rate of aging is similar at different ages after the adult state), intrinsic (the causes that are the origin of aging must be endogenous, since even if animals are exposed to optimal environmental conditions throughout life, they still experience the aging process at the rate characteristic for their species) and deleterious (aging is obviously detrimental to the individuals since it leads to their death; however, at the species level, the detrimental character of aging could be argued since it is counteracted by a continuous replacement of the members of the population).

The consequences of aging involve a loss of efficiency in all physiological functions, but they are especially related to a decreased capacity to maintain the homeostasis in the individuals. An example of this is the lower capacity of elderly persons to endure extreme temperatures, infections or in general the situations in which stress occurs. If the principal characteristic of a healthy organism is to maintain the functional balance at all levels, with aging this balance fails.

THE LONGEVITY

The aging process is finished at the end of the maximum lifespan or maximum longevity (the maximum time that a

subject belonging to a determined species can live), that for instance in human beings is about 122 years whereas in mouse and rat strains is only 3 and 4 years, respectively. It is very important to distinguish this longevity from the mean longevity, which can be defined as the mean of the time that the members of a population that have been born on the same date live. The maximum longevity is fixed in each species, but the life span of individual organisms, even when they are of the same genotype and are raised in a common environment protected from extrinsic hazards, shows marked variability [7]. Although presently it is impossible to increase the maximum longevity, the mean lifespan can be increased by environmental factors and in human beings by factors of style of life that allow the maintenance of good health and to achieve the maximum lifespan in good condition. Thus, presently, human aging is a problem in developed countries because the mean lifespan or mean longevity is very high, about 75-83 years. Since we start the aging process at about 18 years of age, we spend most of the time in our life aging. For this reason it is very important to know which factors of life style can increase that longevity and how they can do it. A higher mean longevity is achieved by preservation of good health, and this depends on the genes, in 25% approximately, and on the style of life and environmental factors, in 75% [8] (Fig. 1).

THEORIES OF AGING

The answers to the key questions in gerontology such as how does aging happen?, where does aging start? and why does aging occur?, have stimulated so much speculation as to justify the cynical comment that there are as many theories of aging as there are gerontologists. Thus, as a consequence of the great complexity of the changes associated with senescence, more than 300 theories have been proposed to explain the process of aging [9]. Presently, most of these theories of aging mentioned by Medvedev in his review published in 1990 have been abandoned since they do not agree with the data from research on humans and laboratory animals, whereas other theories find acceptance and research support.

Although the theories of senescence proposed are too numerous to enumerate and several kinds of classifications of these theories have been published [10,11], we feel that most of those theories can be joined in three groups. The theories in one of these groups, "the genetic program theories", propose that aging is the result of a purposeful program driven by the genes. In another group are "the epigenetic theories", which indicate that aging is the result of events that are not guided by a program but are stochastic or random events not genetically programmed. The third group corresponds to "the evolutionary theories" of aging, which do not try to explain the mechanism of aging, but instead attempt to explain why the aging process occurs and the reason for the different rates of aging in the different species. In the first group we can include those theories proposing the existence of specific genes of longevity and theories of existence of biological clocks for aging. Among the latest, the theory of Hayflick, for example, is based on the idea that the somatic cells with replicative potential possess a "mitotic clock" that fixes their maximum lifespan [12]. Since the establishment of this "Hayflick limit" the terms replicative

senescence, cellular senescence and cellular aging have become synonymous. This theory and “the shortening telomere” theory (telomere attrition occurs with each round of cell division) [9,13] have to be considered possible explanations of cell differentiation processes or replicative cellular senescence, but not the base of organism aging. In the epigenetic group, it is possible to include several groups of theories such as: a) molecular structural stabilization and cross-linkage theories; b) metabolic theories (aging can be considered “a side effect” of aerobic metabolism: “wear- and- tear” or disorganization, rate-of-living, oxidation, damage by free radicals, mitochondrial injury) [9,11,14]; c) physiological theories of aging in which the neuroendocrine and the immunological theories are included [9]. In the group of evolutionary theories we can mention theories such as the risk of deprecation, duration of development and rate of reproduction, among others [9,10], and the first evolutionary theory of senescence that was suggested by Weissman [9,15] considering aging necessary for the disposal of the mortal soma in order to prevent organisms competing with their progeny for food and space.

Presently, despite published claims to the contrary there is no direct evidence that only the genes drive age changes. Even researchers following genetic theories in the past are now defenders of the idea that the aging process, which appears after reproductive maturation, is driven by random events not gene-programmed [16]. In conclusion, most theories of aging explain events that are consequence of the aging process but not their cause. Several of the epigenetic and evolutionary theories are useful to try to solve the puzzle of aging and we will use them further to elaborate an integrated theory of aging.

THE FREE RADICAL, OXIDATIVE AND MITOCHONDRIAL THEORIES OF AGING

Among all the aging theories the free-radical concept proposed by Harman [17] attracts a great deal of attention and is probably now the most widely accepted to explain how the aging process occurs. This epigenetic theory, that has been further developed by several researchers [18-21] including Miquel *et al.* [2-3] (the contributions of which are dealt with in more detail in the following section), proposes that aging is the consequence of the accumulation of damage by deleterious oxidation in biomolecules caused by the high reactivity of the free radicals and reactive oxygen species (ROS) produced in our cells as a result of the necessary use of oxygen. Since oxygen is mainly used in respiration to support the life-maintaining metabolic processes, the mitochondria, and more concretely their DNA (mtDNA), are probably the first target of this oxidation. As first pointed out by Miquel *et al.* [2,3,22], it is in the fixed post-mitotic cells, that can not regenerate fully these organelles, where the aging process starts.

Very important findings that complement the fundamental tenets of the free radical theory of aging are that the rate of mitochondrial oxygen radical generation, as well as the degree of membrane fatty acid unsaturation, and the oxidative damage to mtDNA are lower in the long-lived than in the short-lived species [20,23]. In any case mitochondrial injury by free radicals and loss of bioenergetic competence

occur, which lead to aging and death of cells and therefore of the organism [24].

As an example of the degree of acceptance of the above and related concepts, we can cite some comments by Beckman and Ames [25] in a widely cited review: “*The free radical theory of aging, conceived in 1956, has turned 40 and is rapidly attracting the interest of the mainstream of biological research (...). During the past decade several lines of research have convinced a number of scientists that oxidants play a role in aging*”. We fully agree with the above and believe it useful to review briefly the lines of research on “residual oxygen toxicity that overwhelm antioxidant defenses” by Gerschman [18], the “mitochondrial theories of aging” by Harman [17] and Miquel *et al.* [2], and the “oxygen radical-mitochondrial injury hypothesis of cell aging” [3].

In agreement with all the above oxidation-related theoretical concepts, the cells, in order to protect themselves against oxygen toxicity, have developed a variety of antioxidant mechanisms that prevent the formation of ROS or neutralize them after they are produced. However, these defensive systems are not perfect, and thus when the amount of ROS exceeds the antioxidant protection, an oxidative stress situation appears with resulting cell injury [26]. Despite the above, we should consider that oxygen is essential for life and that ROS, in certain amounts, are needed for many physiological processes that are essential for our survival [27,28]. Therefore, the functions of our organism are based on a perfect balance between the levels of ROS and those of antioxidants. It is the loss of this balance, because of an excess in the production of ROS or an insufficient availability of antioxidants, which leads to the oxidative stress, especially in the mitochondria of differentiated cells (as reviewed in more detail below) which underlies ROS-related diseases and aging [21] (Fig. 2).

THE OXYGEN STRESS-MITOCHONDRIAL INJURY THEORY OF FIXED POSTMITOTIC AND DIFFERENTIATED CELL AGING

The electron-microscopic finding of a striking age-related mitochondrial loss (and resulting accumulation of the age pigment lipofuscin) in the somatic tissues of the insect *Drosophila melanogaster*, as well as in the fixed post-mitotic Leydig and Sertoli cells of the mouse testis justified the proposal of an *oxygen stress-mitochondrial injury theory of aging*. Now this concept attracts a great deal of attention since, according to more recent work, the damage caused by ROS to mitochondrial ATP synthesis not only plays a key role in cell aging, but also in the fundamental cellular process of apoptosis.

This oxygen stress-mitochondrial theory proposed by Miquel and Fleming [3] and Miquel [22,29] maintains that the ROS released in the respiratory chain injure the genome and membranes of the differentiated cells that lack the organelle-regenerating power of frequent mitosis. More concretely, the theory proposes that because of the oxidative and mutagenic environment, and the vulnerability of the mitochondrial genes (that lack the protection by histones) the mitochondria of fixed postmitotic cells (and to a lesser degree those of other differentiated cells) suffer accumulating

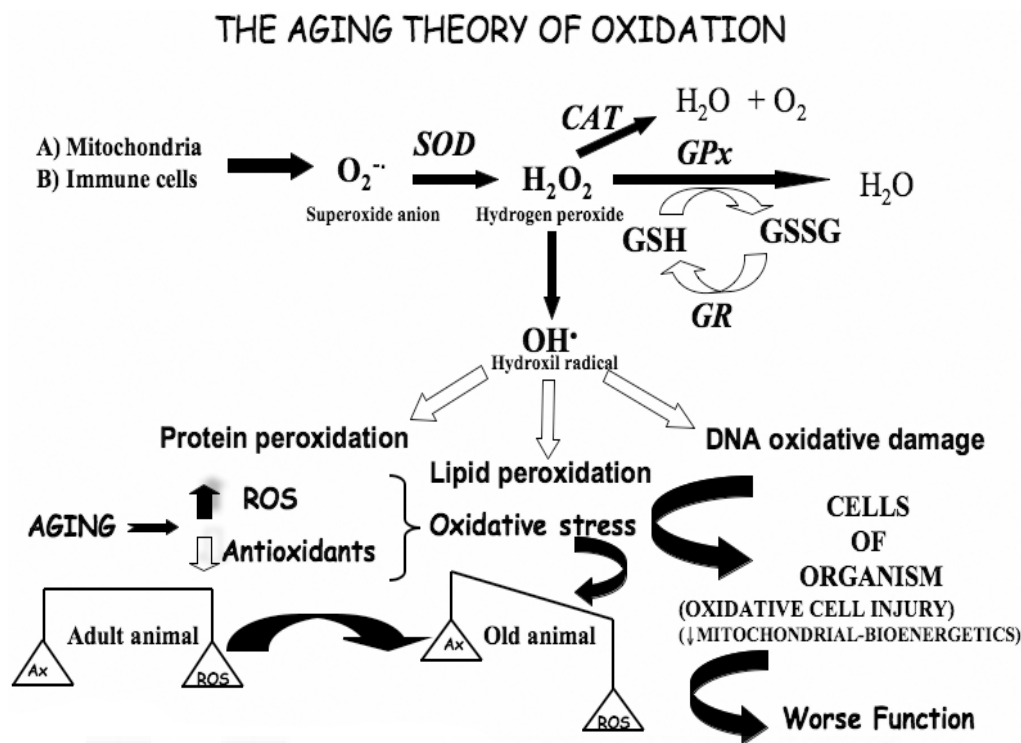


Fig. (2). The aging theory of oxidation. Aging is the consequence of accumulation of oxidative damage in biomolecules caused by the high reactivity of the free radicals and reactive oxygen species (ROS) produced in our cells, especially in mitochondria, as a result of the necessary use of oxygen. The immune cells also produce important levels of ROS. The first oxygen free radical appearing in cells is the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), which produces hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^{\cdot}), the most reactive free radical, which carries out the oxidation of biomolecules such as proteins, lipids and DNA. Cells, in order to protect themselves against oxygen toxicity, have developed a variety of antioxidant mechanisms that prevent the formation of ROS or neutralize them after they are produced. Thus, superoxide dismutase (SOD) catalyzes the inactivation of superoxide anion and catalase (CAT) inactivates hydrogen peroxide. The reduced glutathione (GSH) is the most important antioxidant in the organism and neutralizes peroxides using glutathione peroxidase (GPx) and in this action it is transformed to oxidized glutathione (GSSG). The antioxidant enzyme glutathione reductase (GR) is used to catalyze the reduction of glutathione. We should consider that oxygen is essential for life and that ROS, in certain amounts, are needed for many physiological processes, which are essential for our survival. Therefore, the functions of our organism are based on a perfect balance between the levels of ROS and those of antioxidants. However, with aging a loss of the balance appears, with an excess in the production of ROS or an insufficient availability of antioxidants, which leads to the oxidative stress. This situation of oxidative stress results in oxidative cell injury, which at the mitochondrial level causes a loss of bioenergetic competence, and therefore a worse function of cells.

mtDNA and membrane damage. These genetic and structural injuries impair the maintenance, renewal and function of the mitochondria, with resulting bioenergetic decline and progressive loss of somatic physiological functions.

This oxygen stress-mitochondrial theory of aging is supported by the research findings from the laboratory of Miquel summarized in Table 1 [3,30-37], and is in agreement with similar concepts published by other authors such as Linnane [38] that proposed “mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases” and Kowald and Kirkwood [39], who linked aging to “accumulation of damaged mitochondria through delayed degradation of damaged organelles (...) in fixed post mitotic and dividing cells”.

THE INTEGRATED THEORY OF AGING: HOW, WHERE AND WHY OF AGING

The most widely accepted theories of aging offer partial explanations of the causes and effects of this process, which is similar at the different levels of biological organization

(molecular, cellular and physiological) in human subjects and in all multicellular animals. Since the aging process is very complex, a theory based on only one mechanism can not offer a satisfactory explanation of all its aspects. This justifies the proposal of a theory that integrates early concepts that offer partial explanations of the mechanism of aging with others more recent [2,14,15,17-19,40-42] (Table 2). Thus, although recently it has been pointed out that “the senescence in vivo remains to be fully determined” [43], we have proposed an integrated theory that attempts to reply to the three important questions of biogerontology: “the how”, “the where” and “the why” of aging. We propose regarding the how that the aging process is linked to the oxidation produced by the oxidative stress, which is at the base of the many age-related changes which affect a large number of parameters including morphology, physiology and behaviour at all levels of organization: molecular, cellular, tissue, organic and that of the whole individual. We also suggest a reasonable answer to the question of where aging starts: in the mitochondria from fixed differentiated cells. And why does aging happen?. The answer seems to be found in sev-

Table 1. Research from the Laboratory of Miquel Supporting His Oxygen Stress-Mitochondrial Injury Theory of Aging of Fixed Postmitotic and Other Differentiated Cells

a)	Age pigment (lipofuscin, a waste product from mitochondrial-membrane lipid peroxidation) is found in the fixed postmitotic cells of an invertebrate, namely aged <i>Drosophila melanogaster</i> [30].
b)	In mouse testis, in contrast to the lack of lipofuscin (LF) in the dividing spermatogonia, LF and mitochondrial damage occur in the fixed postmitotic Leydig and Sertoli cells [31].
c)	An increased aerobic metabolism, such as caused by moderately high temperatures increases the rate of <i>Drosophila</i> aging (as shown by an accelerated loss of physiological performance and increased age pigment accumulation) without changing its total O ₂ use throughout life, despite the striking differences in maximal life span [32].
d)	A comparative study of three normal strains of <i>D.melanogaster</i> shows that their maximal lifespan is inversely proportional to their respiration rate [33].
e)	Aging changes the physico-chemical characteristics of the membrane lipids of <i>Drosophila</i> mitochondria and modulates their respiratory capacity [34].
f)	When housed in a space vehicle, drosophilas stressed by being unable to control their flight in the situation of weightlessness increase their respiration, with resulting premature aging [3].
g)	Aged drosophilas do not synthesize abnormal proteins although there is a decrease in general protein synthesis. This provides support for the mitochondrial-bioenergetic concepts of aging by ruling out theories that propose nuclear DNA mutations as the key mechanism of aging [35].
h)	The administration in the diet of thiazolidine carboxylic acid or tioprolone, a normal component of liver mitochondria and precursor of reduced glutathione increases the life span of <i>D. melanogaster</i> [36].
i)	Aging of mouse brain results in an impairment of oxidative phosphorylation as well as a decrease in the activity of cytochrome c oxidase and glutathione in synaptic mitochondria [37].

Table 2. Selection of Theories of Aging Related to Cell Differentiation, Metabolic Rate, Free Radicals, Oxygen Stress and Mitochondrial Injury, that Focus on the Aging Process at Several Levels of Biological Organization and are the Basis of Our Integrative Theory of Senescence

Author	Year of Publication	Key Concept / Cause of Aging	References
Weissman	1891	Division of work between <i>immortal</i> proliferating germ cells and somatic working and senescing cells	[15]
Minot	1907	Price paid for cell differentiation	[41]
Pearl	1928	Side effect of metabolism	[14]
Harman	1956	Damage by free radicals (that injure all cell types)	[17]
	1972	The mitochondria as the "biological clock" of aging	[19]
Williams	1957	Genes that program the organism for maximal vigor at the age of reproduction but have noxious effects afterwards	[42]
Gerschman	1962	Toxicity of oxygen due to lack of a fully competent antioxidant protection	[18]
Miquel <i>et al.</i>	1980	Oxy-radical injury to the genes and membranes of mitochondria of differentiated and especially fixed post-mitotic cells.	[2]

eral evolutionary theories and related concepts published long time ago. Thus, we agree with the concept of Williams [42] that aging is a consequence of characters selected by evolution as an advantage for the young subjects of the species allowing them to reach the reproductive age in the best condition and thus preserve these species, but are a disadvantage for old subjects. Thus, selection acts before the adult age and the maintenance of the species is more relevant biologically than the longevity of the individuals.

Moreover, we state that aging results from the differentiation process shown by somatic cells, especially those un-

able to divide such as most neurons, in contrast to germ cells. This process is linked to the appearance of mitochondria with very high levels of oxygen consumption and resulting oxidative damage to their molecules, especially to mtDNA. The resulting loss of bioenergetic competence and physiological performance is involved in the senescence and death of the members of the metazoan species, the genes of which, housed in a series of "disposable somas" [44], have an unlimited survival in their normal habitat thanks to sexual reproduction. Thus, senescence is the "price" paid by metazoans for the appearance in biological evolution of differentiated cells, the mitochondrial genome of which is quite vul-

nerable to oxygen free radical attack. It is evident that what allows better functions in the age of reproduction, namely oxygen utilization for cell energy production, is the main cause of functional impairment afterwards. Thus aging would be an unprogrammed effect of the high levels of oxidative stress in the differentiated cells, quite irrelevant from the viewpoint of species survival through sexual reproduction.

BIOLOGICAL AGE, A CONCEPT LINK TO MEAN LONGEVITY

The aging process is very heterogeneous. Thus, there are different rates of physiological changes in the various systems of the organism and in the diverse members of a population of the same chronological age. This justifies the introduction of the concept of "biological age" or "functional age", which is very useful to assess the level of aging experienced by each individual and therefore his life expectancy [45]. Since chronological age fails to provide an accurate indicator of the aging process [46], and aging is associated with a great number of changes at all levels of biological organization, there is a need to select parameters that are useful as biomarkers of aging. The most complete investigation on biological age was performed by Borke and Norris [47], on over one thousand men, in the longitudinal study on human aging of the *Gerontological Center* of Baltimore. The retrospective analysis of this study showed that the subjects presenting certain parameters "more aged" than those found in the majority of the subjects of the same chronological age had a shorter life expectancy. These biomarkers include those related to respiratory function, systolic arterial tension and reaction times determined by psychometric tests. Although the concept of biological aging has been investigated since the 1970s, most studies mainly selected a profile of physical parameters, including some physiological and biochemical parameters, and in spite of recent attempt to extend the kinds of parameters of biological age [48], the proposals are still incomplete and not very concrete. Thus, most research on biological age did not include immune parameters. Since the immune function is a marker of health and longevity [49] and a positive relation has been shown between a good function of several immune cells and longevity [50-56], presently several immune parameters are considered essential and very representative of the "true" biological age of a subject and thus, they can be considered appropriate biomarkers of biological age (as reviewed in more detail below).

THE IMMUNE SYSTEM AS A HOMEOSTATIC SYSTEM

The immune system is one of the regulatory systems of the organism. The immune system is a remarkably versatile defense system that has evolved to protect animals from infectious agents (e.g. bacteria, virus, fungi, parasites, etc) and malignant cells. This activity is carried out, from the birth of individuals, *via* different components such as epithelial barriers, immune cells and immune molecules, which act together in a dynamic network, the complexity of which, rivals that of the nervous system. The immune system is constantly active in order to discriminate between "non-self" and "self" and thus, destroy the non-self.

Two types of immunity protect the body: 1) Innate (or natural, non specific) and 2) adaptive (or acquired, specific). 1) Innate immunity is present already at birth and provides the first barrier against invaders. If pathogens pass the epithelial and mucosal barriers, cells of the innate immunity such as monocytes, macrophages, neutrophils and dendritic cells, come into play to rapidly eliminate them, and hence contain the infections. In addition, NK cells are implicated also in the control of infections and resistance to tumors. The basic signalling receptors of the innate immune cells in the recognition of pathogens are the Toll-like receptors (TLR), which detect a broad range of molecular patterns that are commonly found on pathogens, called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). 2) Adaptive immunity is a more sophisticated immunity acting when the innate defense cannot clear the infection in a short time. This immunity involves the specific recognition of antigens (molecules of pathogens or tumoral cells recognized as foreign). The cells of adaptive immunity, the lymphocytes, both T cells and B cells, carry receptors on their surface and they recognize antigens, either presented by an antigen-presenting cell or free in extracellular fluids. There are three kinds of T cells: A) Cytotoxic T cells (Tc), that express the surface protein marker CD8+, which directly kill infected cells and tumor cells. B) Helper T cells (Th), expressing CD4+ as the surface marker, which aid B and other T cells to do their work. These cells can be type 1 (Th1) and type 2 (Th2). The Th1 promote cell-mediated reaction providing effective defense against intracellular pathogens. The Th2 activate humoral immunity with antibody production. C) Regulatory T cells (Treg), which suppress the activity of lymphocytes to prevent their overreaction. Communication within adaptive immunity and between innate and acquired systems requires direct cell-to-cell interactions as well as the production of chemical messengers such as cytokines.

The three steps of the mechanisms of the immune response are: 1) Recognition of antigens (the immune system is able to recognize subtle chemical differences that distinguish one foreign pathogen from another, as well as to discriminate between foreign molecules and the own cells and proteins). 2) Activation and regulation of this activation (after the recognition of antigens, the immune system recruits a variety of cells and molecules to mount an appropriate response; thus the proliferation of specific lymphocytes and the production of cytokines are key activities in this step). The regulation of the activation is a key to obtain perfect results, since an inappropriate regulation, both by decreased or increased activation, leads to illness. 3) Effector response to eliminate or neutralize the antigens. In this effector response an inflammatory situation is generated. The effector cells are then destroyed, but the memory cells are produced in the activation step and thus, although they do not act at that moment, they are maintained in the organism. A later exposure to the same foreign organism induces a memory response, characterized by a more rapid and heightened immune reaction that serves to eliminate the pathogen and prevent disease.

In view of the above, it is possible to understand that the immune system contributes to homeostasis recognizing and eliminating foreign and altered self-antigens, thus maintaining the appropriate cell types and molecules that constitute

the tissues and organs. Moreover, this system with its cells and mediators contributes to the maintenance of the correct functions of the body [4,5,56]. Thus, the appropriate function of the immune system has been considered the best marker of health and longevity [5,49,56].

OXIDATION AND INFLAMMATION AS RELATED HOMEOSTATIC MECHANISMS OF THE IMMUNE RESPONSE

We should consider that the immune cells need to produce free radicals and other oxidant and inflammatory compounds in order to perform their defensive functions [4,5,27, 28]. Thus, one type of action of cells involved in host defense consists ROS production of as chemical weapons to incapacitate pathogens and malignant cells. In addition, gene expression can be modulated by ROS, regulating the biosynthesis of antibodies or cytokines and other immune mediators. However, ROS produced in relatively high concentration cause cellular damage as mentioned above. Thus, ROS stimulate immune functions such as proliferation or produce cellular damage, depending on their specific concentration [28]. The immune cells need to produce the adequate levels of ROS to carry out their defensive function, but an excess of ROS can cause damage to immune cells, even more considering that the membrane characteristics of these cells make them very vulnerable to oxidative damage [4,27,57]. Therefore, if any cell needs to maintain a balance between the production of oxidants and the antioxidant defense in order to prevent an excess of the first and the resulting oxidative stress, this balance is even more essential to preserve the functional capacity of immune cells and, therefore, the health of the organism (Fig. 3).

Emerging evidence shows the close link between oxidation and inflammation since excessive or uncontrolled free radical production can induce an inflammatory response, and free radicals are inflammation effectors [58]. In fact, an inflammation occurs when of the immune system responds to the invasion of pathogens. Thus, inflammation is not *per se* a negative phenomenon, since it is needed to maintain life through a constant struggle to preserve the integrity of the individuals. However, if the levels of inflammatory compounds exceed the control of anti-inflammatory compounds, an imbalance appears and the situation of inflammation is established. There is an extensive list of pathological processes, such as hypertension and endothelial dysfunction [4, 59], atherosclerosis [60] and neurodegenerative diseases [61] that are now considered to include in their pathogenesis not only an oxidative process, but also an inflammatory component. Thus, a balance of pro-inflammatory compounds, needed to cope with damaging agents and crucial for survival, and anti-inflammatory markers is also essential for an appropriate immune function, health condition and successful aging [62-64]. Again, a balance is necessary, to avoid inflammatory stress (Fig. 3).

Homeostatic and Anti-Homeostatic Functions of the Immune System

Considering all the facts indicated above we have extensive evidence of the homeostatic role of the immune system. Interestingly, Besedovsky and Del Rey [65] proposed the idea that the immune system shows also anti-homeostatic

functions, contributing with these to natural selection. Thus, homeostasis, as a product of natural selection, contributes to evolution as long as the survival of one individual would not threaten the survival of other members of the species and thus of the species itself. For example, an individual infected by pathogenic microorganisms may not only have his own life compromised but might also be a vector capable of transmitting this agent to other healthy individuals. The longer that infected individual survives, the higher is the threat to the species. Therefore, there are conditions in which immune mediated homeostasis enters into conflict with evolution. The conflict of interest between immune-mediated homeostasis and natural selection may be overcome by mechanisms referred to as "anti-homeostatic" functions of the immune system. In fact, in recent years it is well known that the cause of death of individuals with strong sepsis processes is not the infection, but the excessive activation of the immune system, which produces high amounts of inflammatory and oxidative compounds. If one asks why there are no mechanisms efficient enough to prevent the over expression of genes, the products of which could cause self-destruction, a possible explanation is that these products may mediate processes of "active" negative self-selection exerted by the immune system. These processes might have been acquired in evolution to limit homeostasis when the survival of the individual compromises the survival of other members of the species [65].

IMMUNOSENESCENCE

As mentioned above, aging is accompanied by a decline of the physiological systems including the immune functions. In fact, it is well known that with the passage of time there is a decrease in the resistance to infections and an increase in autoimmune processes and cancer, which indicates the presence of a less competent immune system. In fact, the increased death rate found in aged populations is due in great proportion to infectious processes [66]. Thus, there is an impairment of the immune system with age, which exerts a great influence on the increasing morbidity and mortality observed in aging human subjects [49]. However, it is presently accepted, although there are conflicting observations on this subject, that almost every component of the immune system undergoes striking age-associated re-structuring. This leads to changes that may include enhanced as well as diminished functions, involving each component of the immune system, as well as their interactions [4,5,56, 67-71]. This fact is denominated immunosenescence. As has been recently indicated, understanding the specific mechanisms and targeting interventions are dependent on research to elucidate the relationship between frailty-associated impaired immunity and immunosenescence in developing an impaired immunity [72].

Immunosenescence results in a pronounced decrease in T-cell functions, especially in the T-cell helper, which affects humoral immunity and causes an impaired B-cell function [69,70,73]. However, not all immune cell types or all functions of an immune cell show a significant decrease. In fact, several cell types and functions of a cell are more activated with age whereas other types and functions do not show significant age-related changes. Thus, a cell type which has been relatively neglected in studies of age and immunity

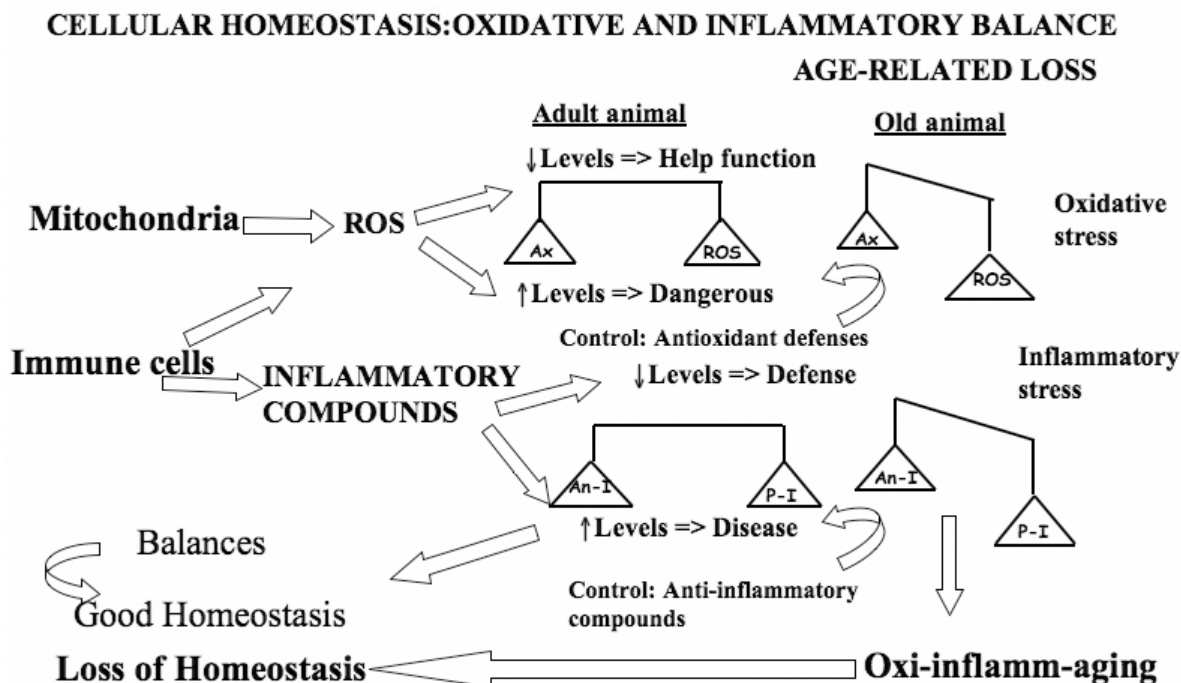


Fig. (3). The oxidative and inflammatory balance support of cellular homeostasis. The cells of the organism produce ROS (especially at the mitochondrial level, as consequence of the respiratory chain, but also in the cytoplasmic membrane, as occurs in the immune cells). ROS in certain amounts are needed for many physiological processes, which are essential for animal survival, but when the amounts of ROS are very high, they lead to oxidative damage. Thus, there are antioxidant (Ax) mechanisms to control that excess, and the balance between ROS and antioxidant levels is the base of a preserved cellular homeostasis typical of the healthy adult. With aging there are more ROS and less antioxidant compounds available, and the oxidative stress appears. Immune cells produce in their defensive work against pathogens pro-inflammatory (P-I) compounds, which are involved with the immune response destroying the pathogens. However, the inflammation has to be controlled to avoid a chronic situation, and this control is linked to the anti-inflammatory (An-I) compounds. There is a balance between inflammatory and anti-inflammatory compounds in the healthy adult that is the base of homeostasis. With aging the level of pro-inflammatory compounds increase and it is higher than the level of anti-inflammatory compounds, leading to inflammatory stress. Moreover, oxidation and inflammation are two processes very related. Thus, with age an oxi-inflamm-aging appears, which is the base of the loss of homeostasis.

is the Treg subset. With age these cells maintain their function capacity but increase in number, and this could explain the greater suppressive activity in the elderly [74,75]. The age-related alterations in the cells from innate immunity have been less studied than those of lymphocytes. Although the evidence accumulated over the last decade supports the profound impact of aging on this immunity, the results obtained on the age-related changes of the functions of cells from innate immunity are often contradictory [5,67,68,76-80]. In general, the NK cells, one of the cellular mediators of innate defence more extensively studied in the elderly, show a decreased cytotoxicity and cytokine production [76,79]. The NKT cells also change in number and function with age [80]. The phagocytic cells such as neutrophils and macrophages show a significant decrease in several of their functions [5,54,55,57,76-80]. Thus, although phagocytes, the age-related changes of phagocytes, which were studied by us for a long time [81], were thought to play a less critical role in the immune dysfunction that occurs throughout aging. Nevertheless recent studies point to the general decline in the functional activities of these cells as one major reason for the susceptibility and vulnerability to bacterial and viral infections among aged subjects, which stand out as the most common causes of illness and death in aging [5,76-80]. However, several activities of cells from innate immunity

increase with aging, namely those related with an increase of oxidative and inflammatory conditions, which show an impairment in the regulation of this immune response. Adherence capacity to tissues, expression of Toll-like receptors such as TLR2 or TLR4, or production of pro-inflammatory cytokines are increased with aging [4,5,78,79,82].

In addition, since the innate and adaptive immune systems co-operate to ensure an optimal immune response, we have to consider that any decline in innate immunity will impact on the function of the adaptive immune system and vice-versa [5,76,80,83]. Thus, at the level of a key component of T cell immunity such as the antigen presentation, the age-related changes in the antigen-presenting cells such as macrophages and dendritic cells could play a relevant role in the alterations of the initiation and outcome of T cell immune response [76]. Moreover, the dendritic cells have been implicated in the age-related change to a predominant Th2 response instead of the predominant Th1 of the adult [84]. In fact, this change from predominant Th1-type to predominant Th2-type responses to antigens with an accompanying shift in cytokine profiles has been proposed as a mechanism for age-related immune dysfunction [73].

Although several of the age-related changes observed in the immune response have been attributed to the modifica-

tions of immune cell subpopulations with aging [73,85], the age-related quantitative variations in a type of immune cell is not necessarily related with its functions. This is the case for NK cells, which increase in number with age but decrease their tumoral cytotoxic capacity [73,76,85]. However, the presence of a higher ratio of memory lymphocytes with respect to naïve cells could explain the decrease of several immune functions [73,84]. Despite the fast increasing amount of data on immunosenescence [67-85], the puzzle of all the changes in the different aspects of the immune function with age has not yet been solved, and the specific role played by the immune system in aging of the organisms is not wholly understood.

THE PSYCHO - NEURO - ENDOCRINE - IMMUNE COMMUNICATION. ALTERATIONS WITH AGING

We know that there is a “neuroendocrine-immune” system that allows the preservation of homeostasis and therefore of health [65,86,87] (Fig. 4). Thus, advances in the field of psychoneuroimmunology have shown that the central nervous system and the immune system are intimately linked and do not function as independent systems. Interactions between these systems are necessarily complex since each of the systems is intrinsically complex. Presently it is accepted that this communication is based on the following facts: A) Immune, endocrine and neural cells can express receptors for cytokines, hormones and neurotransmitters; B) Immune and neuroendocrine products coexist in lymphoid, endocrine and neural tissue; C) Endocrine and neural mediators can affect the immune system; and D) Immune mediators can affect endocrine and neural structures [65]. It was suggested that the immune system represents a system of reception of information of non-cognition related stimuli that appear in the organism (infections, tumor cells or other types of foreign cells) and it responds to those stimuli, accompanied by transfer of that information (by means of the cytokines produced by immune cells) to the neuroendocrine system. In addition, the neuroendocrine system is a receptor of cognitive stimuli (light, sound, stress situations, etc.) to which it responds, and its mediators (neurotransmitters and hormones) reach the immune system to inform it about the situation [88].

The scientific confirmation of this communication has allowed us to understand, on the basis of the experimental data, a number of facts of everyday life. Thus, it is well known that the situations of depression, emotional stress or anxiety, provoked for instance by the loss of employment or of a close relative, are accompanied by a greater vulnerability to conditions ranging from infectious processes to cancer or autoimmune diseases. This agrees with the concept that the immune system is impaired, and results in worse health and a shorter life span [53,55,89-91]. By contrast, pleasant emotions and an “optimistic outlook” on life help us to overcome immune system-related diseases and enjoy better overall health [92]. Conversely, it has been shown that immune system changes such as found in infectious processes alter nervous system functions, which can even lead to psychotic disorders and neural diseases [93].

With age all regulatory systems involved in homeostasis, i.e., the nervous, the endocrine and the immune system, as well as the communication between them, show an impair-

ment [4,5,94,95] (Fig. 4). This important observation justified the proposal of another theory of aging, according to which the changes in this communication between the immune system and the nervous system (and concomitant loss of homeostasis and resistance to stress) is the probable cause of physiological senescence [96]. Recent studies of our group support that this fact occurs in aging, as well as the idea that the impairment of the immune system with aging could affect the functions of the other regulatory systems through an increased oxidative and inflammatory stress, resulting in the age-related homeostasis alteration and increase in morbidity and mortality [4,5].

In relation with the above an inadequate response to stress is one of the conditions leading to an acceleration of aging accompanied by poor health of the immune system and other physiological systems [97-99]. Thus, our group has shown that mice with chronic hyperreactivity to stress and anxiety show a premature immunosenescence and are prematurely aging [100]. We have also observed recently that mice exposed to the stressful condition of isolation have behavioural responses that reveal an impairment of cognition, certain degree of depression and a more evident immunosenescence than control animals of the same age housed in groups (work in the process of publication). Likewise, human subjects suffering chronic anxiety [89,91] or depression show a significant premature immunosenescence.

It is difficult to determine whether with aging neural changes induce immunological changes or an altered immune system induces nervous changes, or whether both processes occur simultaneously, which is the most likely mechanism according to some authors [95]. In addition, we have observed that the *in vitro* response of immune cells to a wide range of neurotransmitter concentrations changes with the age of the subject [101-103]. This demonstrates that although the levels of neurotransmitters that come into contact with the immune cells are maintained with age, the response of the cells of the immune system to them could be different. Thus, the communication between those homeostatic systems deteriorates with age and this justifies the loss of homeostatic capacity and the consequent increase of morbidity and mortality that appear with aging [4,5] (Fig. 4).

THE IMMUNE SYSTEM, A MARKER OF BIOLOGICAL AGE AND PREDICTOR OF LONGEVITY

It has been demonstrated that the competence of the immune system is an excellent marker of health [49] and several age-related changes in immune functions have been linked to longevity [4,5,50-57]. Thus, the levels of immunological parameters such as excess of CD8⁺ CD27⁻ CD28⁻ T cells, low T cell proliferative responses *in vitro* and low interleukine-2 (IL-2) secretion predicted mortality, together with increased IL-6 levels and a CD4: CD8 ratio <1 define “Immune Risk Profile” in humans [104]. Based on the above, we decided to find out if some immune functions could be useful as markers of biological age or “biomarkers” and therefore as predictors of longevity. We felt that this project was worthwhile since biological age is a more adequate parameter than chronological age to measure the rate of aging of a subject, although very seldom the proposed batteries of biomarkers have included immune functions.

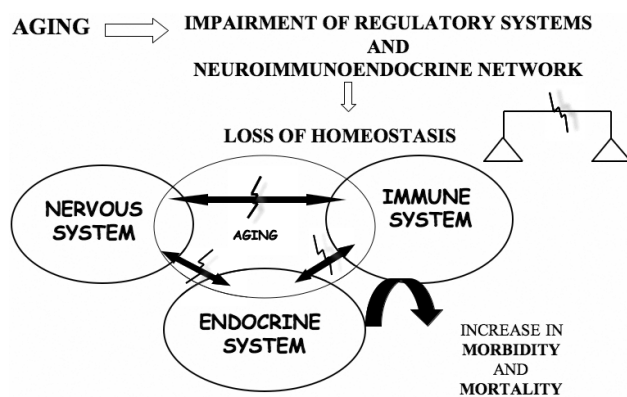


Fig. (4). Regulatory systems and aging. With aging there is an impairment of the regulatory systems, namely the nervous, the endocrine and the immune system as well as of the neuro-endocrine-immune communication. These age-related alterations lead to loss of homeostasis and therefore to the age-related increase in morbidity and mortality.

Among all functions of immune cells we have focused on those listed in Table 3. Thus, in *lymphocytes*: their ability to adhere to the vascular endothelia, migrate towards the site of antigen recognition (chemotaxis), proliferate in response to mitogens and release cytokines such as IL-2. In *phagocytes*: different step of their phagocytic process such as the adherence to tissues, the chemotaxis, the ingestion or phagocytosis of foreign particles and the destruction of pathogens by means of the intracellular production of free radicals such as the superoxide anion and other ROS located in the phagosome of these cells. Furthermore, we have analyzed the capacity of NK cells to destroy tumoral cells of the same animal species being investigated. The same parameters as above have been determined in the various decades of life of human subjects from the adult age of twenty until eighty in leukocytes of peripheral blood, and throughout the life of mice in their peritoneal leukocytes. These longitudinal studies, which despite their high cost, can be carried out on mice (that have a mean life span of two years), are almost impossible to perform on human subjects. Surprisingly our results have shown that in the members of both species similar age-related changes of the above mentioned immune parameters occur. Thus, with aging there is a decrease of functions such as the lymphoproliferative response and the NK activity that protect us against tumoral cells. There is also a decline of the IL-2, as well as of chemotaxis, phagocytosis and adequate levels of ROS in the phagosomes. In addition, there is an increase of the functions that could become noxious, if active in excess. For instance an excessive activation of adherence of immune cells to tissue may prevent their arrival to the site where they have to perform their organism-protecting task. Also there is an increase with age in other immune functions potentially harmful that will be dealt with below, such as the extra-cellular release of superoxide anion and pro-inflammatory cytokines like $TNF\alpha$ [4,5,57] (Table 3).

In order to identify the above parameters as markers of biological age and predictors of longevity we need to demonstrate that the levels that they show in particular subjects reveal their real health and senescent conditions. This has been achieved in the following two ways:

- A) Ascertaining that the individuals with those parameters showing levels older than those of most subjects of the same population, sex and chronological age die before their counterparts. The confirmation that a premature immunosenescence in those parameters may predict a premature death can be tested only in experimental animals. This was performed using a model of premature senescence in mice proposed by our group. The animals that we have denominated PAM (*prematurely aging mice*), in contrast to the NPAM (*nonprematurely aging mice*) of the same population, sex and chronological age, are identified by their poor response in a simple T-maze exploration test. This provides strong support for the concept that the nervous and the immune systems are closely linked. In mice with premature aging we have observed that the above mentioned immune functions show levels characteristic of older mice. In addition, to a more significant immunosenescence, the PAM showed high levels of anxiety and a brain neurochemistry characteristic of older animals. Nevertheless the most convincing evidence that the immune parameters studied are useful markers of biological age is that the PAM showed a shorter life span than their counterpart NPAM of the same sex and chronological age [5,54,55,100] (Table 3).
- B) An additional way to confirm the key role of the immune system in health and longevity is the finding that subjects reaching a very advanced age preserve the immune functions at levels similar to those of the adults. This has been shown in both humans and experimental animals such as mice. In human subjects our group has ascertained that in healthy centenarians the above mentioned immune functions perform as well as in young-adults (30-year old) and much better than in 70-year old human subjects [105]. A similar finding has been obtained on peritoneal immune cells of very long-living mice [103].

All the above results confirm that the immune system is a good marker of biological age and a predictor of longevity. Moreover, since the evolution of the parameters shown in Table 3 is similar in mice and human subjects, we can assume that men and women showing the above immune parameters at the levels of older subjects have a higher biological age and a shorter longevity.

THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATORY STRESS IN IMMUNOSENESCENCE

After knowing the changes that the immune system with aging, suffers, at least several of them, it is necessary to consider why immunosenescence occurs. If, as it is generally accepted, the mechanisms that underlie aging must be of general application, it seems logical to accept that the cause of immunosenescence is the same as that responsible for the senescence of the other cells of the organism, namely the oxidative disorganization linked to the unavoidable use of oxygen to support cellular functions. In addition, as it has been mentioned above, there is a close link between oxidative stress and inflammation, and many age-related pathologies are now considered to include in its pathogenesis both oxidative and inflammatory processes [58-64]. In fact, the levels of pro-inflammatory enzymes and molecules, such as cyclooxygenase 2, several cytokines and prostaglandins, increase with age [62]. Moreover, the increase of inflammatory

compounds can explain several aspects of immunosenescence [106]. Therefore, aging seems to be associated with an oxidative and inflammatory stress [63,64].

Trying to answer the question if there is an increased oxidative and inflammatory stress in the immune cells with aging, our group decided to investigate the age-related changes in the redox and inflammatory state of immune cells. Thus we have analyzed in immune cells, specially in peritoneal leukocytes of mice, but also in neutrophils and lymphocytes from peripheral blood of humans, a variety of oxidant and inflammatory compounds (extra-cellular superoxide anion, oxidized glutathione (GSSG), xantin oxidase (XO) activity, TNF- α , IL-6, PGE₂), and anti-inflammatory and antioxidant protectors (IL-10, reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)), as well as oxidative damage to biomolecules such as lipids and DNA (Table 3). Our results indicate that aging leukocytes suffer oxidative and inflammatory stress, resulting in higher levels of kparameters of oxidation and inflammation, decreased antioxidant defenses and increased oxidative damage to lipids and DNA [4,5] (Table 3). Moreover, an increased oxidative and inflammatory stress has been also found in the immune cells of PAM with respect to those of NPAM and in the leukocytes of male mice with respect to those of female mice [5,100] (Table 3). In addition, very long-living mice and human centenarians show a redox condition in their immune cells similar to that of healthy adult subjects. In fact, recent studies have pointed out a lower expression of genes resulting in inflammation and oxidation in human centenarians, who show preserved immune functions [63,64,105]. Thus, centenarians seem to have a peculiar compromise between both pro and anti-inflammatory compounds and they are remarkably free of most age-related diseases that have an inflammatory component [63,64]. Although these conditions have not been adequately studied in exceptionally long-living experimental animals, we have observed that peritoneal immune cells from very old mice not only preserve in general their function in response to stimuli [103], but also show controlled oxidative-inflammatory stress (in the process of being published).

Intracellular Signal Changes with Aging: Role of the Nuclear Factor KappaB (NF κ B) in Immunosenescence

Age-related changes in the intracellular signals have been reported and they can explain the altered functional response in immunosenescence [73,107]. In the immune cells the degree of phosphorylation after activation shows a decline with age in mice and humans. There are changes in the formation of second messengers with both an increase in several of them such as cyclic adenosine monophosphate (cAMP) [108] and a decrease in other such as inositol triphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG), as well as in the activation of kinases such as mitogen-activated protein kinases (MAPK) and protein kinase C (PKC), among other deficiencies in signal transduction [73, 109]. These defects are responsible for the decreased ability of lymphocytes from elderly individuals to be activated by normal extracellular stimuli. The age-associated increase of oxidants and inflammatory compounds could be related with an up-regulation of a transcription factor as ubiquitous as the nuclear factor- κ B

(NF κ B) activation, which is involved with the expression of genes of oxidant and inflammatory compounds, and has been linked to many acute and chronic oxidative and inflammatory disease states [106,110-113]. Moreover, NF κ B is down-regulated by glutathione precursors such as N-acetylcysteine (NAC), which thus prevent excessive oxidation and inflammation in the above situations [111,112].

Although the activation of NF κ B in leukocytes with aging has been scarcely studied, recent articles highlight the role of the NF κ B system in aging and immune response [62,106,114-116]. Thus, the NF κ B binding domain is the genetic regulatory motif that is most strongly associated with the aging process, and longevity factors such as sirtuin 1 (SIRT1) can inhibit NF κ B signalling and simultaneously protect against the inflamm-aging process [116]. We have analyzed the NF κ B activation, in resting conditions, in peritoneal immune cells throughout aging, and our results show that the immune cells from exceptionally long-living mice have levels of activation of NF κ B similar to those of younger animals. Moreover, in old mice, only animals with controlled basal NF κ B activation in leukocytes achieved longevity, and the adult animals with a very high activation of the NF κ B in their peritoneal leukocytes died early. Thus, the level of activation of that factor in leukocytes is significantly related to the life expectancy of the subjects from which the cells were obtained (data in the process of publication).

ROLE OF THE IMMUNE SYSTEM IN THE AGING PROCESS

The Oxidation-Inflammation Theory of Aging

With all the above results obtained by us and others on the immune system and in agreement with other published data supporting the idea of an inflammation and oxidation condition in aging [62,117] we have proposed an oxidative-inflammatory theory of aging [4,5] (Fig. 5). We suggest that aging is linked to a chronic oxidative stress, which affects all cells of the organism, but specially those of the regulatory systems. Thus the nervous, endocrine and immune system would show the greatest oxidative damage and, being unable to preserve their redox balance, would suffer functional losses incompatible with an adequate preservation of homeostasis, with a resulting increase in morbidity and mortality such as found in old age. In addition, the immune system, because of its need to generate continuously oxidative and inflammatory compounds could activate, if it is not well regulated, factors such as the NF- κ B, which after reaching certain level of activation stimulates the expression of genes programming the production of higher amounts of those compounds. Thus it is likely that if the production of oxidative and inflammatory compounds is not well controlled the organism may enter a "vicious circle" in which the great amount of oxidant and inflammatory compounds produced by the immune system would activate even more the further production of the same noxious compounds through factors such as the above mentioned NF- κ B. If this harmful circle is not well controlled, these noxious compounds would disorganize with the passage of time not only the immune cells, but also all other cells of the aging organism (which have a worst response to oxidative stress than young cells), thus contributing to maintain the chronic oxidative stress of the

Table 3. Changes in Immune Function and Oxidative Stress Parameters in Peritoneal Leukocytes from Old Mice Versus Adults, and PAM Versus NPAM, as well as in Peripheral Blood Leukocytes from Elderly Versus Adult Men and Women. Effects of a Diet Supplemented with Antioxidants in Old Mice, in PAM and in Elderly Men and Women

	Old Mice and PAM	Elderly Men and Women	Antioxidant Supplementation
Immune Functions			
Adherence of macrophages and lymphocytes	Increase	-	Decrease
Adherence of neutrophils and lymphocytes	-	Increase	Decrease
Mobility of macrophages and lymphocytes	Decrease	-	Increase
Mobility of neutrophils and lymphocytes	-	Decrease	Increase
Phagocytosis capacity of macrophages	Decrease	-	Increase
Phagocytosis capacity of neutrophils	-	Decrease	Increase
Intracellular superoxide anion and ROS	Decrease	-	Increase
Lymphoproliferative response to mitogens	Decrease	Decrease	Increase
Natural Killer (NK) activity	Decrease	Decrease	Increase
IL-2 release	Decrease	Decrease	Increase
Oxidant and Pro-Inflammatory Compounds			
Extra-cellular superoxide anion	Increase	-	Decrease
Superoxide anion levels	-	Increase	Decrease
Oxidized glutathione (GSSG)	Increase	Increase	Decrease
Oxidized/reduced glutathione (GSSG/GSH)	Increase	Increase	Decrease
Tumor necrosis factor alpha (TNF α)	Increase	Increase	Decrease
Prostaglandin E2 (PGE2)	Increase	-	Decrease
Nitric Oxide (NO) and Xantin Oxidase (XO)	Increase	-	Decrease
Antioxidant Defences			
Reduced glutathione (GSH) levels	Decrease	Decrease	Increase
Superoxide dismutase (SOD) activity	Decrease	Decrease	Increase
Catalase (CAT) activity	Decrease	Decrease	Increase
Glutathione peroxidase (GPx) activity	Decrease	-	Increase
Glutathione reductase (GR) activity	Decrease	-	Increase
Oxidative Damage			
Malondialdehyde (MDA)	Increase	Increase	Decrease
8oxo-7,8dihydro-2deoxyguanosine (8oxodG)	Increase	-	Decrease
Activation of Nuclear Factor kB	Increase	-	Decrease

organism. In view of all the above, it seems evident that the immune system can play a role in the uncontrolled oxidation and inflammation process linked to aging and thus affect the rate of aging (Fig. 5).

Examples Supporting the Role of the Immune System in Aging

We can say, based on the above, that when an animal shows a great oxidative stress in its immune cells, these have a worst function and that animal shows a decreased longev-

ity. On the contrary, if the immune cells of a subject maintain better their redox state, their functions will be also better and this subject will reach greater longevity. Thus, there is a relation between the redox state of the immune cells, their functional capacities and the life span of the subject [5] (Fig. 6).

As examples supporting this idea and, consequently, the role of the immune system in aging, we can mention several experimental models that we have studied, and developed during the last years, as novel approaches to assess prema-

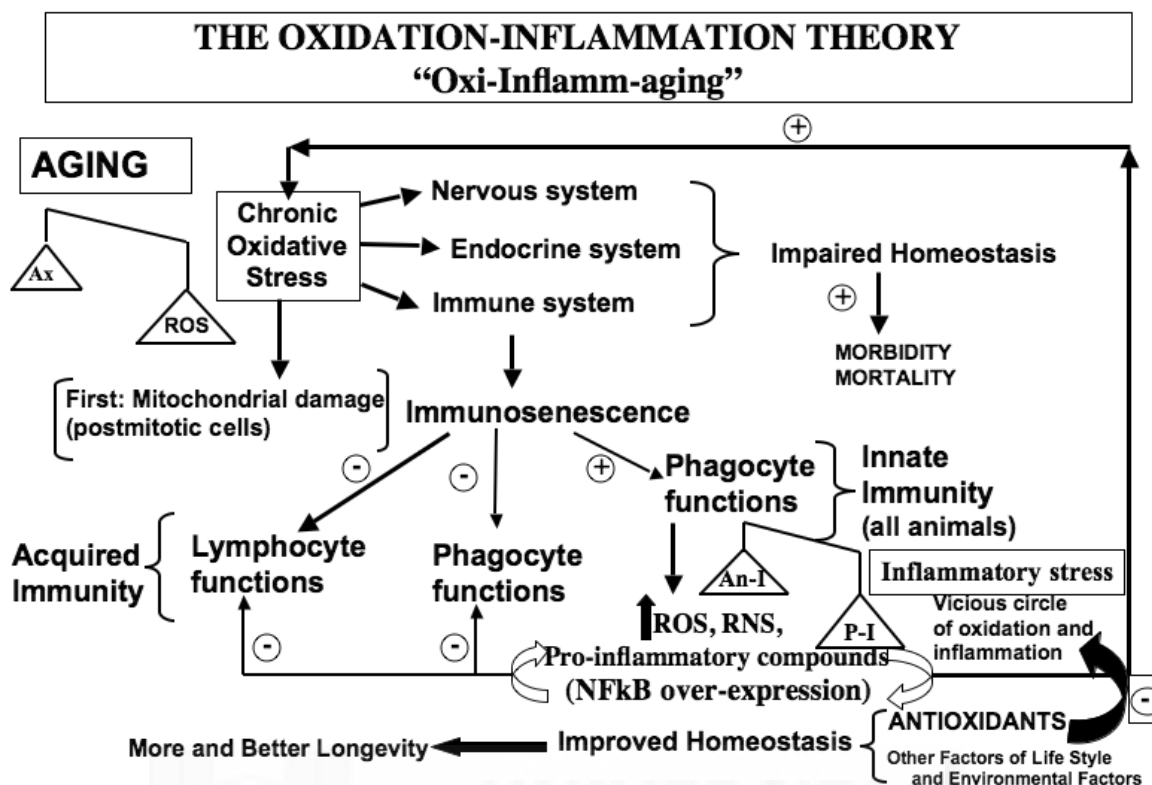


Fig. (5). A more developed scheme of the oxidation-inflammation theory than that previously published [4,5]. Aging is a chronic oxidative stress condition (higher levels of oxidants than of antioxidants) affecting all cells, especially those of the regulatory systems, i.e., the nervous, endocrine and immune system and the communication among them. This explains the impaired homeostasis and the increased morbidity and mortality found in old age. According to the oxidative mitochondrial theory of aging, the differentiated postmitotic cells are the first to suffer damage with age. In animals with a complex immune system the T lymphocytes, and especially the T memory cells (which are the most abundant T cells in aged subjects and are also the most postmitotic cells of the immune system) are those that suffer the effects of the oxidative stress of aging. In the age-associated re-structuring of the immune cells or immunosenescence, there is a decrease of several lymphocyte and phagocyte functions (those related to the acquired immunity), but an increase in other functions, specially those carried out by phagocytic cells generating continuously oxidative and inflammatory compounds (cells and functions responsible for the innate immunity and present in all animals). These compounds produced in order to eliminate foreign agents, could activate the factor of transcription NF- κ B, which after reaching certain level of activation stimulates the expression of genes programming the production of higher amounts of those compounds. If this process is not regulated well a vicious circle of oxidation-inflammation could be established, which would increase the oxidative stress and the inflammatory stress, and consequently accelerate aging. Thus we could conclude that in all animal species the immune cells modulate the rate of aging of each subject. In agreement with this concept, the administration of antioxidants has been shown to cut the mentioned vicious circle, improving both the nervous and immune systems, decreasing their oxidative stress, and consequently improving homeostasis and increasing longevity. Other factors of the environment and life style also have to be considered.

ture aging. We can present two groups of these models. A) Models in which the members of a species with high longevity maintain a better function and redox state of the immune cells. B) In the other group of models, subjects showing an immunosenescence and oxidative and inflammation stress condition, in relation to other members of the group of the same chronological age, have a lower life span (Fig. 6).

A) Model of Females Versus Males and Model of Long Living Mice and Human Centenarians

In the mammalian species the females, that usually have better immune functions than the males [118], also have a longer mean life span owing to the effects of the estrogens that allow them to live in a less oxidized condition [119], as reflected in the better redox state of their leukocytes (data in the process of being published).

In addition, the human centenarians [105] and the laboratory mice with a high mean-life expectancy (data sent for publication) are those that maintain better the redox state of their immune cells and therefore their immune functions.

B) Model of Immunosenescence

BI. Model of Poor Response to Stress and Anxiety: PAM Versus NPAM, and Anxious Women Versus Non Anxious Women

The model, above mentioned, of premature aging confirmed in our laboratory on several strains of mice relies on the differences in performance among mice of the same sex and chronological age when subjected to a T-maze behavioral test [53-55]. The animals that fail the test are "biologically older," i.e., suffer premature immunosenescence, show a neurochemistry similar to mice of an older chronological age and display higher levels of anxiety and emotionality

RELATION BETWEEN THE REDOX STATE AND THE FUNCTIONAL CAPACITY OF THE IMMUNE CELLS, AND THE LONGEVITY OF INDIVIDUALS

Examples supporting the role of the immune system in aging

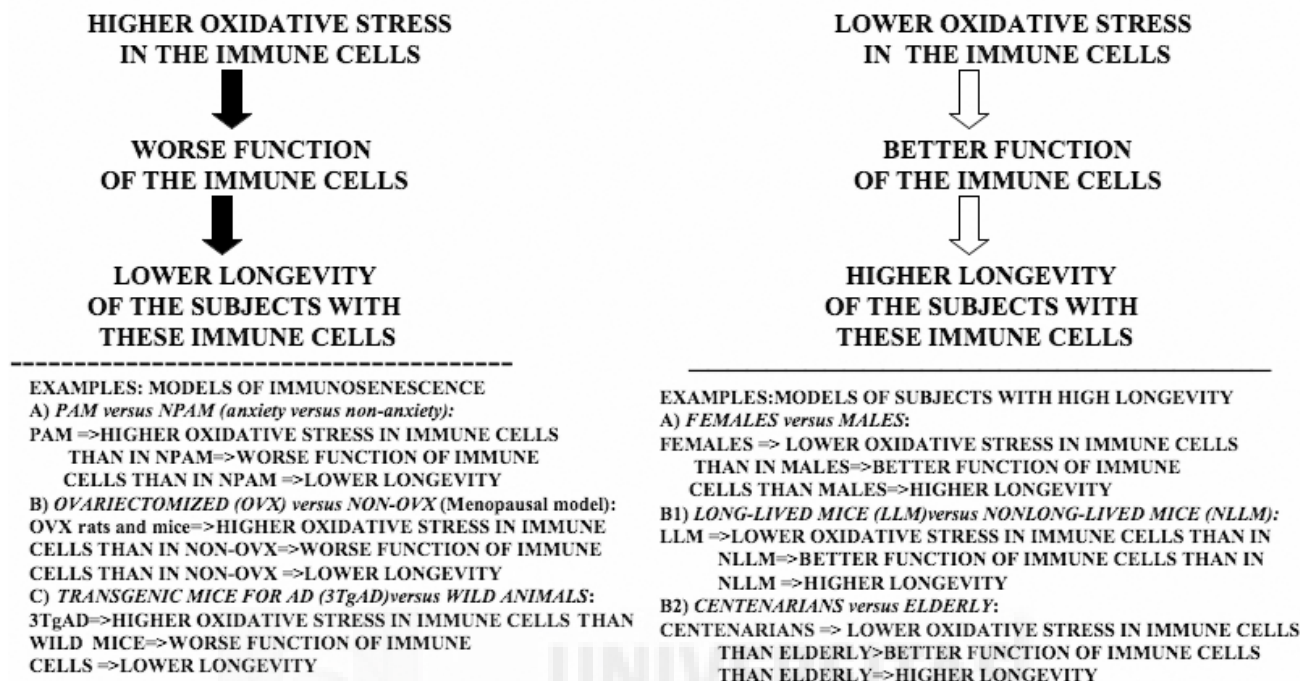


Fig. (6). Relation of the oxidative state of leukocytes, their function and individual longevity. High levels of oxidative stress in the immune system result in an impaired function of its cells and a lower longevity of the subjects having these cells, whereas the contrary situation, namely low oxidative stress and better function of immune cells, is accompanied by high longevity. In agreement with the above several models of premature aging such as PAM (based on the higher anxiety levels of these animals), ovariectomized rats and mice (menopausal model) and the transgenic mice model for Alzheimer's disease, as well as several models of higher longevity such as being females, long-living mice and centenarians, are linked to low and high oxidative stress, respectively, in the immune cells.

with respect to animals of the same chronological age that perform the test correctly [100]. Moreover, these PAM show a greater oxidative stress not only in their immune cells but also in the brain, liver, heart and kidney [100], as well as a shorter life span than their NPAM counterparts [5]. In addition, it has also been mentioned that human subjects suffering chronic anxiety show a significant premature immunosenescence [89].

B2. Menopausal Models

Recently, we have stated that ovariectomy in rodents (a good model of mimicking human menopause) constitutes another model for assessing premature aging, since it accelerates immunosenescence and fastens the progression of aging in behaviours related to sensor motor abilities and neophobia/emotionality. Thus, ovariectomized rats and mice show an older biological age that does not correspond with their chronological age, a deterioration of general homeostasis in the organism and therefore would constitute an example of acceleration of the physiological aging process [118 and data in the process of publication].

B3. Obesity Versus Non-Obesity Animals

Obese subjects show a higher incidence of infection and some types of cancer, suggesting an impaired immune function. Although there are several studies on the immunologi-

cal state in obese compared to non-obese subjects, and, in general, an impaired immune function linked to obesity seems to be accepted [120,121] the information is limited and often controversial [122]. In addition, obesity is associated with an inflammatory state [123]. We have recently observed that immune cells from genetically obese rats (Zucker: fa/fa) show premature immunosenescence as well as an oxidative stress situation (data to be published).

B4. Transgenic Mice for Alzheimer's Disease Versus Wild Animals

Presently it is accepted the role of oxidation and inflammation, at the brain level, in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) [124, 125]. Recently we have studied in old male and female triple-transgenic for AD (3xTg-AD) mice (harboring *PS1*_{M146V}, *APP*_{Swe}, *tau*_{P301L} transgenes) in contrast to wild type animals behavioural, endocrine and immune parameters, as well as the redox state of these mice. The results indicate that several aspects of the impairment of the neuroimmunoendocrine network that occurs with aging are more evident in the 3xTg-AD mice, especially in males. This supports the hypothesis of a premature immunosenescence as a pathogenically relevant factor in AD, which was found to be enhanced in the 3xTg-AD males suggesting that this could also be responsible for the increased morbidity and mortality of these subjects [126].

THE ROLE OF THE IMMUNE SYSTEM IN THE OXI-INFLAMM-AGING, CONTROLLING THE MEAN LONGEVITY, COULD HAVE EVOLUTIONARY REASONS AND BE OF UNIVERSAL APPLICATION

It is well known that since we are born our immune system has to face a great variety of foreign agents and, in order to protect the organism against them, needs to release toxic oxidant and inflammatory compounds. An adequate production of these noxious products is needed to increase the probability that a subject survives to reach the age of reproduction, what is essential for survival of the species. Obviously, the immune system has not been well prepared to preserve their defensive functions for a long time, especially after the reproductive period. In the case of the members of the human species living in developed countries which show considerable increases in their mean life span, they, in general, suffer the consequences of having a very activated immune system during a long period of time [5,62,63,127,128]. As it happens with oxygen use, that allows a very active life condition but has as its "side effect" the production of noxious ROS, a very active immune system is designed to provide protection against the risk of contracting infections and tumours to which we are chronically exposed, but has a "price", i.e., that if the oxygen-inflammation-supported functions and resulting stress are not well controlled or the aging organism lacks a satisfactory individual adaptation to this stress, the senescent process accelerates [5]. Thus, the participation of the immune system in the oxi-inflamm-aging seems evident, and thus, the immune system can accelerate or not the aging process, modulate the biological age and consequently the mean longevity.

Why the Present Increase in the Human Mean Longevity is Associated with an Increase in Oxi-Inflamm-Aging and Oxidative-Inflammatory Pathologies?

Oxidation and inflammation are at the base of most of the age-related diseases such as Alzheimer's disease, atherosclerosis, diabetes and cancer just to mention a few. Thus, it has been proposed that these diseases are "the price we pay" for a life-long active immune system [128]. The frequency and progression of these diseases seem dependent on the genetic background of individuals. In fact, emerging evidence suggest that pro-inflammatory genotypes are related to unsuccessful aging and the increase of chronic inflammatory diseases, especially in old age [129]. We suggest, that if there is now a high frequency of these diseases, it is a consequence of the fact that in the establishment of our species the individuals with pro-inflammatory and pro-oxidant genotypes were able to reach the reproductive age with more probabilities, since they were more capable of surviving to infections. Presently, we suffer the consequences of that evolutionary advantage.

Can the Immune Cells be Involved in the Rate of Aging in all Kind of Animals and thus can have the Immune System Role in Aging a Universal Application?

Based on all the above, we can conclude that "the immune theory of aging" such as was originally proposed [130], can not be accepted since this theory proposed as the cause of organism senescence the decrease of the immune

function and this concept does not follow the principle of universality of Strehler. We should keep in mind that not all animal species have immune systems as complex as those of the mammals. Nevertheless it seems evident, based on all the above information, that the leukocytes can play a fundamental role in aging. We suggest that this role in the rate of aging can be of universal application. Confirmation of this idea could be found in the fact that the immune cells producing oxidant and inflammatory compounds in the highest amounts, and even more with aging, are those responsible for the innate immunity, especially the phagocytic cells which are found, with different denominations, in all animals, including the invertebrates. Moreover, the master regulator of the innate immunity is the NF- κ B system, an ancient signalling pathway found in both insects and vertebrates, and it is needed to consider that NF- κ B signalling seems to be the culprit of inflamm-aging [115].

If the immune system is relatively well known in vertebrate animals, in which, as it has been mentioned above, the innate and adaptive immunity collaborate, increasing the efficiency of immune responsiveness, in invertebrates this system is less known. However, it is presently accepted that all animals and even the plants, have some sort of immunity, although they do not have components of adaptive immunity. Thus, it seems that an innate immunity is found already in unicellular organisms, but evolution has added novel adaptive immune responses to the defense mechanisms. As mentioned above, during aging, adaptive immunity declines, whereas innate immunity, in several aspects, seems to be activated, inducing a pro-inflammatory profile. An evolution-related view of immunosenescence should explain why acquired immunocompetence, which is more specialized and obtained more recently in evolution, is the most impaired with age whereas the innate immune response, older and less specific, is better preserved and may be even stimulated in excess in the aging organism [115] (Fig. 5). In agreement with the above, we have observed that in the peritoneal immune cell populations of mice, as in blood immune cells of human subjects, the macrophages and neutrophils, respectively, are the immune cells responsible for the generation of higher levels of oxidant compounds than those produced by lymphocytes, and these levels significantly increase with age in those phagocytic cells [5] (Table 4). Thus, it is probable that the macrophages, which as already pointed out are found in all animals, are implicated in the chronic oxidative and inflammatory stress of senescence due to their high age-related increase in the production of ROS and inflammatory cytokines [4,5,68,78].

In non-vertebrate phyla, whose immune system has been scarcely studied, there is no equivalent of a lymphoid lineage and thus, as it has been shown in insects, they lack an acquired immunity based on the presence and function of lymphocytes [131]. Nevertheless, the invertebrates produce inflammation-like responses and cytotoxic free radicals during infection, and other defensive actions, through a cellular and humoral immune system similar to the innate immune system of vertebrates [131-135]. Thus, several insect species produce small peptides in response to infections with strong antimicrobial activity. We should also remember that the Toll-like receptors (TLR) were first found in *Drosophila melanogaster*, and that these receptors are mediators of in-

Table 4. Comparative Age-Related Changes in the Levels of Oxidants, Pro-Inflammatory Compounds, Antioxidant Defenses and Oxidative Damage to Lipid in Peritoneal Macrophages and Lymphocytes from Mice and Neutrophils and Lymphocytes from Human Peripheral Blood

Oxidant and Pro-Inflammatory Compounds	Macrophages and Neutrophils	Lymphocytes
Oxidized glutathione (GSSG) levels Oxidized/reduced glutathione (GSSG/GSH)	↑	No change
Antioxidant Defences		
Total Glutathione Reduced glutathione (GSH) levels Superoxide dismutase (SOD) activity	↓	↓
Oxidative Damage		
Malondialdehyde (MDA)	↑	No change

flammatory response [136,137]. Although it has not been studied yet, it is possible that in invertebrates the immune system may be able to modulate the rate of aging.

Thus we can conclude that in all animal species the immune cells could modulate the rate of aging of each subject and thus be involved with the mean longevity. Moreover, we suggest that the immune system, concretely the innate immunity, using its above commented anti-homeostatic role, is an important tool of evolution for eliminating old subjects of each species.

COMPATIBILITY AND INTEGRATION OF THE OXIDATIVE-MITOCHONDRIAL AND THE OXIDATION-INFLAMMATION THEORIES OF AGING

In view of the convenience of attempts to integrate compatible and complementary concepts on the mechanisms of aging at the various levels of biological organization [9,24,138], it seems opportune to consider if the above summarized oxidation-inflammation theory [4,5] is compatible with the concept of the oxygen stress-mitochondrial genetic injury (or oxidative-mitochondrial theory) proposed by the group of Miquel [2,3,29]. In agreement with the above, it is logical to accept that the oxygen stress due to the generation of ROS in immune cells in order to support their functions (especially the ROS produced in the cytoplasmic membranes of phagocytes) are involved in the senescent dysfunction of these cells. In addition, the oxidative stress linked to the production of ATP in mitochondria may contribute to the senescent involution of the immune cells. This could be more evident in the T lymphocytes, specially the T memory cells that can survive for a long time in the postmitotic condition like the fixed postmitotic cells of the nervous and endocrine systems, which are affected by mitochondrial damage. Moreover, an increase of memory T cells and a decrease in the relative proportion of naïve T cells occur with advancing age. In addition, it is interesting to remember that the secretions of the cells of those systems, i. e.: neurotransmitters and hormones, modulate the immune functions and this modulation changes with age [95]. In agreement with the above, an electron-microscopic study by our group has shown that the

lymphocytes from aged mice accumulate abundant granules of lipofuscin [5], a pigment that is the end-product of the oxidative disorganization and auto-digestion of mitochondria [31]. In addition, although it is commonly assumed that neutrophils possess few, if any, functional mitochondria and that they do not depend on these organelles for cell function, there is research indicating that intact mitochondrial function is required to sustain some neutrophil functions in infections and inflammations [139] (Fig. 5).

Therefore we can conclude that the *oxidation-inflammation* and the *oxidative-mitochondrial* theories can be integrated in order to gain a better understanding of the sub-cellular and cellular mechanisms of senescence of the immune system, which like other physiological systems relies on a "symbiosis" of often-dividing and fixed postmitotic cells. In our opinion, this new integration of two theories may allow a better understanding of the key role played by the above mentioned two kinds of oxygen stress (from cytoplasmic-membrane and from mitochondrial origin) in the aging of the immune system and the organism.

ROLE OF ANTIOXIDANTS IN THE IMMUNE CELLS: A STRATEGY TO REVITALIZE THE IMMUNE FUNCTION AND HOMEOSTASIS IN AGING: CONFIRMATION OF THE OXIDATION-INFLAMMATION THEORY

Presently the existence of an oxidant-antioxidant imbalance in aging is accepted, and the first observations suggesting a key role for oxidative injury in aging were, precisely, those showing the favorable effects of endogenous and dietary antioxidants, which have been demonstrated in experimental animals and human subjects [140]. Although it was published that the levels of several antioxidants in diverse species correlate with the maximal longevity of those species [141], and that the over-expression of antioxidant enzymes such as SOD and CAT in transgenic animals is related with an increase of both mean and maximal life span [142], more recent work has demonstrated that species that live longer have lower levels of antioxidants, since they produce lower levels of ROS than the species with lower maximum longev-

ity [143]. Nevertheless, in each species to maintain appropriate levels of antioxidants is relevant to the biological age, and consequently to the mean longevity, of the members of that species, as it will be indicated later.

A direct link between oxidative stress, aging and human diseases can be further established by studies analyzing the impact of variation in human genes encoding for antioxidant defense systems [144]. Moreover, the endogenous antioxidants decrease in oxidative stress situations, such as endotoxemia and aging, because they are spent neutralizing the excess of ROS [4,5,112,140]. Thus, presently it is generally accepted that longevity may be associated with an optimal antioxidant protection, and that the senescent decrease in antioxidant levels supports the free radical theory of aging and provides a rationale for attempts to decrease the rate of aging by supplementing the diet with antioxidants [4,5,57,140].

The ingestion of a diet enriched with antioxidants seems adequate for maintaining an optimum redox balance and therefore protecting the aging organism against oxygen stress. Thus, the administration of compounds such as vitamins C and E, polyphenols and sulfuric antioxidants (taurine, thioproline (TP) and N-acetylcysteine (NAC), among others), which are precursors of glutathione (GSH), in isolation or in nutritional formulations containing several compounds, may be recommended, because of their antioxidant and anti-inflammatory action, for use in both laboratory animals and human subjects. In fact, previous studies from our laboratory in chronologically-old mice, in PAM, and in elderly men and women, have demonstrated the beneficial effect of those antioxidants, which show important favorable effects on health, acting on the nervous and the immune systems [4,5,57,79,140,145-160] (our results summarized in Table 3). We have observed that supplementation of the diet with those antioxidants not only improves the immune function in aging mice, bringing it to adult values, but also neutralizes the oxidative stress, thus helping to reach values of oxidants, antioxidants and biomolecular damage similar to those of adults and NPAM in mice and adults in humans (results summarized in Table 3 and Fig. (7)). Moreover, our group has observed that the lymphocytes from old mice after ingestion of a diet supplemented with thiol antioxidants did not show the lipofuscin pigments present in control animals [5].

In addition, in the performance of their function the leukocytes may exhaust their reserves of antioxidants [161]. This could help to explain why in both laboratory animals and human subjects, the homeostasis-linked functional competence of the immune system in the adult age improves after diet supplementation with appropriate amounts of antioxidants such as vitamin C, vitamin E, thiol antioxidants and polyphenols [162-164].

Since the favorable action of the antioxidants on the immune system is expressed in an increase of the functions that are depressed and a decrease of those that are excessively active, the antioxidants can not be considered general immunostimulants. In fact they may bring each immune function and redox state to its optimum, thus acting as immunomodulators [165]. This modulating ability appears to be focused at the level of the ubiquitous intracellular factors implicated in oxidation and inflammation, such as the NF- κ B [112].

This regulatory role of the antioxidants would be performed not only on the immune system, but also on the other regulatory systems, including the nervous system, in which the oxidative stress also underlies its senescent impairment. Thus, as a matter of fact it is accepted that the antioxidants play a role in the recovery of a great number of nervous functions [21]. Moreover, in the PAM the ingestion of thiolic antioxidants not only improves the immune function, but also the behavioral response [100,145]. Moreover, interestingly, this immune "rejuvenation" as well as the improvement of the nervous system is apparent in the laboratory mice showing the greatest longevity [4,5]. In unpublished work from our laboratory we have also found that chronologically old mice and PAM with an antioxidant supplemented diet (a mixture of antioxidants, such as vitamin C, vitamin E, β -carotene, zinc and selenium, in very little amount, and TP and NAC) show a significant increase in their life span. According to a recent review, antioxidants able to neutralize free radicals at their sites of production in the mitochondria such as NAC and alpha-lipoic acid, although unable to increase the species-characteristic maximum life span, may increase mean individual longevity [140].

The results obtained in the immune system of humans after diet supplementation with antioxidants are due to a decrease of the oxidative stress in these cells, in a similar way to that observed in leukocytes from mice. Since the improvements in the immune functions found with antioxidant supplementation are similar in humans and mice, and because these changes in mice are accompanied by an increase in life span, it is probable that similar effects could be obtained in humans (Fig. 5 and 7).

Role in Aging of Glutathione (GSH) and Other Sulfuric Antioxidants that Increase Its Levels: Unpublished Results on the Direct Effect of these Antioxidants on the Immune Cells from Old Mice

The oxidant-antioxidant imbalance in aging can be reflected in a deficiency of GSH, an antioxidant that has a relevant role in aging. GSH is the most abundant non-protein thiol in mammalian cells, in which it is essential for survival [166]. This tripeptide shows many important cellular functions, among which we can mention its role regulating enzymatic activity and especially as redox buffer maintaining a given thiol/disulfide redox potential and protecting the cell against oxidants [167]. Since all cell functions depend to a high degree on the redox reactions of the thiol compounds, the preservation of adequate levels of GSH or of other thiolic or sulfuric compounds during aging is essential for an adequate activity of cells in general and especially for those of the nervous and immune systems, and therefore for health of the aging subjects. Studies performed in aged experimental animals and elderly people showed a decrease in the GSH levels, in plasma, blood, organs and immune cells [78,147,168]. In fact it has been shown that the organelles and cells of the aged animals contain less GSH than those of the young, and this decrease becomes more striking at the age when mortality shows a marked increase. Thus, the administration of GSH, because of its protective effect against the oxidative stress of the DNA of mitochondria and the GSH loss in these organelles with age, is able to increase life expectancy in laboratory animals [36]. Some work carried out

AGE-RELATED CHANGES IN FUNCTION AND OXIDATIVE AND INFLAMMATORY STATE PARAMETERS IN IMMUNE CELLS FROM ELDERLY MEN AND WOMEN AND FROM CHRONOLOGICALLY OLD MICE AND PREMATURELY AGING MICE (PAM). EFFECT OF THE INGESTION OF ANTIOXIDANTS

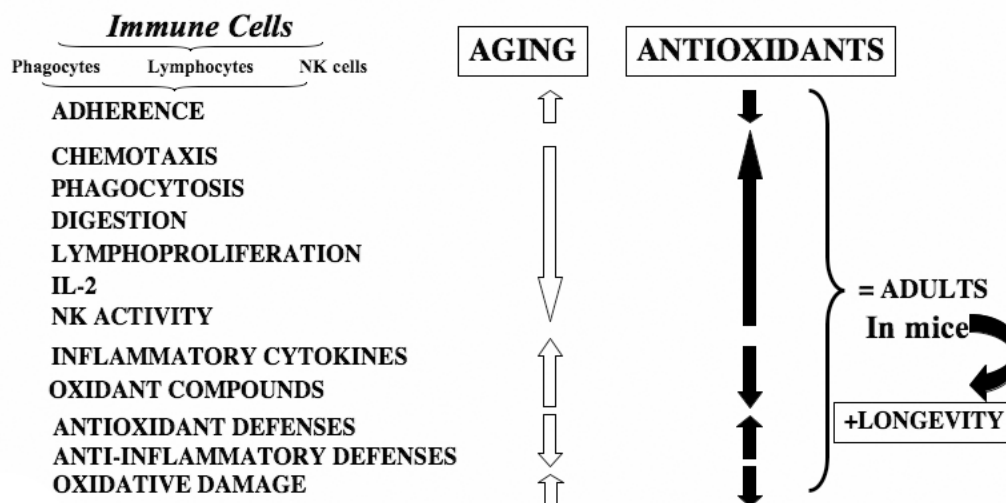


Fig. (7). Role of antioxidants on the function, redox and inflammatory state of immune cells with aging. The age-related changes in the function and redox parameters of the immune cells are modulated by the ingestion of appropriate amounts of antioxidants that bring the values of these parameters, in elderly humans and in chronologically old or prematurely aging experimental animals, closer to those in the corresponding adult subjects or non-prematurely aging controls. In mice, the animals ingesting antioxidants in the diet show an increase in their longevity. The information of the figure summarizes the results obtained in the laboratory of De la Fuente with respect to the effects of antioxidants on the aging immune system. In elderly men and women, we have studied the effect of Vitamin C and vitamin E ingested for 4 or 3 months (1000mg/day or 500mg/day of vitamin C and 200 mg/day of vitamin E) [4,79,146,] and NAC (600mg/day for 2 and 4 months) [147]. In old mice, administration of TP (0.07% or 0.1%w/w) for 9 months [150] and for 5 weeks [151]. In PAM, intake for 5 weeks of TP [152] NAC [148,149] and of TP+NAC (0.1%w/w) [154,155]. The amount of these thiolic antioxidants needed to have a favourable effect is higher in aged than in adult mice [153]. Further, administration of a mixture of antioxidants (vitamin C, vitamin E, β -carotene, zinc and selenium) for 5 weeks [156-158], polyphenol-rich cereals [159] and soybean isoflavones [82,160] also improves the parameters studied.

by us shows that the administration by diet of antioxidants that increase the levels of GSH such as TP and NAC, improves the immune function in chronologically aged humans and experimental animals, as well as in PAM [147-155]. The responsible intracellular mechanism could be the regulation of the activation of NF κ B. In fact we have observed that NAC decreases the activation of this factor in immune cells [111,112] and we have also described that intracellular GSH deficiency is associated with enhanced NF κ B activation in older non-insulin dependent diabetic patients [169].

Based on the above and on previous results obtained by us studying the effect *in vitro* of thiolic antioxidants on macrophages and NK cells from adult mice [170-172] and NK cells from old mice [173], we carried out an experiment *in vitro* to test the effects of TP (1 mM, the concentration most effective in the previous studies) on several functions of lymphocytes from axillary nodes, spleen and thymus of old Swiss mice. Moreover, we used in parallel GSH (5 mM, which was also the most effective concentration in the previous experiments) to compare the effect of both antioxidants. The results are shown in Table 5. As can be seen both antioxidants, TP and GSH, increase the spontaneous mobility, the directed mobility to the infectious focus (chemotaxis) and the proliferative response to the mitogen concanavalin A (ConA) in leukocytes from the three immune organs. In all

cases the values become close to those seen in cells from adult animals, a response similar to that found in our previous work on those lymphocyte functions studied *in vivo* in old Swiss mice fed with a diet supplemented with TP [150,151]. The effect of both antioxidants is similar in the immune functions studied. Thus we can suggest that the effects observed *in vivo* on the immune function after supplementation with TP are due to the direct action of this antioxidant, and those effects could be mediated, at least in part, by the increase of GSH in the immune cells. Moreover, as can be seen in Table 6, those concentrations of GSH and TP increase significantly the viability of leukocytes from axillary nodes, spleen and thymus throughout 72 hours of culture, and the differences with respect to the controls increase with the time of incubation, the GSH being the most effective.

Confirmation of the Oxidation-Inflammation Theory

The above mentioned oxidation-inflammation theory of aging can be supported by all those results with antioxidants, since the administration of adequate amounts of antioxidant compounds in the diet is a strategy of environmental conditions, including life style, which allows to break the vicious circle of the oxi-inflamm-aging. Thus, the oxidative and inflammatory stress, that appears to play a fundamental role in

Table 5. Effect *In Vitro* of GSH (5 mM) and TP (1 mM) on the Mobility (Spontaneous and Directed or Chemotaxis) and Proliferative Response to the Mitogen ConA in Lymphocytes from Axillary Nodes, Spleen and Thymus of old Swiss Mice

	Old Mice			Adult Mice
	Old controls	GSH	TP	Adult Controls
Axillary Nodes				
Spontaneous mobility	235±55	325±76 ^{*c}	376±89 ^{**c}	491±134 [#]
Chemotaxis	282±56	366±94 ^{*c}	396±85 ^{**c}	942±122 [#]
Proliferation to ConA	0.267±0.058	0.524±0.114 ^{***a}	0.464±0.118 ^{***c}	0.618±0.080 [#]
Spleen				
Spontaneous mobility	256±59	423±108 ^{***}	390±91 ^{**}	468±96 [#]
Chemotaxis	356±92	453±107 ^c	481±93 ^{*c}	757±190 [#]
Proliferation to ConA	0.463±0.059	0.633±0.163 ^{***}	0.809±0.130 ^{***c}	0.635±0.102 [#]
Thymus				
Spontaneous mobility	240±56	422±87 ^{***}	402±73 ^{***}	461±88 [#]
Chemotaxis	418±67	531±100 ^{*c}	494±63 ^{*c}	693±153 [#]
Proliferation to ConA	0.392±0.060	0.526±0.101 ^{***}	0.511±0.073 ^{***}	0.524±0.082 [#]

Each value is the mean±SD of 12 experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 with respect to the corresponding controls. [#]p<0.001 with respect to the old controls. ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001 with respect to the adult controls. The methods carried out for analyzing the functions indicated have been previously described [151]. Spontaneous mobility and chemotaxis are expressed as number of cells _____ [151]; Proliferation as absorbance.

Table 6. Effect *In Vitro* of GSH (5 mM) and TP (1 mM) on the Viability (%) of Lymphocytes from Axillary Nodes, Spleen and Thymus of Old Swiss Mice at Different Time of Culture

Time (h)	Antioxidant	Axillary Nodes	Spleen	Thymus
1 h	Controls	86 ± 6	96 ± 3	93 ± 6
	GSH	92 ± 3 ^{**}	96 ± 3	98 ± 2 [*]
	TP	89 ± 4	97 ± 3	96 ± 2
4 h	Controls	82 ± 5	85 ± 6	91 ± 6
	GSH	89 ± 5 [*]	92 ± 4 ^{**}	97 ± 2 [*]
	TP	87 ± 6	94 ± 5 ^{**}	96 ± 3 [*]
6 h	Controls	82 ± 3	79 ± 7	88 ± 7
	GSH	88 ± 4 [*]	86 ± 7 ^{**}	91 ± 7 [*]
	TP	84 ± 3	88 ± 6 ^{**}	90 ± 6 [*]
24 h	Controls	68 ± 8	73 ± 7	71 ± 9
	GSH	79 ± 8 [*]	84 ± 3 ^{***}	77 ± 8 ^{**}
	TP	70 ± 9	80 ± 6 ^{**}	76 ± 7 [*]
48 h	Controls	33 ± 10	64 ± 9	56 ± 10
	GSH	72 ± 7 ^{***}	76 ± 7 ^{**}	66 ± 8 ^{**}
	TP	63 ± 12 ^{**}	72 ± 6 ^{**}	66 ± 8 ^{**}
72 h	Controls	23 ± 7	51 ± 11	24 ± 7
	GSH	67 ± 12 ^{***}	70 ± 6 ^{**}	55 ± 14 ^{***}
	TP	53 ± 7 ^{***}	65 ± 5 ^{**}	34 ± 7 ^{**}

Each value is the mean±SD of 8 experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 with respect to the corresponding controls. The cellular viability was evaluated by the trypan-blue exclusion test [170].

the aging of the immune system and other regulatory systems, can be counteracted to certain degree by antioxidant administration. In view of all the above it seems reasonable to propose that an adequate antioxidant diet supplementation may be a useful procedure to slow down the age-related homeostatic impairment and thus improve the health and biological age of subjects and increase their longevity (Fig. 5).

CONCLUSIONS AND FUTURES RESEARCH

In summary, aging is a loss of homeostasis related to a chronic oxidative stress, i.e. to an imbalance in the antioxidant/oxidant levels with an increase in ROS production and a decrease in antioxidant defenses. This chronic oxidative stress injures cells and all physiological systems, but the effects are more evident in the regulatory systems, such as nervous, endocrine and immune systems that allow the maintenance of homeostasis in the organism and therefore preserve health. This alteration could explain the impaired homeostasis that leads to an increase in the morbidity and mortality of aging. Focusing on the immune system, it produces oxidants and inflammatory compounds in its daily work, and if its function is not well regulated it can go into a vicious circle that maintains the state of chronic oxidative and inflammatory stress, and consequently increases the rate of aging of organisms. Thus, we propose an oxidation-inflammation theory of aging, or oxi-inflamm-aging, in which the immune system could have an important role. Moreover, an adequate nutrition, with antioxidant supplementation can neutralize in part the oxidative and inflammatory stress and the vicious circle of oxidation produced by the immune cells. More research is needed in order to provide further support for our hypothesis. The study of age-related genes is presently a focus of attention for much research, and this is an excellent subject of study. However, we propose also to investigate how epigenetic mechanisms acting on genes cause the loss of homeostasis, and the rate of this loss, since it is different for each subject. Moreover, we have to elucidate how the environment factors affect this rate from fetal life throughout the life of the subject. This seems the best way to be able to slow down the unavoidable aging process in each subject (Fig. 1).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Hernanz for his critical revision of the article, and also express their gratitude to Dr. Del Rio, Dr. Ferrandez, Dr. Correa, Dr. Medina, Dr. Victor, Dr. Vallejo, Dr. Guayerbas, Dr. Puerto, Dr. Alvarado, Dr. Alvarez, Dr. Alonso, Dr. Gimenez-Llort, Ms Sanchez, Ms De Castro, Ms Vida, Ms Maté, Ms Arranz and Ms Baeza for their invaluable help in performing the experiments which have allowed us to arrive at the ideas expressed in this article. This work was supported by grants of the MEC (BFU 2005-06777), MCINN (BFU2008-04336), Research Group of UCM (910379ENEROINN) and RETICEF (RD06/0013/0003) (ISCIII).

ABBREVIATIONS

AD = Alzheimer's disease
An-I = Anti-inflammatory compounds
Ax = Antioxidants

cAMP = Cyclic adenosine monophosphate
CAT = Catalase
DAG = Diacylglycerol
GPx = Glutathione peroxidase
GR = Glutathione reductase
GSH = Reduced glutathione
GSSG = Oxidized glutathione
HO = Hydroxyl radical
H₂O = Water
H₂O₂ = Hydrogen peroxide
IL = Interleukin
IP3 = Inositol triphosphate
MAPK = Mitogen-activated protein kinase
mtDNA = mitochondrial DNA
NAC = N-acetylcysteine
NFκB = Nuclear factor kappa B
NK = Natural killer cells
NPAM = Non-prematurely aging mice
O₂ = Molecular oxygen
O₂⁻ = Superoxide anion radical
PAM = Prematurely aging mice
PAMPs = pathogen-associated molecular patterns
P-I = Pro-inflammatory compounds
PKC = Protein kinase C
ROS = Reactive oxygen species
SIRT1 = Sirtuin 1
SOD = Superoxide dismutase
TNFα = Tumor necrosis factor-alpha
Tc = Lymphocytes T cytotoxic
Th = Lymphocyte T helper
TP = Thioproline
Treg = Lymphocyte T regulator
TLR = Toll-like receptor
XO = Xantin oxidase

REFERENCES

References 174-176 are related articles recently published.

- [1] Medawar PB. An unresolved problem of Biology. In: *The Uniqueness of the Individual*. London: Methuen 1957.
- [2] Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980; 15: 575-91.
- [3] Miquel J, Fleming JE. Theoretical and experimental support for an oxygen radical-mitochondrial damage hypothesis of cell aging. In: Johnson JE Jr, Harman D, Walford R, Miquel J, Eds. *Free radicals, aging and degenerative diseases*. New York: Alan R Liss 1986; pp. 51-74.
- [4] De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo, MC. The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favor-

- able effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1356-66.
- [5] De la Fuente M. Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 213-23.
- [6] Strehler BL. Time, cells and aging. New York: Academic Press 1977.
- [7] Kirkwood TBL, Feder M, Finch CE, Franceschi C, Globerson A, Klingenberg ChP, *et al.* What accounts for the Wide variation in life span of genetically identical organisms reared in a constant environment?. *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 439-43.
- [8] Workshop Report. Aging-from molecules to population. *Mech Ageing Dev* 2008; 129: 614-23.
- [9] Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* 1990; 65: 375-98.
- [10] Carnes BA, Staats DO, Sonntag WE. Does senescent give rise to disease?. *Mech Ageing Dev* 2008; 129: 693-9.
- [11] Viña J, Borrás C, Miquel J. Critical review: theories of aging. *IUBMB Life* 2007; 59: 249-54.
- [12] Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36.
- [13] Goyns MH. Genes, telomeres and mammalian ageing. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 791-9.
- [14] Pearl R. The rate of living. London: University of London Press 1928; 50.
- [15] Weissman A. Essays upon heredity and kindred biological problems. London-New York: Oxford University Press-Clarendon 1891.
- [16] Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1100: 1-13.
- [17] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 2: 298-300.
- [18] Gerschman R. Man's dependence on the earthly atmosphere. In: Schaeffer KS, Ed. *Proc 1st Symp Submarine and Space Medicine*. New York: MacMillan 1962; p. 475.
- [19] Harman D. The biological clock. The mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 1972; 20: 99-117
- [20] Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 2004; 27: 595-600.
- [21] Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Viña J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 2000; 32: 189-98.
- [22] Miquel J. An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat Res* 1992; 275: 209-16.
- [23] Pamplona R, Barja G. Aging rate, mitochondrial free radical production, and constitutive sensitivity to lipid peroxidation: insights from comparative studies. In: von Zglinicki T, Ed. *Aging Molecular Level*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers 200; pp. 47-64.
- [24] Miquel J, Economos AC, Johnson JE Jr. A systems analysis-thermodynamic view of cellular and organismic aging. In: Johnson JE Jr, Ed. *Aging and cell structure*. New York: Plenum Press 1984; vol. 2: pp. 247-80.
- [25] Beckman K, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-81.
- [26] Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem* 1986; 25: 1058-71.
- [27] Knight JA. Review: free radicals, antioxidants, and immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30: 145-58.
- [28] Yoon SO, Yun ChH, Cheng AS. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev* 2002; 50: 1-8.
- [29] Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 1998; 33: 113-26.
- [30] Miquel J, Oro J, Bensch KG, Johnson JE, Jr. Lipofuscin: fine structural and biochemical studies. In: Pryor W, Ed. *Free Radicals in Biology*. New York: Academic Press 1977; vol. 3: pp. 133-82.
- [31] Miquel J, Lundgren PR, Johnson JE. Spectrophotometric and electron microscopic study of lipofuscin accumulation in the testis of aging mice. *J Gerontol* 1978; 33: 5-19.
- [32] Miquel J, Lundgren PR, Bensch KG, Atlan H. Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 1976; 5: 347-70.
- [33] Miquel J, Binnard R, Fleming J. Role of metabolic rate and DNA repair in *Drosophila* aging: implications for the mitochondrial mutation theory of cell aging. *Exp Gerontol* 1983; 18: 167-71.
- [34] Fleming JE, Miquel J. Effects of temperature on the metabolic rate of *Drosophila*. *Experientia* 1983; 39: 267-8.
- [35] Fleming JE, Quatrocki E, Miquel J, Marcuson R, Zuckerkandl E, Bensch KG. Age dependent changes in proteins of *Drosophila melanogaster*. *Science* 1986; 231: 1157-59.
- [36] Miquel J, Ecnomos AC. Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidin carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol* 1979; 14: 279-85.
- [37] Ferrandiz ML, Martínez M, De Juan E, Diez A, Bustos G, Miquel J. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in the brain of aged mice. *Brain Res* 1994; 644: 335-38.
- [38] Linnane AW, Ozawa T, Marzuki S, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1989; i: 64-5.
- [39] Kowald A, Kirkwood TBL. Accumulation of defective mitochondria through delayed degradation of damaged organelles and its possible role in the aging of fixed post-mitotic and dividing cells. *J Theor Biol* 2000; 202: 145-60.
- [40] Miquel J. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr* 1991; 12: 99-117.
- [41] Minot CS. The problem of age, growth and age. *Pop Sci Monthly* 1907; 71: 509-27.
- [42] Williams GC. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 1957; 2: 397-411.
- [43] Muller M. Cellular senescence: molecular mechanisms, *in vivo* significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 59-98.
- [44] Kirkwood TBL, Holliday R. The evolution of aging and longevity. *Proc R Soc London* 1979; 205: 531-46.
- [45] McFarland RA. Human factors in air transportation: occupational health and safety. New York: McGraw-Hill 1953.
- [46] Finkel D, Whitfiel K, McGue M. Genetic and environmental influences on functional age: a twin study. *J Gerontol B Psicol Sci Soc Sci* 1995; 50: P104-113.
- [47] Borkan A, Norris AH. Assessment of biological age using a profile of physical parameters. *J Gerontol* 1980; 35: 177-84.
- [48] Bae ChY, Kang YG, Kim S, Cho Ch, Kang HCh, Yu BY, *et al.* Development of models for predicting biological age (BA) with physical, biochemical, and hormonal parameters. *Arch Gerontol Geriatr* 2008; 47: 253-65.
- [49] Wayne SL, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 1990; 45: M45-48.
- [50] Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and non-survivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995; 50: B378-82.
- [51] Yong-Xing M, Yue Z, Zan-Shun W, Shu-Qi Ch, Zi-Jun L, Jian-Gang Z, *et al.* Physiological basis for long life span. *Mech Ageing Dev* 1997; 98: 47-55.
- [52] Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, *et al.* Natural killer cells in the later decades of human life. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84: 269-75.
- [53] Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002; 37: 249-56.
- [54] Guayerbas N, Catalan M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* 2002; 134: 41-48
- [55] Guayerbas N, De La Fuente M. An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol* 2003; 27: 339-50.
- [56] De la Fuente M. The immune system as a marker of health and longevity. *Antiaging Med* 2004; 1: 31-41.
- [57] De la Fuente M. Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56: S5-8.
- [58] Kulinsky VI. Biochemical aspects of inflammation. *Biochemistry* 2007; 72: 595-607.
- [59] Csiszar A, Wang M, Lakatia EG, Ungvari Z. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. *J Appl Physiol* 2008; 105: 1333-41.
- [60] Lobby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* 2007; 65: S140-6.
- [61] Yuan H, Zheng JC, Liu P, Zhang SF, Xu JY, Bai LM. Pathogenesis of Parkinson's disease: oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory process. *Neurosci Bull* 2007; 23: 125-30.

- [62] Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 572-81.
- [63] Franceschi C. Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured?. *Nutr Rev* 2007; 65: S173-76.
- [64] Ostan R, Bucci L, Capri M, Salvioli S, Scurti M, Pini E, Monti D, Franceschi C. Immunosenescence and immunogenetic of human longevity. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 224-43.
- [65] Besedovsky HO, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrin Rev* 1996; 17: 64-102.
- [66] High KP. Infection as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing Res Rev* 2004; 3: 1-14.
- [67] Ortega E, García JJ, De la Fuente M. Ageing modulates some aspects on the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes. *Exp Physiol* 2000; 85: 519-25.
- [68] Sebastian C, Espia M, Serra M, Celada A, Lloberas J. Macrophage Aging: a cellular and molecular review. *Immunobiol* 2005; 210: 121-6.
- [69] Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of aging. *J Pathol* 2007; 211: 144-56.
- [70] Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* 2007; 120: 435-46.
- [71] Kumar R, Burns EA. Age-related decline in immunity: implications for vaccine responsiveness. *Expert Rev Vaccines* 2008; 7: 467-79.
- [72] Castle SC, Uyemura K, Fulop T, Makinodan T. Host resistance and immune responses in advanced age. *Clin Geriatr Med* 2007; 23: 463-79.
- [73] Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, *et al.* T cells and aging. *Front Biosci* 2002; 7: d1056-d83.
- [74] Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, *et al.* The number of human peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 540-46.
- [75] Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J, Mysliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans-impact of immunosenescence. *Clin Immunol* 2006; 119: 307-16.
- [76] Solana R, Pawelec G, Tarazona R. Aging and innate immunity. *Immunity* 2006; 24: 491-94.
- [77] Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quagliano D. The immune system in the elderly III. Innate immunity. *Immunol Res* 1999; 20: 117-26.
- [78] De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Álvarez P, Alvarado C. Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol* 2004; 50: 683-90.
- [79] De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F. Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic Res* 2008; 42: 272-80.
- [80] Gomez CR, Nomellini V, Frunce DE, Kovacs EJ. Innate immunity and aging. *Exp Gerontol* 2008; 43: 718-28.
- [81] De la Fuente M. Changes in the macrophage function with aging. *Comp Biochem Physiol* 1985; 81: 935-38.
- [82] Baeza I, De Castro NM, Arranz L, De la Fuente M. Expression of Toll-like receptors on peritoneal macrophages and dendritic cells from old mice treated with soybean isoflavones and green tea. *P Nutr Soc* 2008; 67 (OCE): E27.
- [83] Lord JM, Butcher S, Killampali V, Lascelles D, Salmon M. Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 1521-35.
- [84] Rafi A, Castle SC, Uyemura K, Makinodan T. Immune dysfunction in the elderly and its reversal by antihistaminas. *Biomed Pharmacother* 2003; 57: 246-50.
- [85] Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 2004; 5: 133-39.
- [86] Wrona D. Neural-immune interactions: An integrative view of bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* 2006; 172: 38-58.
- [87] Besedovsky HO, Del Rey A. Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun* 2007; 21: 34-44.
- [88] Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J Immunol* 1984; 132: 1067-70.
- [89] Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M. Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res* 2007; 62: 1-8.
- [90] Hernanz A, Bayon J, Bisbal E, Sanchez M, De la Fuente M. Leukocyte functions are altered in patients with depressive disorder. *J Neuroimmunol* 2008; 197: 167.
- [91] Arranz L, De Vicente A, Muñoz M, De la Fuente M. Impairment of immune function in the social excluded homeless population. *Neuroimmunomodulation* 2009. In press.
- [92] Barak Y. The immune system and happiness. *Autoimmun Rev* 2006; 5: 523-27.
- [93] Merrill JE. Production and influence of inflammatory cytokines in diseases of the adult central nervous system. In: Ader R, Felten DL, Cohen N, Ed. *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press 2001; pp. 547-61.
- [94] Smith RG, Betancourt L, Sun Y. Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system. *Endocr Rev* 2005; 26: 203-50.
- [95] Bellinger DL, Madden KS, Lorton D, Thyagarajan S, Felten DL. Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in immunosenescence. In: Ader R, Felten DL, Cohen N, Ed. *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press 2001; pp. 241-86.
- [96] Fabris N. A neuroendocrine-immune theory of aging. *Int J Neurosci* 1990; 51: 373-75.
- [97] McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialog Clin Neurosci* 2006; 8: 367-81.
- [98] Bauer ME. Chronic stress and immunosenescence. A review. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 244-53.
- [99] Gouin JP, Hantsoo L, Kiecolt-Glaser JK. Immune dysregulation and chronic stress among older adults: a review. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 254-62.
- [100] Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14: 157-62.
- [101] De la Fuente M, Del Rio M, Medina S. Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J Neuroimmunol* 2001; 116: 156-67.
- [102] De la Fuente M, Medina S. NPY and phagocytic cell functions. In: Zukowska Z, Feuerstein GZ, Eds. *The NPY Family of Peptides in Immune Disorders, Inflammation, Angiogenesis and Cancer*. Basel/Switzerland: Birkhäuser Verlag 2005; pp. 107-22.
- [103] Puerto M, Guayerbas N, Alvarez, P, De la Fuente M. Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leukocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol* 2005; 165: 33-40.
- [104] Pawelec G. Immunity and ageing in man. *Exp Gerontol* 2006; 41: 1239-42.
- [105] Alonso-Fernandez P, Puerto M, Maté I, Ribera JM, De la Fuente M. Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of adults. *J Am Geriatr Soc* 2008; 56: 2244-51.
- [106] Meydani SN, Wu D. Age-associated inflammatory changes: role of nutritional intervention. *Nutr Rev* 2007; 65: S213-16.
- [107] Hirokawa K. Age-related changes of signal transduction in T cells. *Exp Gerontol* 1999; 34: 7-18.
- [108] De la Fuente M, Del Rio M, Victor VM, Medina S. Neuropeptide Y effects on murine natural killer activity. Changes with aging and cAMP involvement. *Regul Pept* 2001; 101: 73-79.
- [109] Garcia GG, Sadighi AA, Millar RA. Age-related defects in moesin/serrin cytoskeletal signals in Mouse CD4 T cells. *J Immunol* 2007; 179: 6403-09.
- [110] Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-71.
- [111] Victor VM, De la Fuente M. Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF-kappaB. *Free Radic Res* 2003; 37: 19-27.
- [112] Victor VM, Rocha M, Esplugues JV, De la Fuente M. Role of free radicals in sepsis: Antioxidant therapy. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 3141-58.
- [113] Gwinn MR, Vallyathan V. Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health* 2006; 9: 27-39.
- [114] Trebilcock GU, Ponnappan U. Evidence for lowered induction of nuclear factor kappa B in activated T lymphocytes during aging. *Gerontology* 1996; 42: 137-46.
- [115] Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Activation of innate immunity system during aging:

- NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. Ageing Res Rev 2008; 7: 83-105.
- [116] Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K. SIRT 1 longevity factor suppresses NF- κ B-driven immune responses: regulation of aging *via* NF- κ B acetylation?. Bioessays 2008; 30: 939-42.
- [117] De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. Exp Mol Pathol 2006; 80: 219-27.
- [118] De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, *et al.* Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. Biogerontology 2004; 5: 389-400.
- [119] Viña J, Sastre J, Pallardo FV, Gambini J, Borras C. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders. Protective effect of estrogens. Free Radic Res 2006; 40: 1359-65.
- [120] Nieman DC, Henson DA, Nehlsen-Cannarella SL, Ekkens M, Utter AC, Butterworth DE, *et al.* Influence of obesity on immune function. J Am Diet Assoc 1999; 99: 294-9.
- [121] Marcos A, Nova E, Montero A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. Eur J Clin Nutr 2003; 57: 566-69.
- [122] Lamas O, Marti A, Martinez JA. Obesity and immunocompetence. Eur J Clin Nutr 2002; 56: 542-45.
- [123] Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, *et al.* Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. Eur Cytokine Netw 2006; 17: 4-12.
- [124] Heneka MT, O'Banion MK. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. J Neuroimmunol 2007; 184: 69-91.
- [125] Sonnen JA, Breitner JC, Lovell MA, Markesbery WR. Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models. Free Radic Biol Med 2008; 45: 219-30.
- [126] Gimenez-Llort L, Arranz L, Maté I, De la Fuente M. Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's Disease and its relation with longevity. Neuroimmunomodulation 2008; 15: 331-43.
- [127] Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, Barbi C, Bonafé M. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. Exp Gerontol 1999; 34: 911-21.
- [128] De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. FEBS Lett 2005; 579: 2035-9.
- [129] Ferencik M, Stvrtnova V, Hulin I, Novak M. Inflammation-a life-long companion. Attempt at a non-analytical holistic view. Folia Microbiol 2007; 52: 159-73.
- [130] Walford L. The Immunologic Theory of Aging. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland 1969; 70-75.
- [131] Meister M. Blood cells of *Drosophila*. cell lineages and role in host defence. Curr Opin Immunol 2004; 16: 10-5.
- [132] Lavina MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol 2002; 32: 1295-309.
- [133] Tirouvanzian R, Davidson CJ, Lipsick JS, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of *Drosophila* hemocytes reveals important functional similarities to mammalian leukocytes. Proc Natl Acad Sci 2003; 101: 2912-7.
- [134] Manaka J, Kuraishi T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Higashida H, Henson P, *et al.* Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. J Biol Chem 2004; 279: 48466-76.
- [135] Crozatier M, Meister M. *Drosophila* haematopoiesis. Cell Microbiol 2007; 9: 1117-26.
- [136] Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. Toll-like receptor signal transduction. Exp Mol Med 2007; 39: 421-38.
- [137] McCoy CE, O'Neill LA. The role of toll-like receptors in macrophages. Front Biosci 2008; 13: 62-70.
- [138] Vijg J, Müller WEG. The science of aging and the need for a mechanistic approach. Mech Ageing Dev 2000; 114: 1-3.
- [139] Fossati G, Moulding DA, Spiller DG, Moots RJ, White MRH, Edwards SW. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. J Immunol 2003; 170: 1964-72.
- [140] Miquel J. Can antioxidant diet supplementation protect against age-related mitochondrial damage? Ann NY Acad Sci 2002; 959: 508-16.
- [141] Cutler RG. Antioxidants and aging. Am J Clin Nutr 1991; 53: 373S-9.
- [142] Orr WC, Sohal R. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. Science 1994; 263: 1128-30.
- [143] Barja G. Mammalian and bird aging, oxygen radicals, and restricted feeding. In Model Systems in Aging. New York: Springer 2004; pp. 173-89.
- [144] Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R. Oxidative stress, human genetic variation and disease. Arch Biochem Biophys 2001; 389: 84-93.
- [145] Guayerbas N, Puerto M, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. Thiolic antioxidant supplementation of the diet reverses age-related behavioral dysfunction in prematurely ageing mice. Pharmacol Biochem Behav 2005; 80: 45-51.
- [146] De la Fuente M, Ferrández MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A, Miquel J. Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. Can J Physiol Pharmacol 1998; 76: 373-80.
- [147] Arranz L, Fernandez C, Rodriguez A, Ribera JM, De la Fuente M. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. Free Radic Biol Med 2008; 45: 1252-62.
- [148] Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, De la Fuente M. Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. Pharmacol Biochem Behav 2002; 73: 797-804.
- [149] Guayerbas N, Puerto M, Alvarado C, De la Fuente M. Effect of diet supplementation with N-acetylcysteine on leukocyte functions in prematurely ageing mice. J Appl Biomed 2005; 3: 199-205.
- [150] De la Fuente M, Ferrández MD, Muñoz F, De Juan E, Miquel J. Stimulation by the antioxidant thioproline of the lymphocyte functions of old mice. Mech Ageing Dev 1993; 68: 27-36.
- [151] De la Fuente M, Ferrández MD, Del Rio M, Burgos MS, Miquel J. Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline. Mech Ageing Dev 1998; 104: 213-25.
- [152] Correa R, Blanco B, Del Rio M, Victor V, Guayerbas N, Medina S, *et al.* Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. Biofactors 1999; 10: 195-200.
- [153] De la Fuente M, Guayerbas N, Catalán MP, Victor VM, Miquel J. The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve the immune functions is higher in aged than in adult mice. Free Radic Res 2002; 36: 119-26.
- [154] Guayerbas N, Puerto M, Ferrandez MD, De la Fuente M. A diet supplemented with thiolic antioxidants improves leukocyte function in two strains of prematurely ageing mice. Clin Exp Pharmacol Physiol 2002; 29: 1009-14.
- [155] Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, De la Fuente M. Improvement of the macrophage functions in premature ageing mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. Cell Mol Biol 2004; 50: OL677-OL81.
- [156] Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L, De la Fuente M. Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. Antioxid Redox Signal 2005; 7: 1203-10.
- [157] Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausserés N, Jimenez L, De la Fuente M. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. Nutrition 2006; 22: 767-77.
- [158] Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L, De la Fuente M. Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants. Dev Comp Immunol 2006; 30: 1168-80.
- [159] Alvarez P, Alvarado C, Puerto M, Schlumberger A, Jimenez L, De la Fuente M. Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals. Nutrition 2006; 22: 913-21.
- [160] Baeza I, De Castro NM, Alvarado C, Alvarez P, Arranz L, Bayon J, *et al.* Improvement of immune cell functions in aged mice treated for 5 weeks with soybean isoflavones. Ann N Y Acad Sci 2007; 1100: 497-504.
- [161] Hernanz A, Collazos ME, De la Fuente M. Effect of age, culture media and lymphocyte presence in ascorbate content of peritoneal macrophages from mice and guinea pigs during phagocytosis. Int Arch Allergy Appl Immunol 1990; 91: 166-70.

- [162] Blanco B, Ferrández MD, Correa R, Del Rio M, Guaza C, Hernanz A, *et al.* Changes in several functions of murine peritoneal macrophages by N-acetylcysteine and thioproline ingestion. Comparative effect between two strains of mice. *Biofactors* 1999; 10: 179-85.
- [163] De la Fuente M, Carazo M, Correa R, Del Rio M. Changes in macrophage and lymphocyte functions in guinea-pigs after different amounts of vitamin E ingestion. *Brit J Nutr* 2000; 84: 25-29.
- [164] Alvarez P, Alvarado C, Mathieu F, Jimenez L, De la Fuente M. Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leukocytes. *Eur J Nutr* 2006; 45: 428-38.
- [165] De la Fuente M, Victor VM. Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 49-54.
- [166] Viña JR. *Glutathione: Metabolism and Physiological Function*. CRC Press Boston 1990.
- [167] Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 916-21.
- [168] Hernanz A, Fernández-Vivancos E, Montiel C, Vázquez JJ, Arnalich F. Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci* 2000; 67: 1317-24.
- [169] Arnalich F, Hernanz A, López-Maderuelo M, De la Fuente M, Arnalich FM, Andrés-Mateos E, *et al.* Intracellular glutathione deficiency is associated with enhanced nuclear factor- κ B activation in older non-insulin dependent diabetic patients. *Free Radic Res* 2001; 35: 873-84.
- [170] Del Rio M, Ruedas G, Medina S, Victor VM, De la Fuente M. Improvement by several antioxidants of macrophage function *in vitro*. *Life Sci* 1998; 63: 871-81.
- [171] Correa R, Del Rio M, De la Fuente M. Improvement of murine immune functions *in vitro* by thioproline. *Immunopharmacology* 1999; 44: 281-91.
- [172] Pomaki M, Mota MJ, De la Fuente M, Berger J. Effect of thiolic antioxidants on *in vitro* mouse peritoneal macrophage functions. *Comp Clin Pathol* 2005; 13: 176-81.
- [173] Ferrández MD, Correa R, Del Rio M, De la Fuente M. Effects *in vitro* of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 1999; 34: 675-85.
- [174] Amadio M, Scapagnini G, Laforenza U, Intriери M, Romeo L, Govoni S, *et al.* Post-transcriptional regulation of HSP70 expression following oxidative stress in SH-SY5Y cells: the potential involvement of the RNA-binding protein HuR. *Curr Pharm Des* 2008; 14(26): 2651-8.
- [175] Hyogo H, Yamagishi S. Advanced glycation end products (AGEs) and their involvement in liver disease. *Curr Pharm Des* 2008; 14(10): 969-72.
- [176] Unoki H, Yamagishi S. Advanced glycation end products and insulin resistance. *Curr Pharm Des* 2008; 14(10): 987-9.

Received: April 15, 2009

Accepted: April 18, 2009



Models of Aging of Neuroimmunomodulation: Strategies for Its Improvement

Mónica De la Fuente^a Lydia Gimenez-Llort^b

^aDepartment of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, and ^bDepartment of Psychiatry and Forensic Medicine, Institut de Neurosciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

© S. Karger AG, Basel

**PROOF Copy
for personal
use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Key Words

Immunosenescence · Premature aging · Enriched environments

Aging Process, Biological Age Concept and Longevity

Abstract

Communication between the nervous and the immune systems suffers impairment with aging, which explains the altered homeostasis and the resulting increase of morbidity and mortality in aged subjects. In humans, rats and specially in mice, we have proposed several models to study this fact. The established models of premature aging have been mice and humans with poor response to stress and anxiety versus subjects of the same chronological age without that characteristic, isolation, males versus females, menopausal models (in rodents after ovariectomy) and obesity. In all cases, the prematurely aged animals suffer an alteration of the nervous system (shown by behavioral tests) and immunosenescence as well as oxidative and inflammatory stress, which is followed by early mortality. In addition, in the above-mentioned models and in normal chronological aging, we have observed the effect of several lifestyle strategies, such as ingestion of adequate amounts of antioxidants, performance of moderate physical exercise, and different kinds of environmental enrichment, which improve the function of the immune cells and their redox state as well as animal behavior. Therefore, they retard the aging process and seem to increase the longevity of the individuals.

The universal process of aging may be defined as a progressive and general decrease of organism functions that leads to a lower ability to adaptively react to changes and preserve homeostasis. This accumulation of adverse changes with the passing of time, although they should not be considered a disease, strongly increases the risk of disease and finally results in death. However, the aging process is very heterogeneous and, thus, there are different rates of physiological changes in the various systems of the organism and in the diverse members of a population of the same chronological age. This justifies the introduction of the concept of 'biological aging', which determines the level of aging experienced by each individual and therefore his life expectancy. Thus, biological age is related to mean longevity, which can be defined as the mean of the time that the members of a population that have been born on the same date live. Subjects of a population with a higher rate of aging show an older biological age and a shorter life span.

Although many single-cause theories have been proposed to explain the aging process, an integrated theory of aging has also been recently published [1]. In answer to the question 'how' does aging happen, we propose that the aging process is a chronic oxidative stress condition (increase of oxidant compounds and decrease of antioxi-

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2010 S. Karger AG, Basel
1021-7401/10/0173-0213\$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/nim

Prof. Mónica De la Fuente, PhD
Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biology
Complutense University of Madrid
José Antonio Novais 2, ES-28040 Madrid (Spain)
Tel. +34 91 394 4989, Fax +34 91 394 4935, E-Mail mondelaf@bio.ucm.es

dant defenses), which is linked to many age-related changes that affect a large number of parameters including morphology, physiology and behavior at all levels of organization: molecular, cellular, tissue, organic and that of the whole individual. In addition, since emerging evidence shows a close link between oxidation and inflammation, and with aging the pro-inflammatory compounds increase to levels higher than those of the anti-inflammatory compounds, leading to inflammatory stress, an oxi-inflamm-aging has been proposed as the cause of the loss of function that appears with senescence [1].

Neuroendocrine-Immune Communication in Aging: Role of the Immune System in Loss of Homeostasis of Aging

With aging there is an impairment of the physiological systems in which the regulatory systems, namely the nervous, endocrine and immune systems, are the most affected as well as neuroendocrine-immune communication. Moreover, we have to realize that aging of the immune and neuroendocrine systems are interdependent processes [2]. Thus, age-related alterations of the regulatory systems lead to loss of homeostasis and therefore to the increase in morbidity and mortality that appears with age [1, 3] (fig. 1). Although the proposed concept of homeorrhexis, which refers to the fact that the set point of homeostasis changes during the different phases of life, including aging [2], is acceptable, it is evident that the level of homeostasis established in aged subjects is not very appropriate to confirm adequate functions. In fact, only aged individuals that maintain functional parameters healthy at the levels of adults reach very high longevity [1].

In addition, age-related changes are linked to chronic oxidative and inflammatory stress affecting all cells of the organism and specially those of the regulatory systems, which explains their impaired function [3]. Moreover, the immune system, due to its capacity of producing oxidant and inflammatory compounds in order to eliminate foreign agents, could be involved with the rate of aging if its age-related oxidative and inflammatory stress is not controlled. Thus, the changes in the immune system with age, denominated immunosenescence, could accelerate aging of the organism. In this context, a relation between the redox and inflammatory state of the immune cells, their functional capacities and the life span of the subjects has been proposed [1, 3] (fig. 1). In fact,

human centenarians show levels of oxidative stress and function similar to those in adults (30-year-old) and lower oxidative stress and better function than those found in 70-year-old subjects in their immune cells [4]. Similar findings have been obtained on very long-lived mice [5].

Models for the Study of Aging of Neuroimmunomodulation

Support for the above-mentioned hypotheses may be obtained by the study of animal models in which subjects have an altered nervous system, with abnormal behavior parameters, immunosenescence as well as a great oxidative and inflammatory stress in its immune cells, and decreased longevity. In this context, we have investigated the following models (fig. 1):

Models of Poor Response to Stress, Anxiety and Depression in Mice and Humans

We have established a model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence [6]. The premature aging mice (PAM) show, with respect to non-PAM (NPAM) of the same chronological age, an impaired behavioral response with increased levels of anxiety, deficient immune function, oxidative stress and decreased life span [6]. A model of depression in mice has been proposed based on isolation of females in old age. These animals show altered behavior, immunosenescence and oxidative stress. Moreover, human subjects with stress-related disorders and suffering from anxiety or depression show a significant immunosenescence and oxidative stress [7].

Males versus Females

In mammalian species, females have a longer mean life span than males, which seems to be an effect of their less oxidized condition, in part due to the estrogens. Thus, we have observed this different life expectancy both in rats and mice, and that immune functions are better in females than males. Moreover, the redox state of female leukocytes is better than that of males [1, 8].

Menopausal Models

Menopausal women as well as ovariectomized rats and mice (a good model for mimicking human menopause) show premature immunosenescence and high oxidative stress situation [1, 8, 9]. This premature aging model in mice is also confirmed by alterations of several behavior parameters [unpubl. data].

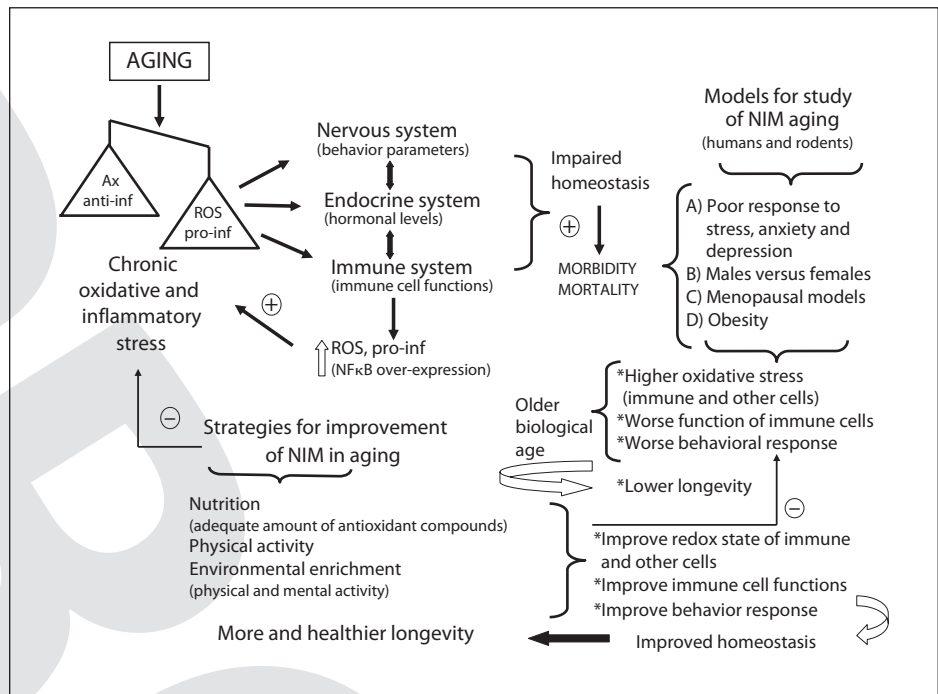


Fig. 1. Aging is a chronic oxidative stress condition affecting all cells, especially those of the regulatory systems, i.e. the nervous, endocrine and immune system, and the communication among them. This explains the impaired homeostasis and the increased morbidity and mortality found in old age. In humans and rodents we have proposed several models for the study of aging of neuroimmunomodulation (NIM). Animals with poor response to stress, anxiety and depression, males versus females, females with menopause/ovariectomy, and subjects with obesity show high oxidative stress in the immune and other cells, and impaired im-

mune cell functions and behavioral responses. Thus, they have an older biological age and consequently show lower longevity. Several lifestyle strategies, such as adequate ingestion of antioxidant compounds, the performance of physical activity and appropriate environmental enrichment, improve immune functions, redox state and behavioral responses. Thus, they retard the aging process, improving homeostasis and increasing the longevity of the individuals. Ax = Antioxidant compounds; anti-inf = anti-inflammatory compounds; ROS = reactive oxygen species; pro-inf = pro-inflammatory compounds.

Obesity Models

Obese subjects, compared to nonobese subjects of the same chronological age, show worse immune functions and high oxidation-inflammation stress, which have been observed in both genetically and diet-induced obese rats [1].

Strategies for the Improvement of Neuroimmunomodulation in Aging

The oxidation-inflammation theory of aging is supported by work on the above-mentioned different models. Moreover, the basis of the age-related deterioration of the homeostatic systems and their communication is the chronic oxidative stress, and this is increased more or less depending, in part, on the degree of control of

oxidation and inflammation of the immune system of each subject, which is related to the function capacity of its immune cells [1]. Therefore, it is convenient to test the effects of strategies based on improving several lifestyle environmental factors to retard the aging process, analyzing immune cell functions and their redox state. Further, the study of behavior parameters could give a more convincing confirmation of the proposed theory (fig. 1).

Role of a Diet Enriched with Antioxidants

In experimental animals and human subjects, the ingestion of a diet enriched with adequate amounts of antioxidants has been shown to be useful for maintaining an optimum redox balance, decreasing oxygen stress in immune cells and improving their function. Moreover, in mice, the ingestion of antioxidant improves the nervous

function and consequently the behavior response. Since these effects are similar in mice and humans and because these changes in mice are accompanied by an increase in life span, it is probable that a similar effect could be obtained in humans [1, 3, 9]. We have also observed these effects in the mice anxiety model of PAM [6].

Role of Physical Activity

A moderate physical activity improves immune cell function and the redox state in both humans and rodents. Moreover, a moderate amount of physical exercise increases the level of antioxidant defenses in the immune cells [10].

Role of Environmental Enrichment

Enriched environments by intellectual and/or physical activities have been found to slow down many adverse effects of aging. Two different kinds of environmental enrichment have been used on mice to study their effect on behavior, immune cell functions, oxidation state and longevity. One of the environmental enrichments consisted of diverse objects of different shapes and colors (changed every 2 days) placed in the cages. The animals submitted to this strategy of lifestyle show an improvement in behavior parameters, immune functions and redox state. Moreover, their longevity was increased. A new environ-

mental enrichment strategy for improvement in behavior, immune cell functions and redox state in mice has been hydrotherapy (bath for 15 min, 5 days a week for 2 or 4 weeks) (fig. 1).

Conclusions

There are several animal models for studying the aging of neuroimmunomodulation and confirming the role of the immune system in oxi-inflamm-aging. In these models, the subjects with worse behavior responses, immune functions and redox state show premature aging and early mortality. Several lifestyle strategies such as a better nutrition with adequate amounts of antioxidant compounds, mental and physical activity, and social relations seems useful to improve nervous and immune functions as well as the redox state and therefore retard the unavoidable aging process and increase the longevity of those subjects (fig. 1).

Support

MCINN (BFU2008-04336); Research Group UCM (910379); RETICEF (RD06/0013/0003).

References

- 1 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 Design* 2009;15:in press.
- 2 Goya RG: The immune-neuroendocrine homeostatic network and aging. *Gerontology* 1991;37:208–213.
- 3 De la Fuente M: Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:213–223.
- 4 Alonso-Fernandez P, Puerto M, Maté I, Ribera JM, De la Fuente M: Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J Am Geriatr Soc* 2008;56:2244–2251.
- 5 Puerto M, Guayerbas N, Alvarez P, De la Fuente M: Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol* 2005;165:33–40.
- 6 Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M: A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14: 157–162.
- 7 Arranz L, De Vicente A, Muñoz M, De la Fuente M: Impairment immune function in a homeless population with stress-related disorders. *Neuroimmunomodulation* 2009; 16:251–260.
- 8 De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, F-Tresguerres JA: Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology* 2004;5:389–400.
- 9 Arranz L, Fernandez C, Rodriguez A, Ribera JM, De la Fuente M: The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Rad Biol Med* 2008;45:1252–1262.
- 10 De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo MC: The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension: favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxidants Redox Signals* 2005;7:1356–1366.

The 3rd International Immunonutrition Workshop was held at Platja D'Aro, Girona, Spain on 21–24 October 2009

3rd International Immunonutrition Workshop

Session 9: Food ingredients, immunity and inflammation: animal and *in vitro* models

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

Mónica De la Fuente*

Department of Physiology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

Several immune functions are markers of health, biological age and predictors of longevity. A chronic oxidative and inflammatory state is the main cause of ageing and the immune system is involved in the rate of ageing. Thus, several murine models of premature ageing have been proposed owing to their early immunosenescence and oxidative stress, such as ovariectomised rats and mice, obese rats and anxious mice. In the last model, the most extensively studied by us, mice showing anxiety have an aged immune function and redox status as well as a shorter longevity in comparison with animals without anxiety of the same chronological age, being denominated prematurely ageing mice. A confirmation of the above is that the administration of diets supplemented with antioxidants improves the redox status and immune functions and increases the longevity of prematurely ageing mice. Antioxidant precursors of glutathione such as thioproline or N-acetylcysteine, which have a relevant role in ageing, have been the most widely investigated in adult prematurely ageing mice in our laboratory. In the present work, we have studied the effects of the ingestion for 5 weeks of a diet supplemented with 0.1% (w/w) thioproline+N-acetylcysteine on several functions of leucocytes from chronological old (69–73 weeks of age) prematurely ageing mice of two strains (Swiss and BALB/c). The results show an improvement of the immune functions, with their values becoming closer to those in adult animals (24 ± 2 weeks). Thus, an adequate nutrition with antioxidants, even in aged subjects, could be a good strategy to retard ageing.

Ageing: Immunosenescence: Leucocyte functions: Antioxidants

The ageing process and the concepts of biological age and longevity

The ageing process may be defined as a progressive and general deterioration of the functions of the organism that leads to a lower ability to adaptively react to changes and preserve homeostasis. As Strehler pointed out, four rules can define ageing. It is universal (practically all animals suffer ageing), progressive (the rate of ageing is similar at different ages after reaching the adult state), intrinsic

(its cause is endogenous) and deleterious (at least for individuals since it leads to their death)⁽¹⁾. Although the accumulation of adverse changes with the passing of time should not be considered a disease, it strongly increases the risk of disease, and finally results in death.

The ageing process is highly heterogeneous, and thus, there are different rates of physiological changes in the various systems of the organism and in the diverse members of a population of the same chronological age. This justifies the introduction of the concept of 'biological

Abbreviations: GSH, reduced glutathione; NAC, N-acetylcysteine; NK, natural killer; NPAM, non-prematurely ageing mice; PAM, prematurely ageing mice; TP, thioproline.

*Corresponding author: Professor Mónica De la Fuente, fax +34 913944935; email mondelaf@bio.ucm.es

ageing', which determines the level of ageing experienced by each individual and therefore his/her life expectancy. The biological age is related to the mean longevity, which can be defined as the mean of the time that the members of a population who have been born on the same date live. Subjects of a population with a higher rate of ageing show an older biological age and have a shorter lifespan. Since chronological age fails to provide an accurate indicator of the ageing process, it is necessary to select parameters useful as biomarkers of ageing to find out the rate of ageing and therefore the probable longevity of each subject⁽²⁾.

An integrated theory of ageing: how, where and why of ageing

Almost 400 single-cause theories have been proposed to explain the ageing process⁽³⁾, giving only partial explanation for the causes and effects of ageing. Recently, an integrated theory has been published⁽²⁾ attempting to answer the three important questions of biogerontology: the 'how', the 'where' and the 'why' of ageing. In answer to the question 'how' ageing happens, it is proposed that the ageing process is a chronic oxidative stress condition (increase of oxidant compounds and decrease of antioxidant defences). Thus, it is linked to many age-related changes that affect a large number of parameters including morphology, physiology and behaviour at all levels of organization: molecular, cellular, tissue, organic and that of the whole individual. In addition, since emerging evidence shows the close link between oxidation and inflammation, and since with ageing the pro-inflammatory compounds increase to levels higher than those of the anti-inflammatory compounds, leading to inflammatory stress, an oxidative and an inflammatory state have been suggested as the cause of the loss of function that appears with senescence⁽²⁾. To answer 'where' the ageing process starts, it is proposed that this happens in the mitochondria of post-mitotic and differentiated cells. With respect to 'why' ageing happens, the answer seems to be found in several evolutionary theories and related concepts published a long time ago. Hence, ageing is a consequence of characteristics selected by evolution as an advantage for the young subjects of the species allowing them to reach the reproductive age in the best condition and thus preserve the species. However, these characteristics are a disadvantage for old subjects (not needed for species maintenance). An example is the expression of more pro-oxidant and pro-inflammatory genotypes, which allow the reaching of the reproductive age with more probability since the subjects are more able to survive infections. The consequence after adult age is the establishment of what has been called 'oxi-inflamm-ageing'⁽²⁾.

Immunosenescence: the immune system as a marker of biological age and predictor of longevity

Ageing is associated with an impairment of physiological systems including the immune system, which has evolved to protect individuals against infections and cancers.

In fact, with the passage of time there is an increase of infectious and cancerous processes, which exert a great influence on the age-related morbidity and mortality^(4,5). Indeed, the increased death rate found in aged populations is due in great proportion to infections^(5,6). The profound impact of ageing on immunity is presently accepted. Thus, although there are contradictory results, almost every component of the immune system undergoes striking age-associated re-structuring. This leads to changes that may include not only diminished, but also enhanced functions. Therefore, the changes of the immune system with ageing are termed immunosenescence. Despite the rapidly increasing amount of data on immunosenescence in the last few decades^(2,7-11), the puzzle of all the changes in the different aspects of the immune function with age has not yet been solved. Nevertheless, the pronounced age-related decrease in T-cell functions is evident, specially in the T-cell helper, which affects humoral immunity and causes an impaired B-cell function^(2,7). In the cells of innate immunity, the phagocytic cells show functions that decrease with ageing and others that are over activated^(2,11-13), whereas the anti-tumoral activity of natural killer (NK) cells, in most of the work, shows an age-related decrease^(2,11,14).

In addition, it has been demonstrated that the competence of the immune system is an excellent marker of health^(2,4,8,15,16) and several age-related changes in immune functions, such as low T-cell proliferative responses, IL-2 secretion and NK cell cytotoxicity, have been linked to longevity^(2,15,16). In previous studies, the earlier-mentioned functions and other immune functions, in lymphocytes and phagocytes, have been established as markers of biological age and therefore as predictors of longevity^(2,13,16,17). These functions have shown similar age-related changes in human subjects (studied from the adult age of 20 until 80, in leucocytes of peripheral blood), and in mice (throughout the life of these animals, with a mean life span of 2 years, in their peritoneal leucocytes)⁽²⁾. In order to identify the above parameters as markers of biological age, it is necessary to confirm that the levels shown in particular subjects reveal their real health and senescent conditions. This has been achieved in the following two ways: (A) Ascertain that the individuals with those parameters showing levels older than those of most subjects of the same population, sex and chronological age, die before their counterparts. This can be confirmed only in experimental animals. (B) Finding that the subjects reaching a very advanced age, preserve these immune functions at levels similar to those of adults. This can be tested on both humans (centenarians) and experimental animals, such as extremely long-lived mice. While biologically older animals showing the immune competence levels characteristic of chronologically older individuals have been found to die prematurely^(2,17), centenarians and long-lived mice exhibit a high degree of preservation of several immune functions, which may be related to their ability to reach a very advanced age in a healthy condition^(2,13,18-20). All the above results confirm that the immune system is a good marker of biological age and a predictor of longevity. Moreover, since the evolution of these immune functions is similar in mice and human subjects, it can be assumed that

those human subjects showing immune parameters at the levels of older subjects have a higher biological age and a shorter longevity⁽²⁾.

Neuro-endocrine-immune communication in ageing. The role of the immune system in oxi-inflamm-aging and in the age-related loss of homeostasis

The immune system does not work alone, since the three regulatory systems, namely the nervous, the endocrine and the immune systems, are intimately linked and interdependent. Thus, there is a 'neuroendocrine-immune' system that allows the preservation of homeostasis and therefore of health^(21,22). The communication between these systems has allowed the understanding of why situations of depression, emotional stress and anxiety are accompanied by a greater vulnerability to infections, cancers and autoimmune diseases, which agrees with the concept that the immune system is affected^(2,23,24).

The impairment of physiological systems with ageing especially affects the three regulatory systems and their communication. This seems to justify the loss of homeostatic capacity and the resulting increase of morbidity and mortality that appears with ageing^(2,16). In addition, the age-related changes in the organism are linked to a chronic oxidative and inflammatory stress affecting all cells and especially those of the regulatory systems, which explains their impaired function^(2,16). Thus, immunosenescence has as its basis an oxidative and inflammatory stress situation, and the theory of oxidation-inflammation in ageing, recently proposed^(2,16), integrates the idea of 'inflamm-aging'⁽²⁵⁾ with the oxidation theory of ageing^(2,16). According to this theory, chronic oxidative and inflammatory stress lead to the damage of cell components, including proteins, lipids and DNA, contributing to the age-related decline of physiological functions, especially in cells of the regulatory systems, including the immune system. Moreover, the immune system, due to its capacity of producing oxidant and inflammatory compounds in order to eliminate foreign agents, could be involved with the rate of ageing, increasing oxidation and inflammation, if the age-related oxidative and inflammatory stress are not well controlled^(2,16). In this context, a relationship has been found between the redox and inflammatory state of the immune cells, their functional capacity and the lifespan of a subject. Thus, when an animal shows a high-oxidative stress in its immune cells, these cells have an impaired function and that animal shows a decreased longevity. This happens in chronologically and biologically older human subjects and mice^(2,17). On the contrary, subjects who achieve greater longevity, such as human subject centenarians and extremely long-lived mice, show a preserved redox state and immune functions^(2,13,19,20). One of the most relevant mechanisms involved in the cellular redox state is the NF- κ B. This transcription factor plays a key role in regulating the expression of a wide range of oxidants and inflammatory compounds, especially in the immune cells, and increases in many chronic inflammatory diseases. In fact, it has been observed that the NF- κ B activation, in resting conditions, is very high in leucocytes

from old mice, but lower in extremely long-lived mice and adult animals⁽¹⁹⁾. Moreover, only old subjects with controlled basal NF- κ B activation in leucocytes achieved longevity. Adults with a high basal expression of this factor, died early⁽¹⁹⁾.

In conclusion, only aged individuals who maintain a good regulation of the leucocyte redox state and consequently a good function of their immune cells, with levels similar to those of healthy adults, reach very high longevity. Thus, the immune system seems to be a good predictor of longevity^(2,19,20).

Murine models of premature immunosenescence

Support for the above oxidation-inflammation theory of ageing and especially for the role of the immune system in ageing, may be obtained by the study of animal models in which subjects showing premature immunosenescence and a high oxidative and inflammatory stress in their immune cells (and in other cells), show decreased longevity in relation to other members of the group of the same chronological age. In this context, several murine models, such as the following, have been investigated and developed during the last few years as novel approaches to assess premature ageing and the above-mentioned idea.

Menopausal models

Menopausal women as well as ovariectomised rats and mice (a good model for mimicking human menopause) constitute a model for assessing premature ageing, since they show premature immunosenescence and a high oxidative stress condition^(2,26-28). Thus, ovariectomised female rats and mice show a redox state and function in leucocytes similar to those in males^(2,27). In mammalian species, males have a higher oxidative state and a worse function in their immune cells than those of females, having a lower mean life span than the latter^(2,27,29). This fact is due to oestrogens resulting in a less oxidized condition⁽³⁰⁾.

Obesity models

Obese subjects show a higher incidence of infections and some types of cancer, suggesting an impaired immune function. In general, the scarce studies on the immunity state in obese compared to non-obese subjects of the same chronological age, show a worse immune function, which have been observed in both genetically and diet-induced obese rats^(2,31-33). Moreover, obesity is associated with an inflammatory state⁽³²⁾, and immune cells from obese rats show premature immunosenescence as well as an oxidative stress situation^(2,33).

Models of poor response to stress, anxiety and depression

It is accepted that an inadequate response to stress is one of the conditions leading to an acceleration of ageing, accompanied by an impaired immune system and other physiological systems^(2,16,17). Thus, it has been shown that mice with chronic hyper-reactivity to stress and anxiety show a premature immunosenescence, a higher oxidative

stress and a shorter lifespan. These animals show premature ageing⁽¹⁷⁾, and this model will be explained in more detail later. Recently, it has also been observed that mice exposed to the stressful condition of isolation have behavioural responses that reveal a certain degree of depression and a more evident immunosenescence than control animals of the same age housed in groups⁽³⁴⁾. In addition, human subjects suffering chronic anxiety or depression show a significant premature immunosenescence and oxidative stress^(23,24).

Model of prematurely ageing mice

A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence has been established⁽¹⁷⁾. The animals are termed prematurely ageing mice (PAM), in contrast to the non-prematurely ageing mice (NPAM) of the same population, sex and chronological age, are identified by their poor response in a simple T-maze exploration test. This provides strong support for the concept that the nervous and the immune systems are closely linked. In mice showing premature ageing, it has been observed that several immune functions were similar to those of chronologically older mice. In addition to a more significant immunosenescence, the PAM exhibited high levels of anxiety and emotionality, showing a brain neurochemistry characteristic of older animals and an oxidative stress situation. Moreover, PAM also had increased baseline corticosterone and a blunted stress response when compared to NPAM. Nevertheless, the most convincing evidence that the immune function parameters studied are useful markers of biological age, is that the PAM showed a shorter lifespan than their NPAM counterparts^(2,16,17).

Effects of a diet supplemented with antioxidants in ageing and immunosenescence

Ageing cannot be 'eliminated', it can only be mitigated, i.e. making the process slower. Since the base of the functional longevity of each subject is health maintenance, and this depends on the genes (approximately 25%) and on the lifestyle and environmental factors (75%), it is possible to retard the rate of ageing through the modulation of these factors such as nutrition⁽²⁾. Among all the aspects that can be considered good nutrition, the antioxidant compounds present in the diet seem to be the most effective. As mentioned above, ageing is the result of a chronic oxidative stress with an oxidant-antioxidant imbalance due to an excess of the oxidants and a decrease or impairment of the antioxidant defences⁽²⁾. In fact, a confirmation of this is the age-related decrease of several antioxidants^(26,35) as well as the increase of longevity in animals that received these antioxidants in their diet^(36,37).

Moreover, nutritional status has a marked effect on immune response in elderly individuals⁽³⁸⁾. Since the functional state of the immune system is a marker of health, biological age and a predictor of longevity, it would be convenient to test the effects of a strategy such as diets rich in antioxidant compounds to retard the ageing process,

analysing immune cell functions and their redox state as well as the mean longevity of the subjects. The administration of antioxidants could prevent the age-related imbalance of oxidants-antioxidants in the immune cells. Nevertheless, it should be considered that the immune cells need to produce oxidants to carry out their functions and thus, they may exhaust their reserves of antioxidants⁽²⁾. This could help to explain why, in both adult experimental animals and human subjects, the functional capacities of the immune cells improve after diet supplementation with the appropriate amount of antioxidants⁽²⁾. It is evident that the amount of antioxidants needed by the immune cells in old subjects is higher than that in adults, since these cells show an age-related impairment of redox regulation with a higher production of oxidants and lower levels of antioxidant defences^(2,39). Thus, the administration of compounds such as vitamins C and E, polyphenols and precursors of reduced glutathione (GSH; taurine, thioproline (TP) and N-acetylcysteine (NAC), among others) in isolation, in nutritional formulations or through food rich in these compounds, has been shown to improve the immune functions and decrease the oxidative stress in leucocytes and in other cells of the organism⁽²⁾. These effects have been shown in adults, but especially in prematurely ageing subjects and in chronologically elderly men, women and mice^(2,11,16,26). Moreover, the confirmation of the central role of the immune system in oxidant-ageing is that the administration of adequate amounts of antioxidants in the diet, increases the longevity of the subjects⁽²⁾. This has been observed in experimental animals such as mice with a lifespan of 2 years. Since the improvement in the immune function and redox state found with antioxidant supplementation is similar in human subjects and mice, and because these changes in mice are accompanied by an increase in lifespan, it is probable that similar effects could be observed in human subjects. These antioxidants seem to have a direct effect on the immune cells since they improve the same immune cell and redox parameters *in vitro* as well as *ex vivo* after their ingestion in the diet⁽²⁾.

The effects of the dietary supplementation with antioxidants on immune cell functions and their redox state have been observed in several of the models of premature ageing mentioned earlier. The results found with mice suffering anxiety, the premature ageing model previously mentioned, will be discussed in the next section. In the murine model of ovariectomy, an improvement of several immune functions by a five-week ingestion of a diet enriched (1 mg/mouse/d) in soyabean isoflavones and green tea has been observed in ovariectomised old mice⁽⁴⁰⁾. This agrees with the overall observation that any positive change in the diet is more effective in improving immune response in subjects of a biological older population^(2,16,17).

Effects of a diet supplemented with antioxidants on a model of prematurely ageing mice

In the model of PAM the effect of a diet supplemented with appropriate amounts of antioxidants on many

immune functions and oxidative stress parameters, which were previously accredited as markers of biological age, has been extensively studied⁽¹⁷⁾. A dietary supplementation of biscuits enriched with nutritional doses of vitamin C and E, zinc, selenium and β -carotenes, for 15 weeks, with both 5% and 20% (w/w), improves the function and redox balance of peritoneal immune cells from chronologically adult (27–31 weeks of age) and mature (48–52 weeks of age) PAM and NPAM animals. However, the effects were stronger in PAM, and 20% supplementation was more effective than 5%^(17,41). This supplementation with 20% of biscuits enriched with antioxidants also improved the functions and redox balance of the immune cells from chronologically young (16–20 weeks of age) PAM after only 5 weeks of ingestion^(42,43). Moreover, a supplementation with 20% (w/w) of polyphenol-rich cereals, for 5 weeks, improved the immune cell functions in young (16–20 weeks of age) PAM⁽⁴⁴⁾.

The type of antioxidant supplementation most frequently studied in PAM and NPAM has been that using sulphur-containing antioxidants that are precursors of GSH⁽¹⁷⁾. These antioxidants have been shown to increase longevity^(36,37). GSH is the most abundant non-protein thiol in mammalian cells, being considered essential for their survival, and with an important role in many biological processes⁽²⁾. An increase in the levels of GSH reinforces antioxidant protection, preserves the intracellular redox state and the cellular function^(2,26,35). Therefore, optimal immune functions, such as T-cell proliferation among others, will require proper levels of GSH^(2,26,35). In previous studies, it has been observed that GSH stimulates many immune functions *in vitro* and protects cells against apoptosis⁽²⁾. The two antioxidant GSH precursors most often studied and used in the present work have been TP and NAC. TP is an antioxidant present in mitochondria, which can increase the levels of GSH⁽³⁷⁾ and thus increases the longevity^(36,37). Although this is an aspect very little studied, in previous investigations, it has been shown that TP *in vitro* improves several functions of immune cells from mice, as well as the activity of antioxidant enzymes⁽²⁾. In aged mice, the supplementation with TP (0.07 (w/w), for 5 weeks) improved several immune functions⁽⁴⁵⁾. NAC is an antioxidant that acts as a GSH precursor^(26,35) and also neutralizes free radicals in a direct manner. This antioxidant action has been observed in immune cells from mice with endotoxemic shock, a situation of high oxidative stress⁽⁴⁶⁾. NAC *in vitro* increases several functions of peritoneal macrophages from adult mice in a similar way to GSH, as well as the activity of antioxidant enzymes⁽²⁾. In elderly women, the ingestion of NAC improves several immune functions and the redox state⁽²⁶⁾.

In adult PAM, the supplementation of a diet with TP (0.1% (w/w) for 5 weeks) improves the peritoneal macrophage functions⁽⁴⁷⁾ and the same occurs with the supplementation with NAC⁽⁴⁸⁾. When the diet contains both TP and NAC (0.1% (w/w)), the supplementation for 4–5 weeks improves the function of immune cells in Swiss and BALB/c mice^(49,50).

Effects of a diet supplemented with two sulphur-containing antioxidants (thioprolin and N-acetylcysteine), precursors of reduced glutathione, on several leucocyte functions in old prematurely ageing mice of two strains

In previous studies, it has been shown that the ingestion of a diet supplemented with TP+NAC (0.1% (w/w)) by adult female Swiss and BALB/c mice for a short period of time (4–5 weeks) improves several immune functions such as chemotaxis, lymphoproliferative response to the mitogen concanavalin A, IL-2 release and NK activity in leucocytes from peritoneum, axillary nodes, spleen and thymus^(39,49). In the present work, it has been investigated whether this supplementation with 0.1% of TP+NAC for 5 weeks could be enough in chronologically old (69–73 weeks of age) PAM Swiss and BALB/c mice to improve those immune functions to the level of adult (22–26 weeks of age) animals.

Female mice of the Swiss and BALB/c strains (Harlan, Iberica, Spain) 20–24 weeks of age were maintained in sterile conditions at a constant temperature (20–24°C) on a 12/12 reversed light–dark cycle and fed water and Standard Sander Mus pellets (A.04 diet; Panlab LS, Barcelona, Spain) *ad libitum* until the moment of starting the experiment. At 64–68 weeks of age, the exploratory behaviour of each mouse was tested in a T-shaped maze. As previously described⁽¹⁷⁾, the mice that completed the exploration of the first arm of the maze four times in more than 20 s (once each week for 4 consecutive weeks) are considered PAM and those that spent less than that time are NPAM. At 69–73 weeks of age, eight groups of 10 animals each were used. In each strain, 10 PAM and 10 NPAM received a diet (A.04 diet; Panlab) supplemented with 0.1% (w/w) of both TP and NAC (Sigma, San Louis, MO, USA) for 5 weeks (PAMA and NPAMA, respectively). Two other groups of 10 PAM and 10 NPAM, of both strains, received a normal diet (PAMC and NPAMC, respectively) during that time. After 5 weeks, the mice were killed by cervical dislocation according to the European Community Council Directives 86/6091 EEC and the axillary nodes, spleen and thymus were removed. In parallel, a group of adult (20–26 weeks of age) Swiss and BALB/c mice were sacrificed.

The leucocyte suspensions from organs were obtained and the functions studied were evaluated following methods previously described⁽⁴⁹⁾. The chemotaxis was evaluated using a chamber with two compartments separated by a filter. The samples of leucocytes were deposited in the upper compartment and the chemoattractant (f -met-leu-phe, 10^{-8} mol/l) in the lower compartment. After 3 h incubation, the filters were fixed and stained and the number of leucocytes found in four scans of 5 mm each on the lower face of the filter was determined and nominated the chemotaxis index. The proliferation of lymphocytes was determined using a commercially available 5-bromo-2'-deoxyuridine ELISA (BrdU labelling and detection kit III; Boehringer, Mannheim, Germany). The leucocytes were incubated for 48 h in the absence (basal proliferation) or presence of the mitogen concanavalin A (1 mg/ml; Sigma). The absorbance of the samples (measured at

Table 1. Effect of a diet supplemented with two sulphur-containing antioxidants (thioprolone (TP) and N-acetylcysteine (NAC); 0.1% (w/w) for 5 weeks) on several functions of axillary node leucocytes from chronologically old prematurely and non-prematurely aged Swiss and BALB/c mice

(Mean values and standard deviations for 10 subjects)

	NPAMC		NPAMA		PAMC		PAMA		AC	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Swiss mice										
Chemotaxis	441	91 ^c	934	167***	260	64 ^{c†}	808	187***	860	120
Basal proliferation (absorbance)	0.18	0.02	0.17	0.05	0.15	0.05 ^a	0.16	0.02 ^b	0.21	0.03
Proliferation to Con A (absorbance)	0.36	0.06 ^c	0.50	0.09***	0.25	0.06 ^{c†}	0.62	0.06***	0.61	0.13
NK activity (lysis %)	28	6 ^c	36	4**	22	4 ^c	35	5**	44	5
IL-2 release (pg/ml)	152	39 ^c	210	36**	108	20 ^{c†}	143	40*	329	57
BALB/c mice										
Chemotaxis	474	106 ^c	898	158***	257	45 ^{c††}	638	161***	782	111
Basal proliferation (absorbance)	0.08	0.02 ^{b††}	0.09	0.03	0.07	0.01 ^{b††}	0.07	0.01	0.17	0.03†
Proliferation to Con A (absorbance)	0.33	0.04 ^c	0.46	0.09**	0.19	0.05 ^{c††}	0.26	0.04**	0.58	0.10
NK activity (lysis %)	25	3 ^c	41	6***	20	3 ^{c†}	34	4***	58	7†
IL-2 release (pg/ml)	226	24 ^{c††}	565	62***	149	23 ^{c††}	727	133***	418	66†

NPAM, non-prematurely ageing mice; PAM, prematurely ageing mice; NPAMC and PAMC, NPAM and PAM controls; NPAMA and PAMA, NPAM and PAM with antioxidant supplementation; AC, adult controls; Con A, concanavalin A; NK, natural killer.

The data were analysed statistically by the three-way ANOVA for unpaired observations, followed by the Scheffe's *F post-hoc* test. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001 with respect to the corresponding values in controls (NPAMC and PAMC). ^a*P*<0.05; ^b*P*<0.01; ^c*P*<0.001 with the corresponding values in adults. †*P*<0.05; ††*P*<0.001 with respect to the corresponding values in NPAMC. ‡*P*<0.05; ‡‡*P*<0.01 with respect to the corresponding values in Swiss mice.

Table 2. Effect of a diet supplemented with two sulphur-containing antioxidants (thioprolone (TP) and N-acetylcysteine (NAC); 0.1% (w/w) for 5 weeks) on several functions of spleen leucocytes from chronologically old prematurely and non-prematurely aged Swiss and BALB/c mice

(Mean values and standard deviations for 10 subjects)

	NPAMC		NPAMA		PAMC		PAMA		AC	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Swiss mice										
Chemotaxis	439	91 ^c	811	102***	343	80 ^{c†}	670	167***	718	139
Basal proliferation (absorbance)	0.19	0.01 ^b	0.20	0.05	0.16	0.02 ^{c††}	0.32	0.06***	0.23	0.04
Proliferation to Con A (absorbance)	0.40	0.08 ^b	0.41	0.07	0.22	0.05 ^{c†††}	0.46	0.09***	0.54	0.07
NK activity (lysis %)	21	3 ^c	28	3*** ^b	18	4 ^c	26	3*** ^b	45	8
BALB/c mice										
Chemotaxis	478	106 ^c	915	160***	282	93 ^{c††}	802	188***	874	175
Basal proliferation (absorbance)	0.12	0.04 ^{c††}	0.13	0.03 ^{b††}	0.12	0.03 ^{c††}	0.16	0.06†	0.20	0.03
Proliferation to Con A (absorbance)	0.31	0.07 ^{b†}	0.50	0.12**	0.21	0.07 ^{c††}	0.46	0.10***	0.43	0.07††
NK activity (lysis %)	25	5 ^c	38	5*** ^{b†}	16	2 ^{c†††}	30	3***	60	11†††

NPAM, non-prematurely ageing mice; PAM, prematurely ageing mice; NPAMC and PAMC, NPAM and PAM controls; NPAMA and PAMA, NPAM and PAM with antioxidant supplementation; AC, adult controls; Con A, concanavalin A; NK, natural killer.

The data were analysed statistically by the three-way ANOVA for unpaired observations, followed by the Scheffe's *F post-hoc* test. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001 with respect to the corresponding values in controls (NPAMC and PAMC). ^b*P*<0.01; ^c*P*<0.001 with the corresponding values in adults. †*P*<0.05; ††*P*<0.01; †††*P*<0.001 with respect to the corresponding values in NPAMC. ‡*P*<0.05; ‡‡*P*<0.01; ‡‡‡*P*<0.001 with respect to the corresponding values in Swiss mice.

405 nm, with a reference wavelength of 490 nm) is directly correlated with the level of 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporated into cellular DNA. The NK activity of the leucocytes was studied using an enzymatic colorimetric assay (Cytotox 96, Promega, Madison, WI, USA) for cytotoxicity measurements of target cells (yeast artificial chromosome-1 cells from a murine lymphoma) based on the determination of lactate dehydrogenase enzymatic activity using tetrazolium salt. After 4 h of incubation, the percentage lyses of target cells was calculated. The concentration of IL-2 was determined in culture supernatants of leucocytes from axillary nodes after 48 h of incubation with concanavalin A using an ELISA kit (R&D System, Minneapolis, MN, USA).

The results are shown in Tables 1–3 for leucocytes from axillary nodes, spleen and thymus, respectively. The chemotaxis indexes of leucocytes from axillary nodes, spleen and thymus (with similar values in both strains of mice) were in Swiss and BALB/c PAMC, smaller than in the corresponding NPAMC. In all cases, the values in old PAM and NPAM were lower than those in the adult animals. The ingestion for 5 weeks of a diet supplemented with TP+NAC increased, in general, with statistical significant differences, the chemotaxis in PAMA and NPAMA with respect to the corresponding controls (PAMC and NPAMC). Moreover, the ingestion of the antioxidants brought the levels of chemotaxis in aged animals close to those in adults.

Table 3. Effect of a diet supplemented with two sulphur-containing antioxidants (thioprolone (TP) and N-acetylcysteine (NAC); 0.1% (w/w) for 5 weeks) on several functions of thymus leucocytes from chronologically old prematurely and non-prematurely aged Swiss and BALB/c mice (Mean values and standard deviations for 10 subjects)

	NPAMC		NPAMA		PAMC		PAMA		AC	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Swiss mice										
Chemotaxis	350	58 ^c	756	118 ^{***}	248	67 ^c	635	180 ^{***}	550	140
Basal proliferation (absorbance)	0.13	0.02	0.15	0.03	0.08	0.02 ^{b††}	0.14	0.02 ^{***}	0.12	0.03
Proliferation to Con A (absorbance)	0.20	0.05 ^b	0.28	0.08 [*]	0.12	0.04 ^{c†††}	0.22	0.06 ^{**}	0.31	0.05
NK activity (lysis %)	14	3 ^c	24	3 ^{***a}	11	2 ^{c†}	23	3 ^{***a}	32	5
BALB/c mice										
Chemotaxis	311	49 ^c	402	85	148	45 ^c	367	99 ^{***}	620	30
Basal proliferation (absorbance)	0.07	0.01 ^{c†††}	0.10	0.03 ^{**}	0.07	0.01 ^c	0.08	0.02 ^{b††}	0.16	0.02 [‡]
Proliferation to Con A (absorbance)	0.12	0.04 ^{c††}	0.31	0.07 ^{***}	0.08	0.03 ^{c††}	0.15	0.03 ^{***b‡}	0.35	0.07
NK activity (lysis %)	21	4 ^{c††}	28	3 ^{**b}	14	3 ^{c††††}	29	3 ^{***b‡}	67	8†††

NPAM, non-prematurely ageing mice; PAM, prematurely ageing mice; NPAMC and PAMC, NPAM and PAM controls; NPAMA and PAMA, NPAM and PAM with antioxidant supplementation; AC, adult controls; Con A, concanavalin A; NK, natural killer. The data were analysed statistically by the three-way ANOVA for unpaired observations, followed by the Scheffe's *F post-hoc* test. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ with respect to the corresponding values in controls (NPAMC and PAMC). ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$; ^c $P < 0.001$ with the corresponding values in adults. [†] $P < 0.05$; ^{††} $P < 0.01$; ^{†††} $P < 0.001$ with respect to the corresponding values in NPAMC. [‡] $P < 0.05$; ^{‡‡} $P < 0.01$; ^{‡‡‡} $P < 0.001$ with respect to the corresponding values in Swiss mice.

With respect to basal proliferation, there are differences between Swiss and BALB/c mice, the latter showing lower values. In general, the levels of proliferation in PAMC and NPAMC were lower than those in adults. The supplementation only increased the basal proliferation in cells from spleen and thymus of PAMA. Nevertheless, the proliferative response of lymphocytes to concanavalin A, which was lower in all cases in PAMC with respect to the corresponding NPAMC and also in all the old NPAMC and PAMC with respect to the values in the corresponding adults, increased after the supplementation. Moreover, the values in aged PAMA and NPAMA were generally similar to those in adults. The NK activity was, in general, smaller in PAMC with respect to NPAMC and in all cases in PAMC and NPAMC when the values were compared with those corresponding in adults. The ingestion of a supplementation of sulphur-containing antioxidants increased the NK activity in all cases bringing the values closer to those in adults although they did not reach those values. The IL-2 release in lymphocytes from axillary nodes (Table 1) was higher in cells from BALB/c mice than in those from Swiss. In both Swiss and BALB/c PAMC groups, there were significant decreases in the levels of this cytokine with respect to those in NPAMC, and in all groups of old animals (both NPAMC and PAMC) the values were lower than in adults. After the antioxidant supplementation in all the groups, there were significant increases of IL-2 concentrations bringing them close to the levels of adults, a change that was more evident in BALB/c mice.

Since all the functions studied are markers of biological age in mice and predictors of longevity⁽²⁾, the present data show that the ingestion of a low amount (0.1% (w/w)) of two antioxidants such as TP+NAC for a short term (5 weeks) decreases the biological age of mice making it more similar to that of chronological adults. Moreover, this effect was found in two different strains of mice, outbred Swiss and inbred BAB/c mice, and in chronologically old PAM and NPAM, but more extensively in PAM. In a

previous study, it has been observed that in chronologically adult PAM and NPAM this kind of supplementation was also more effective in PAM than in NPAM, and in Swiss mice than in BALB/c mice⁽⁴⁹⁾. However, in adult mice, the supplementation was, in general, less effective than in old animals, since the present results show that practically all the functions studied in leucocytes have been improved after the ingestion of the diet supplemented with the antioxidants (Tables 1–3). Although in chronologically old Swiss mice an ingestion of a high concentration of these antioxidants (0.3%) caused a stimulation of several of the functions studied here, this concentration in the adults decreased those functions and increased the oxidative stress of the animals⁽³⁹⁾. In the present study, the mice were chronologically old, but they were divided into two groups with different biological age, since NPAM are always biologically younger than PAM of the same age⁽¹⁷⁾. Based on the present results, 0.1% (w/w) TP+NAC seems an appropriate amount to improve immune function in aged mice. Nevertheless, further research on the effects of higher amounts of those antioxidants in old PAM and NPAM should be carried out.

Conclusion

A similar diet to that used in the present work, also ingested for 5 weeks, improved several peritoneal macrophage functions in chronologically adult Swiss mice, in NPAM and especially in PAM⁽⁵⁰⁾, with these animals showing an increased longevity (N Guayerbas and M De La Fuente unpublished results). Since the improvement of the immune functions studied in peritoneal leucocytes after antioxidant supplementations is very similar to that found in the immune cells from organs such as axillary nodes, spleen and thymus, it is possible that the immune 'rejuvenation' found in the present work could allow an increase of the longevity of animals. Thus, the ingestion of a diet with adequate concentrations of antioxidants, even in chronologically and biologically aged subjects, seems to be

a good strategy to maintain health and retard the inevitable ageing process.

Acknowledgements

This work was supported by the following grants: MEC (BFU 2005-06777), MICINN (BFU2008-04336), UCM Research Group (910379ENEROINN) and RETICEF (RD06/0013/0003) (ISCIII) of Spain. The author declares no conflict of interest.

References

1. Strehler BL (1977) *In Time, Cells and Aging*. New York: Academic Press.
2. De la Fuente M & Miquel J (2009) An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxy-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* **15**, 3003–3026.
3. Medvedev ZA (1990) An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* **65**, 375–398.
4. Wayne SL, Rhyne RL, Garry PJ *et al.* (1990) Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* **45**, M45–M48.
5. High KP (2004) Infection as a cause of age-related morbidity and mortality. *Ageing Res Rev* **3**, 1–14.
6. Castle SC, Uyemura K, Fulop T *et al.* (2007) Host resistance and immune responses in advanced age. *Clin Geriatr Med* **23**, 463–479.
7. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R *et al.* (2002) T cells and aging. *Front Biosci* **7**, d1056–d1083.
8. De la Fuente M, Hernanz A & Vallejo C (2005) The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1356–1366.
9. Gruver AL, Hudson LL & Sempowski GD (2007) Immunosenescence of aging. *J Pathol* **211**, 144–156.
10. Aw D, Silva AB, Palmer DB (2007) Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* **120**, 435–446.
11. 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.
12. Gomez CR, Nomellini V, Frunce DE *et al.* (2008) Innate immunity and aging. *Exp Gerontol* **43**, 718–728.
13. Alonso-Fernandez P, Puerto M, Maté I *et al.* (2008) Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of adults. *J Am Geriatr Soc* **56**, 2244–2251.
14. Solana R, Pawelec G & Tarazona R (2006) Aging and innate immunity. *Immunity* **24**, 491–494.
15. De la Rosa 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.
16. De la Fuente M (2008) Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation* **15**, 213–223.
17. Viveros MP, Arranz L, Hernanz A *et al.* (2007) A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* **14**, 157–162.
18. Puerto M, Guayerbas N, Alvarez P *et al.* (2005) Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol* **165**, 33–40.
19. Arranz L, Caamano J, Lord JM *et al.* (2010) Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor-kappaB. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**, 941–950.
20. Arranz L, Lord JM & De la Fuente M (2010) Preserved ex vivo inflammatory status and cytokine responses in naturally long-lived mice. *Age* (doi: 10.1007/s11357-010-9151-y).
21. Wrona D (2006) Neural-immune interactions: An integrative view of bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* **172**, 38–58.
22. Besedovsky HO & Del Rey A (2007) Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun* **21**, 34–44.
23. Arranz L, Guayerbas N & De la Fuente M (2007) Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res* **62**, 1–8.
24. Arranz L, De Vicente A, Muñoz M *et al.* (2009) Impaired immune function in a homeless population with stress-related disorders. *Neuroimmunomodulation* **16**, 251–260.
25. Franceschi C (2007) Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? *Nutr Rev* **65**, S173–S176.
26. Arranz L, Fernandez C, Rodriguez A *et al.* (2008) The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic Biol Med* **45**, 1252–1262.
27. De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N *et al.* (2004) Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology* **5**, 389–400.
28. Baeza I, De Castro NM, Gimenez-Llort L *et al.* (2010) Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *J Neuroimmunol* **219**, 90–99.
29. Guayerbas N & De la Fuente M (2003) An impairment of phagocytic function linked to shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol* **27**, 339–350.
30. Viña J, Sastre J, Pallardo FV *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.
31. Lamas O, Marti A & Martinez JA (2002) Obesity and immunocompetence. *Eur J Clin Nutr* **56**, 542–545.
32. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C *et al.* (2006) Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* **17**, 4–12.
33. De la Fuente M & De Castro NM (2010) Obesity as a model of premature immunosenescence. *Curr Immunol Rev* (In the Press).
34. Arranz L, Gimenez-Llort L, De Castro NM *et al.* (2009) Social isolation during old age worsens cognitive, behavioral and immune impairment. *Rev Esp Geriatr Gerontol* **44**, 137–142.
35. Droge W (2005) Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome? *Phil Trans R Soc B* **360**, 2355–2372.
36. Miquel J & Ecnómos AC (1979) Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidin carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol* **14**, 279–285.
37. Richie JP Jr, Mills BJ & Lang CA (1987) Correction of a glutathione deficiency in the aging mosquito increase its longevity. *Proc Soc Exp Biol Med* **184**, 113–114.
38. Lesourd B (2006) Nutritional factors and immunological ageing. *Proc Nutr Soc* **65**, 319–325.
39. De la Fuente M, Guayerbas N, Catalán MP *et al.* (2002) The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve the

- immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Radic Res* **36**, 119–126.
40. Baeza I, De Castro NM, Alvarado C *et al.* (2007) Improvement of immune cell functions in aged mice treated for 5 weeks with soybean isoflavones. *Ann NY Acad Sci* **1100**, 497–504.
 41. Alvarado C, Alvarez 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.
 42. Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L *et al.* (2005) Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1203–1210.
 43. Alvarado C, Alvarez P, Jimenez L *et al.* (2006) Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants. *Dev Comp Immunol* **30**, 1168–1180.
 44. Alvarez P, Alvarado C, Puerto M *et al.* (2006) Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals. *Nutrition* **22**, 913–921.
 45. De la Fuente M, Ferrández MD, Del Rio M *et al.* (1998) Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline. *Mech Ageing Dev* **104**, 213–225.
 46. Victor VM, Rocha M, Esplugues JV *et al.* (2005) Role of free radicals in sepsis: Antioxidant therapy. *Curr Pharm Des* **11**, 3141–3158.
 47. Correa R, Blanco B, Del Rio M *et al.* (1999) Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. *Biofactors* **10**, 195–200.
 48. Puerto M, Guayerbas N, Victor VM *et al.* (2002) Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behav* **73**, 797–804.
 49. Guayerbas N, Puerto M, Ferrandez MD *et al.* (2002) A diet supplemented with thiolic antioxidants improves leukocyte function in two strains of prematurely ageing mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**, 1009–1014.
 50. Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P *et al.* (2004) Improvement of the macrophage functions in premature ageing mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. *Cell Mol Biol* **50**, OL677–OL681.



The Immune System, a Marker and Modulator of the Rate of Aging

2

Monica De la Fuente

2.1 Introduction: The Process of Aging

To understand the role of the immune system in the aging process, it is necessary to remember several key concepts about this process. Aging may be defined as a progressive and general deterioration of the organism's functions that leads to a lower ability to adaptively react to changes and preserve homeostasis. Thus, elderly subjects show a lower capacity to endure extreme situations, infections, and stress in general. If the principal characteristic of a healthy organism is the maintenance of the functional balance at all levels, with aging this balance fails. This accumulation of adverse changes with the passing of time, although it should not be considered a disease, strongly increases the risk of disease and finally results in death. In fact, the difference between senescence and illness is not clearly defined (Carnes et al. 2008). As Strehler (1977) indicated, there are four rules that define aging: (a) It is universal (practically all animal species including the metazoans showing sexual reproduction suffer aging), (b) progressive (the rate of aging is similar at different ages after the adult state), (c) intrinsic (since even if animals are exposed to optimal

environmental conditions throughout life, they still experience the aging process at the rate characteristic for their species), and (d) deleterious (aging is obviously detrimental to individuals since it leads to their death, although, at the species level, this detrimental character is arguable since aging is necessary for the replacement of the members of all populations).

The process of aging, which starts when the subjects achieve the adult age that allows their reproduction, finishes with their death. This period represents the mean life span or means longevity, which can be defined as the mean of the time that the subjects of a group born on the same date live. In the case of human beings, this longevity is currently very high in developed countries, where it is 75–83 years. Since we start the aging process at about 18 years of age, we spend most of our lifetime aging. Moreover, we have to consider the maximum life span or maximum longevity (the maximum time that a subject belonging to a determined species can live) and which in humans is about 122 years, whereas in mice it is 3 and in rats 4 years. If the maximum longevity is fixed in each species, and currently impossible to increase, the mean life span of individual organisms shows marked variability and can be increased by environmental factors. This allows the maintenance of good health and permits us to approach the maximum life span in a good condition. A higher mean longevity is achieved by the preservation of good health, and this depends approximately 25 % on the genes and 75 % on lifestyle and environmental factors (Kirkwood 2008) (Fig. 2.1).

M. De la Fuente, PhD
Department of Physiology, Faculty of Biology,
Complutense University of Madrid,
Madrid 28040, Spain
e-mail: mondelaf@bio.ucm.es

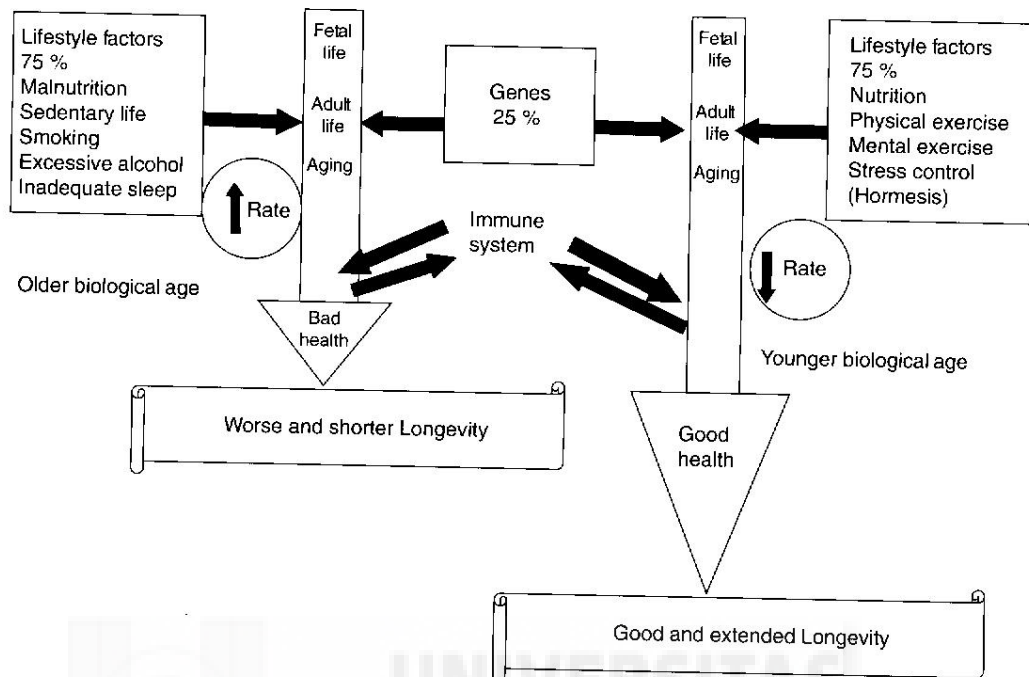


Fig. 2.1 The immune system is a good marker of the rate of aging, and it is involved in the biological age of each subject and therefore in her/his longevity. The base of a functional longevity is the health maintenance, which depends on the genes in a proportion of 25 %, but in a proportion of 75 % it depends on the lifestyle and environmental factors. The biological age or rate of aging is the

result of individual epigenetic mechanisms acting on genes since the fetal life throughout the life of the subject, and it is worth to note that they also depend on lifestyle factors. If these factors are appropriate, the rate of aging will be lower, and we will have a good and extended longevity. In addition, a poor lifestyle accelerates the pace of aging and makes it more difficult to maintain health

2.2 The Concept and Markers of Biological Age

The concept of "biological age" is justified by the fact that the aging process is very heterogeneous. Thus, it is well known that the molecular and cellular deterioration and the impairment of the physiological systems associated with aging do not occur at the same rate in all members of a population of the same chronological age. Biological age represents the rate of aging experienced by each individual and therefore his/her life expectancy, being a better predictor of longevity than chronological age (Borkan and Norris 1980). In fact, the chronological age only gives limited information on the decrease of functional capacity, longevity expectancy, and other aging characteristics (Park et al. 2009).

The problem with biological age is how to determine it. If the chronological age of a subject is easily measurable, the same is not true of biological age. Thus, a number of biochemical, physiological, and psychological parameters that change with age and that show the tendency to a premature death must be determined. Since the first publications of Benjamin (1947), followed by several relevant studies such as those by Borkan and Norris (1980), one of the most complete investigation on biological age; and by Benfante et al. (1985); Ruiz-Torres (1991); or more recently that of Nakamura and Miyao (2007) and Bulpitt et al. (2009), much research has been carried out trying to obtain the most appropriate parameters for indicating the biological age. The retrospective analysis of these studies showed that the subjects presenting certain

parameters, which were “more aged” than those found in the majority of the subjects of the same chronological age, had a shorter life expectancy. These biomarkers include those related to respiratory function, systolic arterial tension, hematocrit, biochemistry markers (e.g., albumin and blood urea nitrogen), as well as reaction times determined by psychometric tests. Moreover, they proposed the characteristic that a parameter of biological age should have and suggested that the aging rate is influenced by environmental factors. In addition, since oxidation and inflammation underlies the aging process, which will be mentioned later, several inflammatory and oxidative stress markers have also been proposed recently as predictors of frailty risk (Bandeiro-Roche et al. 2009) and biomarkers of aging (Pandey and Rizvy 2010). Nevertheless, in spite of all these studies attempting to extend the parameters of biological age (Bae et al. 2008), the subject is still incomplete (Bulpitt et al. 2009), and more research should be carried out.

2.3 The Immune System as a Marker of Biological Age and Predictor of Longevity

Most research on biological age did not include immune parameters. However, we have to consider that the immune system is a homeostatic system, which contributes to an appropriate functional capacity of the organism, and thus it has been proposed as one of the best markers of health (Wayne et al. 1990; De la Fuente 2004). Although these characteristics of the immune system could lead us to think of the functional capacity of this system as a possible biomarker of aging, only in recent investigations have several immune parameters been suggested as representative of the “true” biological age of a subject. A positive relation has been shown between a good function of the T cells, natural killer (NK) cells, and of phagocytic cells and longevity (Ferguson et al. 1995; Ogata et al. 1997; Guayerbas et al. 2002; Guayerbas and De la Fuente 2003). Also, the levels of immunological parameters such as excess of CD8+CD27–CD28– T cells, low T-cell

proliferative responses in vitro, and low IL-2 secretion are predictors of mortality. These together with increased IL-6 levels and a CD4:CD8 ratio <1 can define the “immune risk profile” in humans (Pawelec 2006). A number of studies carried out in our laboratory have allowed us to propose several immune parameters as being fundamental in calculating the biological age of an individual (Figs. 2.1 and 2.2). Before describing how we obtained the immune profile of biological age, we are going to briefly mention the age-related changes in the immune system or immunosenescence (which are covered in other chapters) as well as in the psychoneuroimmuno-endocrine system.

2.3.1 Age-Related Changes in the Immune System: Immunosenescence

It is known that with aging there is an increased susceptibility to infectious diseases, autoimmune processes, and cancer, which indicates the presence of a less competent immune system, exerting a great influence on the age-related morbidity and mortality (Fulop et al. 2011; Dewan et al. 2012). There are contradictory results in the investigations on immunosenescence as a consequence of many factors, which have not been taken into account (we can mention, e.g., the age, species, strain, and gender of the subjects studied as well as the locations of the immune cells used) (De la Fuente et al. 2011). Nevertheless, it is presently accepted that almost every component of the immune system undergoes striking age-associated restructuring, leading to changes that may include enhanced as well as diminished functions (De la Fuente and Miquel 2009; Arranz et al. 2010a, b, d). There is evidence of the central role played by cell-mediated immunity in immunosenescence (Lang et al. 2013). Thus, some of the key and most marked changes are a pronounced age-related decrease in T-cell functions, with a lower proliferation of lymphocytes and a decrease of several cytokines involved in this process such as interleukin 2 (IL-2) and other functions such as chemotaxis

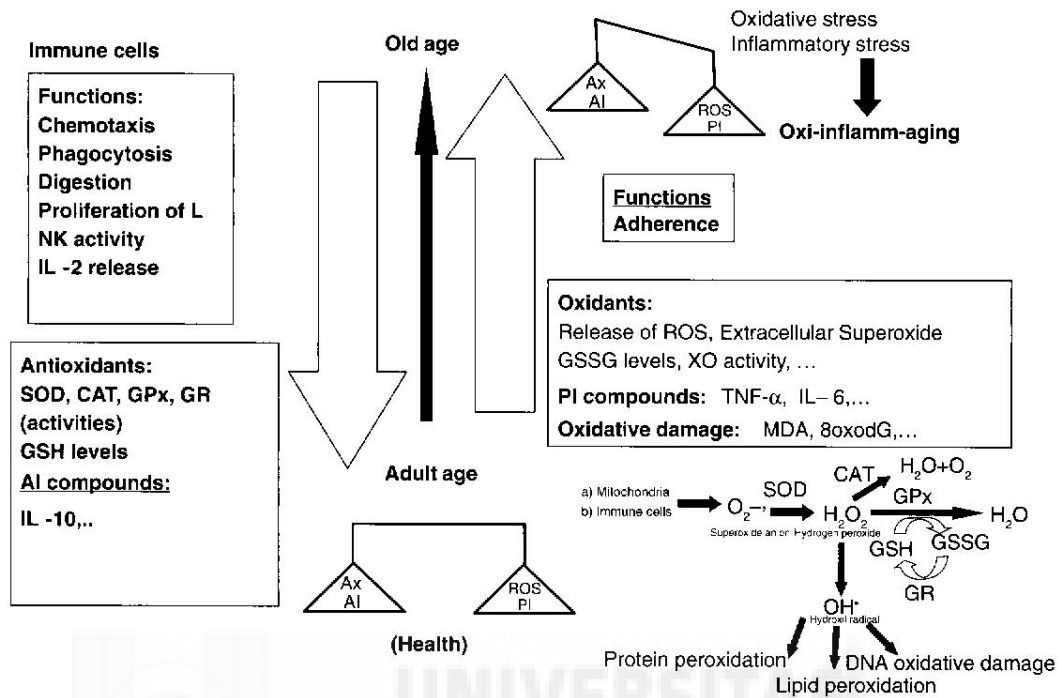


Fig. 2.2 Age-related changes in function, oxidative, and inflammatory stress parameters in immune cells. In the age-associated restructuring of the immune cells or immunosenescence, there is a decrease of several immune cell functions, but an increase in other functions. The immune cells produce in their defensive work important levels of free radicals and reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory (PI) compounds, which are involved with the immune response destroying the pathogens. These oxidants and PI compounds, which in certain amounts are essential for our survival, when they are in excess, lead to oxidative and inflammatory stress and the consequent damage of cells. Therefore, the functions of our organism are based on a perfect balance between the levels of ROS and PI and those of antioxidants (Ax) and anti-inflammatory (AI) defenses. However, with aging a loss of the balance appears, with excess in the production of ROS and PI or insufficient availability of Ax and AI, which leads to an oxi-inflamm-aging. The first oxygen

free radical appearing in cells is the superoxide anion (O_2^-), which produces hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^\cdot), the most reactive free radical, which carries out the oxidation of biomolecules such as proteins, lipids, and DNA. Cells, in order to protect themselves against oxygen toxicity, have developed a variety of antioxidant mechanisms that prevent the formation of ROS or neutralize them after they are produced. Thus, superoxide dismutase (SOD) catalyzes the inactivation of superoxide anion, and catalase (CAT) inactivates hydrogen peroxide. The reduced GSH is the most important antioxidant in the organism and neutralizes peroxides using the glutathione peroxidase (GPx), and in this action it is transformed to oxidized glutathione (GSSG). The antioxidant enzyme glutathione reductase (GR) is used to catalyze the reduction of glutathione. Since with age there is an oxi-inflamm-aging, which is the base of the loss of health, immune cells can be involved in the rate of the aging process

(Haynes and Maue 2009; Pawelec et al. 2010; Arranz et al. 2010a, d). This age-related impairment, especially in the CD4+ T-helper (TH) cell, affects cell-mediated and humoral immunity and causes an impaired B-cell function (Frasca and Blomberg 2009). A cell type that has been relatively neglected in studies of age and immunity is the T-regulatory (Treg) subset, which seems to maintain its functional capacity and increase

its number with the passing of time. This could explain the greater suppressive activity in the elderly associated with immunosenescence (Wang et al. 2010).

In cells of innate immunity, which have been less frequently studied than lymphocytes with respect to their age-related changes, the NK cells show a decrease in their antitumoral activity, although each subset may be affected differently

by aging (reviewed in Shaw et al. 2010; Arranz et al. 2010a; Gayoso et al. 2011). In the phagocytic cells there are contradictory results, but in general they are less affected by the dysfunction that occurs throughout aging than lymphocytes. Nevertheless, they show a decrease in chemotaxis, ingestion, and digestion of phagocytized material (Alonso-Fernandez et al. 2010). However, adherence capacity to tissues, expression of Toll-like receptors (TLR) such as TLR-2 or TLR-4, and the pro-inflammatory cytokine production seem to increase with aging (De la Fuente and Miquel 2009; Arranz et al. 2010b, d). Although phagocytes were thought to play a less critical role in the immune dysfunction that occurs throughout aging (De la Fuente 1985), recent studies show that these cells are responsible for the susceptibility and vulnerability to infections among the aged subjects.

The network of cytokines produced in response to immune challenges has also shown changes with aging. It is important to mention the shift towards Th2 (effecting humoral antibody-mediated immunity) responses and the decrease in anti-inflammatory cytokine production (Arranz et al. 2010a, d).

Thus, currently, despite the rapidly increasing amount of data on immunosenescence in the last decades, the totality of all the changes involved in the different aspects of the immune function with age has not yet been resolved. Moreover, the specific role played by the immune system in the aging process of organisms is not wholly understood.

2.3.2 The Psychoneuro-immunoendocrine System and Its Changes with Aging

As mentioned previously, the immune system is a regulatory system, but it does not work alone. It is in constant and complex communication with the other homeostatic systems, namely, the nervous and the endocrine systems (Besedovsky and del Rey 2007, 2011). Currently, there is abundant work that confirms the bidirectional communication between these regulatory systems, which

is mediated by cytokines, hormones, and neurotransmitter through the presence of their receptors on the cells of the three systems. Therefore, any influence exerted on the immune system will have an effect on the nervous and endocrine systems and vice versa. Moreover, immune, nervous, and endocrine products coexist in lymphoid, neural, and endocrine tissues. All this shows the complexity of the regulation not only at general levels but also at local levels. Thus, presently a psychoneuroimmunoendocrine system is accepted, which allows the preservation of homeostasis and therefore of health. The scientific confirmation of the communication between these systems has permitted the understanding of why situations of depression, emotional stress, or anxiety are accompanied by a greater vulnerability to cancers, infectious, and autoimmune diseases. This agrees with the concept that the immune system is affected (Arranz et al. 2009; Salim et al. 2012). By contrast, pleasant emotions help to maintain a good immune function (Barak 2006).

With aging it is evident that not only the immune system is affected also the other regulatory systems involved in homeostasis. In the nervous system a progressive loss of its function appears, with the hippocampus being especially affected (Couillard-Depres et al. 2011). Moreover, the regulation of stress-related disorders in which the hippocampus is involved is clearly impaired with aging (Garrido 2011). Several changes accompany healthy aging in the endocrine system. These include, for example, the increase of several hormones and the decrease of others such as growth hormone/insulin-like factor-1 axis, sexual hormones, dehydroepiandrosterone, and melatonin (Makrantonaki et al. 2010). Moreover, the age-related disturbances of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis seem to be relevant for decreasing stress adaptability in old subjects, this being, at least in part, the cause of their health impairment (Lupien et al. 2009).

It is difficult to know if the deterioration with aging of the nervous, endocrine, and immune systems occurs simultaneously or starts in one of them (possibly the neurons are a good candidate to be the first affected), which then influences the others. Nevertheless, many age-related changes

happen in the communication between the homeostatic systems (Corona et al. 2012). Thus, there are changes in the innervations of immune organs (such as the decrease of the sympathetic innervation and concentration of noradrenaline (NA) in these organs) and in the expression of receptors of neurotransmitters (as the increase of beta-receptors on the immune cells as a compensatory mechanism). Moreover, the response of immune cells in vitro to neurotransmitters changes with age (Puerto et al. 2005). This defective response of immune cells to mediators of the nervous system could contribute to the process of immunosenescence. Concretely in the case of catecholamines and their catabolites, this could explain the inadequate response to stress that occurs with aging (Bauer 2008; Gouin et al. 2008). In relation to this, the inadequate response to stress is one of the conditions leading to an acceleration of aging accompanied by the impairment of the immune system and other physiological systems. In addition, chronic stressful conditions modify immune functions and their interaction with the nervous system, causing detrimental effects on memory, neural plasticity, and neurogenesis (Yirmiya and Goshen 2011). Thus, it has been shown that mice with chronic hyper-reactivity to stress and anxiety show a premature immunosenescence and are prematurely aged (Viveros et al. 2007). Recently, it was also observed that mice exposed to the stressful condition of isolation have behavioral responses that reveal an impairment of cognition, a certain degree of depression, and a more evident immunosenescence than control animals of the same age housed in groups (work in the process of publication). Likewise, human subjects suffering chronic anxiety or depression show a significant premature immunosenescence (Arranz et al. 2007, 2009; Hernanz et al. 2008).

2.3.3 Functions of the Immune System as Markers of Biological Age

The identification of parameters that measure the biological age, which is a better measurement of

the rate of aging than the chronological age, is very difficult as has been mentioned previously. Since it has been demonstrated that the competence of the immune system is an excellent marker of health and several age-related changes in immune functions have been linked to longevity, we decided to investigate if some immune functions could be useful as markers of biological age and therefore as predictors of longevity (De la Fuente and Miquel 2009). Since a longitudinal study is impossible to carry out on human subjects throughout the whole aging process, we analyzed several functional parameters in leukocytes of peripheral blood in the different decades of the life of human subjects, from their 20s until their 80s. As we needed a species with a shorter life span to carry out longitudinal studies, we chose mice, which show a mean longevity of about 2 years. Although most studies on immune cells in mice involve the sacrifice of the animals (to obtain the spleen, thymus, etc.), we designed a method to extract these cells without the necessity of killing them or even using anesthesia. This consists of taking leukocytes from the peritoneum, thus allowing us to study the same functional parameters from adult age until the death of the animals.

Among all the possible functions of immune cells, we have focused on those listed in Fig. 2.2: thus, in *lymphocytes*, their ability to adhere to the vascular endothelia, migrate towards the site of antigen recognition (chemotaxis), proliferate in response to mitogens, and release cytokines such as IL-2 and in *phagocytes*, the process of adherence to tissues, chemotaxis, ingestion or phagocytosis of foreign particles, and destruction of pathogens by means of the intracellular production of free radicals such as the superoxide anion and other ROS located in the phagosome of these cells. Further, in the NK cells we have analyzed their capacity to destroy tumoral cells of the same animal species investigated.

Surprisingly our results showed that in the members of both species, similar age-related changes occur in the immune parameters studied. With aging there is a decrease of functions such as the lymphoproliferative response, the IL-2

release, the chemotaxis as well as the NK activity against tumor cells, the latex phagocytosis, and adequate levels of ROS in the phagosomes. In addition, there is an increase of other functions such as adherence of immune cells to tissue, which may prevent their arrival to the site where they have to perform their organism-protecting task (De la Fuente and Miquel 2009). There is also an increase in the release of several cytokines, especially those pro-inflammatory, which is accompanied by a decrease in others such as the anti-inflammatory cytokines (Arranz et al. 2010d).

In order to identify the above parameters as markers of biological age, it is necessary to confirm that the levels shown in particular subjects reveal their real health and senescent conditions and, consequently, their rate of aging. This has been achieved in the following two ways:

- (a) Ascertaining that the individuals with those parameters showing values older than those of most subjects of the same population, sex, and chronological age die before their counterparts. This can be confirmed only in experimental animals, and we have used several murine models of premature aging, especially one of mice with poor response to stress and with anxiety, which will be covered later.
- (b) Finding that the subjects reaching a very advanced age preserve these parameters at levels similar to those of adults. This can be tested on both humans (centenarians) and experimental animals, such as extremely long-lived mice. While biologically older animals showing the immune competence levels characteristic of chronologically older individuals have been found to die prematurely (Arranz et al. 2010a, d), centenarians and long-lived mice exhibit a high degree of preservation of several immune functions. This may be related to their ability to reach a very advanced age in a healthy condition (Alonso-Fernandez and De la Fuente 2011). All the above results confirm that the immune system is a good marker of biological age and a predictor of longevity.

Moreover, since the evolution of these immune functions is similar in mice and humans, it can be assumed that those humans showing immune parameters at the levels of older subjects have a higher biological age and a shorter longevity.

2.3.4 Murine Models of Premature Immunosenescence

Prematurely aging mice (PAM) in contrast to non-prematurely aging mice (NPAM) of the same population, sex, and chronological age are identified by its poor response in a simple T-maze exploration test. This provides strong support for the concept that the nervous and the immune system are closely linked. In mice showing premature aging, we have observed that the abovementioned immune functions performed at the characteristic levels of older mice. In addition to a more significant immunosenescence, the PAM showed high levels of anxiety and a brain neurochemistry similar to older animals. Nevertheless, the most convincing evidence that the abovementioned parameters are useful markers of biological age is that the PAM showed a shorter life span than their counterpart NPAM of the same age, sex, and chronological age (Viveros et al. 2007; De la Fuente 2010).

Other models of prematurely immunosenescence related with lower longevity are being carried out, such as obese animals (De la Fuente and De Castro 2012) and transgenic mice for Alzheimer's disease (Gimenez-Llort et al. 2012).

2.4 The Involvement of the Immune System in the Rate of Aging

To understand how the immune system can be involved in the rate of aging (Fig. 2.1), it is convenient to remember several concepts on aging, especially those that explain how aging occurs. Thus, herein the most relevant theories of aging will be briefly commented.

2.4.1 The How, Where, and Why of Aging: An Integrative Theory of Aging

As a consequence of the great complexity of the changes associated with aging, more than 300 theories have been proposed to explain this process (Medvedev 1990). However, presently most of these theories have been abandoned since they do not have clear research support and even the most widely accepted theories of aging offer partial explanations of the causes and effects of this process. Moreover, many of them only are based on the consequences of the aging process but do not deal with the causes of this process. For a theory to be accepted, it should be applicable to the different levels of biological organization (molecular, cellular, and physiological) in all the multicellular animals with sexual reproduction. Thus, the determinist group of theories, in which it is proposed that aging is the result of a deliberate program driven by genes, do not have this universal application. For example, Hayflick's mitotic clock theory, which was widely accepted during the last few decades of the last century, has been discarded by the author himself, mentioning in 2007 (Hayflick 2007) that "The weight of evidence indicates that genes do not drive the aging process..." and "Aging is an increase in molecular disorders. It is a stochastic process that occurs systemically after reproductive maturity in animals that reach a fixed size in adulthood." In addition, the theory of shortening telomeres (Goyns 2002), which considers aging as the cause of the shortening of telomeres (this fact occurs when the cells dividing), is also without application to those physiological systems with fundamentally only fixed postmitotic cells such as the heart and the brain and to those animals basically constitute with these postmitotic cells as is the case of *Drosophila melanogaster*. Thus, these determinist theories should be considered possible explanations of cell differentiation processes and replicative cellular senescence that are consequences of the aging process, but not the base of organism aging. Moreover, although a link between telomere length and longevity has been described, this seems to be explained by the lev-

els of oxidative stress (Atzmon et al. 2010), a fact that will be commented. Another big group of theories, the "epigenetic theories," indicates that aging is the result of events that are not guided by a program but are stochastic or random events and it is not genetically programmed. In this group several theories on relevant physiological systems such as "the immune theory" and the "neuroendocrine theory" can be included. It is true that the immune system is very important for the life of animals, but it is accepted that lymphocytes, especially T cells, are the most clearly impaired with aging. However, there are many animal species without lymphocytes, and they suffer the aging process. Similar comments can be done of other theories of aging, which shows that most of these theories indicate events that are consequence of the aging process but not its cause, since they are not universal application.

Among the epigenetic theories, that of the free radical proposed by Harman (1956) probably is now the most widely accepted. This theory, which has been further developed by Haman (2006); Miquel et al. (1980) and others (Barja 2004), proposes that aging is the consequence of accumulation of damage by deleterious oxidation in biomolecules caused by the high reactivity of the free radicals produced in our cells as a result of the necessary use of oxygen (O_2). Since O_2 is mainly used in respiration to support the life-maintaining metabolic processes, the mitochondria, and more concretely their DNA (mtDNA), they are probably the first targets of this oxidation, especially in the fixed postmitotic cells that cannot fully regenerate these organelles (Miquel 1998). Moreover, it is known that the rate of mitochondrial oxygen radical generation, as well as the degree of membrane fatty acid unsaturation, and the oxidative damage to mtDNA are lower in the long-lived than in the short-lived species. Thus, the mitochondrial damage caused by free radicals results in a loss of bioenergetic competence that leads to aging and death of cells and therefore of the organism.

There is another group of theories of aging, the concepts having been published a long time ago, that attempt to explain why the aging process occurs. In this group, we can mention

theories such as that proposed by Williams (1957), which suggests that aging is a consequence of characteristics selected by evolution to be of advantage to the young subjects of the species, allowing them to reach the reproductive age in the best condition (with maximal vigor) and thus preserve these species, but are a disadvantage for old subjects, not needed for species preservation. Thus, natural selection acts before the adult age (period of reproduction), and the maintenance of the species is more relevant biologically than the longevity of the individual.

Since the aging process is very complex, a theory based on only one mechanism is not able to give a satisfactory explanation for all its aspects. This justifies the proposal of a theory that integrates early concepts that offer partial explanation of the mechanism of aging with others proposed more recently. Thus, an integrated theory forms which attempts to answer the three important questions of biogerontology: the “how the aging process occurs” (oxidation), the “where” this process starts (the mitochondria from fixed differentiated cells), and the “why” the aging process is necessary (for the maintenance of an adequate number of individuals in each species) (De la Fuente and Miquel 2009).

2.4.2 The Oxidation-Inflammation Theory of Aging: Role of the Immune System in Oxi-Inflamm-Aging

Recently, a new theory of aging, the oxidation-inflammation theory, has been proposed (De la Fuente and Miquel 2009), which integrates the previously mentioned oxidation theory of aging and the idea of “inflamm-aging” suggested several years ago by Franceschi et al. (2000). The concepts that have led us to this new theory will be discussed below. As already stated, the aging process is linked to the oxidation carried out by the oxidant and reactive oxygen species (ROS), normally produced by organisms. Nevertheless, we should consider that oxygen is essential for life and that ROS, in certain amounts, are needed

for many physiological processes that are essential for our survival (Dröge 2002). In order to obtain protection against oxygen toxicity, a variety of antioxidant mechanisms that prevent the formation of ROS or neutralize them after they are produced have been developed. Thus, the functions of our organism are based on a perfect balance between the levels of ROS and those of antioxidants. It is the loss of this balance, because of an excess in the production of ROS or an insufficient availability of antioxidants, which leads to the oxidative stress that underlies ROS-related diseases and aging (Fig. 2.2).

As mentioned above, aging is accompanied by a decline of the physiological systems including the immune system, and immunosenescence occurs. Moreover, a relation between the functionality of immune cells, the health of subjects, and their longevity was observed. Given this, we asked why immunosenescence occurs. If, as it is generally accepted, the mechanisms that underlie aging must be of general application, it seems logical to accept that the cause of immunosenescence is the same as that responsible for the senescence of the other cells of the organism, namely, the oxidative disorganization linked to the unavoidable use of oxygen to support cellular functions. Further, we should remember that the immune cells need to produce free radicals and other oxidant and inflammatory compounds in order to perform their defensive functions consisting of the destruction or incapacitation of pathogens and malignant cells (Yoon et al. 2002). Nevertheless, this fact and the membrane characteristics of the immune cells make them very vulnerable to oxidative damage. Therefore, if any cell needs to maintain a balance between the production of oxidants and the antioxidant defenses in order to prevent an excess of the first and the resulting oxidative stress, this balance is even more essential to preserve the functional capacity of immune cells and, therefore, the health of the organism.

In addition, there is a close link between oxidative stress and inflammation, since uncontrolled free radical release can induce an inflammatory response, and free radicals are inflammation effectors. In fact, ROS can activate

nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF κ B) inducing the production of inflammatory cytokines, and the levels of pro-inflammatory compounds (enzymes, cytokines, prostaglandins, etc.) seem to be increased with age in consistent with the proposed concept of "inflamm-aging." Based on the abovementioned points, the age-related changes in the redox and the inflammatory state of immune cells were investigated. Thus, a variety of oxidant and inflammatory compounds, and anti-inflammatory and antioxidant protectors, as well as oxidative damage to biomolecules, in immune cells (peritoneal leucocytes of mice and neutrophils and lymphocytes from human peripheral blood) were analyzed (Fig. 2.2). Our results indicate that with aging leucocytes suffer oxidative and inflammatory stress (De la Fuente et al. 2005; De la Fuente and Miquel 2009). Moreover, this also occurs in the immune cells of PAM with respect to those of NPAM (Viveros et al. 2007) as well as in the leucocytes of transgenic mice for AD with respect to the corresponding wild animals (Gimenez-Llort et al. 2012).

Therefore, with aging (chronologic or premature) the oxidant and pro-inflammatory compounds increase reaching levels higher than those of antioxidant and anti-inflammatory compounds, leading to an oxidative and inflammatory stress. Thus, oxi-inflamm-aging has been proposed as the cause of the loss of function that appears with senescence (De la Fuente and Miquel 2009).

In this context, a relationship has been found between the redox and inflammatory state of the immune cells, their functional capacity, and the life span of a subject. Thus, when an animal shows a high oxidative stress in its immune cells, these cells have an impaired function and that animal shows a decreased longevity in relation to other members of the group of the same chronological age. As examples supporting that idea and, consequently, the role of the immune system in aging, we can mention again what happens in the mouse model of premature aging, the PAM, with a shorter life span than the NPAM; they showed worse functions and a greater oxidative-inflammatory stress in their immune cells. Moreover, PAM also showed oxidative stress in

the brain, liver, heart, and kidney. The other models of premature aging previously mentioned also show this relation. Thus, in obese animals and in triple transgenic mice for Alzheimer's disease, immune cells have higher oxidative and inflammatory stress situations, worse functions than the respective controls, and the animals with these cells have a lower life span (De la Fuente and Miquel 2009; De la Fuente and De Castro 2012; Gimenez-Llort et al. 2012).

In addition, very-long-living mice and human centenarians show a redox condition in their immune cells and a functional capacity of these cells similar to that of healthy adult subjects (Arranz et al. 2010a, 2013; Alonso-Fernandez and De la Fuente 2011).

Since one of the most relevant mechanisms involved in the cellular redox state is the NF κ B, which plays a key role in regulating the expression of a wide range of oxidants and inflammatory compounds, especially in the immune cells, this factor has been involved in the immunosenescence and in oxi-inflamm-aging (Salminen et al. 2008a, b). In fact, it has been observed that the NF κ B activation, in resting conditions, is very high in peritoneal leucocytes from old mice but lower in extremely long-lived mice and adult animals. Moreover, only old subjects with controlled basal NF κ B activation in the immune cells achieved longevity, but adults with a high basal expression of this factor died early (Arranz et al. 2010a). Thus, the level of activation of that factor in leucocytes is significantly related to the life expectancy of the subjects from which the cells were obtained. All these suggest that the immune system, if it is not well regulated and shows a high activation of factors such as the NF κ B, will not be able to develop its function properly with a greater contribution to the oxi-inflamm-aging situation of the organism and consequently to the rate of aging. In conclusion, only aged individuals that maintain a good regulation of the leukocyte redox state and consequently a good function of their immune cells, with levels similar to those of healthy adults, reach very high longevity.

Thus, in the theory of oxidation-inflammation of aging, it is suggested that the immune

system could play a key role not as the fundamental cause of aging but as a mechanism that modifies the rate of senescence. In this theory, it is proposed that the aging process is a chronic oxidative and inflammatory stress, which leads to damage of cell components, including proteins, lipids, and DNA, contributing to the age-related decline of all cells of organisms, but especially in those of the regulatory systems, including the immune system. Moreover, the immune system, due to its capacity of producing oxidant and inflammatory compounds in order to eliminate foreign agents, could increase the oxidative and inflammatory stress of the organism, through factors such as NF κ B, if it is not well controlled. Thus, this system could be involved in the rate of aging and justifies the loss of homeostatic capacity and the consequent increase of morbidity and mortality that appears with aging (De la Fuente and Miquel 2009).

2.4.3 Can the Role of the Immune System in Aging Have a Universal Application?

The immune system is relatively well known in vertebrate animals, in which the innate and adaptive immunity collaborate to produce a very efficient immune response. However, in invertebrates this system has been less studied. Although currently it is accepted that all animals, even the plants, have some sort of immunity, the presence of lymphocytes and their specific defensive function appears only in vertebrates. For this reason “the immune theory of aging” such as originally proposed (Walford 1969) cannot be accepted since this theory suggested the impairment of the immune system as the cause of organism senescence, and this concept does not follow the principle of universality of the aging process proposed by Strehler (1977). It should be kept in mind that not all animal species have immune systems as complex as those of the mammals. Nevertheless, it seems evident, based on all the above information, that immune cells can play a fundamental role in aging.

Confirmation of this concept could be found in the fact that the immune cells produce oxidant and inflammatory compounds in high amounts with aging. However, this happens especially in the phagocytic cells, which are found, with different denominations, in all animals, including invertebrates. If during aging adaptive immunity declines, innate immunity, in several aspects, seems to be activated, inducing a prooxidative and pro-inflammatory profile. In agreement with the above, it has been observed that in the peritoneal immune cell populations of mice as in blood immune cells of human subjects, the macrophages and neutrophils, respectively, are the immune cells responsible for the generation of higher levels of oxidant compounds than those caused by lymphocytes, and these levels significantly increase with age in those phagocytic cells (De la Fuente and Miquel 2009). Thus, it is probable that these phagocytes, which already pointed out are found in all animals, can be involved in the modulation of chronic oxidative stress of senescence and, thus, in the rate of aging of the subjects of the different animal species.

2.5 Environment and Lifestyle Strategies that May Improve the Function and Redox State of the Immune System in Aging

Many strategies have been proposed to enable the maintenance of an excellent immune function with aging, resulting in a better quality of life, and consequently, greater longevity of individuals. If we agree with the oxidation-inflammation theory of aging, we should accept that the rate of aging is dependent, in part, on the degree of control of oxidation and inflammation of the immune system of each subject, which is related to its functional capacity. This theory can also be supported by research showing that this control of the immune system by lifestyle strategies results in an increased longevity (De la Fuente et al. 2011; Jenny 2012). Several of those strategies will be discussed below.

2.5.1 Nutrition

Nutrition, adequate in quality and quantity, is essential to maintain good health. Thus, a Mediterranean diet is associated with lower levels of inflammation and a decreased risk of disease compared to a Western-type diet (Pauwels 2011). Moreover, nutritional status has a relevant role in the immune system function of each subject, especially in elderly individuals (Pae et al. 2012). The results obtained from several studies in experimental animals and humans show that the impaired regulation of immune response found even in healthy elderly subjects can be attributed to deficiencies of both macronutrients and micronutrients. This fact, which is often found in older individuals because of physiological, social, and economic factors, indicates that appropriate nutrition could play a preventive role in the aging process by modulating immunosenescence. Thus, the use of "functional foods" seems to influence many cellular parameters, which can help to decrease the deleterious effect of the aging process. In this context, nutrients such as dietary fiber, omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), probiotics, and specially antioxidant compounds are of particular interest (De la Fuente et al. 2011; Pae et al. 2012).

2.5.1.1 Antioxidants

As mentioned above, the endogenous antioxidants decrease in oxidative stress situations, such as aging, because they are spent neutralizing the excess of ROS, and this fact is very relevant in the immune cells. Since biological age and mean longevity seem to be associated with an optimal antioxidant protection, having a diet enriched with antioxidants appears adequate for maintaining an optimum redox balance and therefore protecting the organism from the impairment associated with physiological and pathological aging. Although some studies question the positive role of the ingestion of antioxidant vitamins, especially in high doses, as a consequence of a possible decrease that they may cause in the endogenous antioxidant defenses, other studies show the positive role of supplementation with moderate levels of antioxidants, especially in the

immune system (De la Fuente et al. 2011; Pae et al. 2012).

There is an extensive list of antioxidant compounds with health-supporting properties. However, the effects of these antioxidants, administered by diet, on the immune functions are scarcely known for many of them. One of the most thoroughly studied antioxidants in this context is zinc (Zn). Zn is very important for optimal functioning of the immune system, especially in elderly subjects, in which a deficiency of Zn is very common (due to inadequate diet and/or intestinal malabsorption). However, higher than recommended upper limits of zinc may adversely affect immune function (Pae et al. 2012). Other antioxidants show important favorable effects on health, acting on the immune system in both laboratory animals and human subjects. This is the case of beta-carotene, coenzyme Q, alpha-tocopherol (vitamin E), ascorbic acid (vitamin C), polyphenols, as well as thiolic antioxidants such as thioproline (TP) and N-acetylcysteine (NAC), which are precursors of reduced glutathione (GSH), among others, either in isolation or in nutritional formulations containing more than one of these compounds (De la Fuente et al. 2011; Pae et al. 2012). These compounds, which have not only antioxidant but also anti-inflammatory actions, have shown immunomodulator properties since they produce an increase of the functions and antioxidant defenses that are depressed and a decrease of functions and oxidant parameters that are excessively active. Thus, they may bring each immune function and redox parameter to its optimum level. This modulating ability appears to be carried out, at least in part, through the ubiquitous intracellular factors implicated in oxidation and inflammation, such as the NF κ B.

In addition, this regulatory role of the antioxidants is performed not only in the immune system but also in the other regulatory systems, including the nervous system, in which the oxidative stress also underlies its senescent impairment. Thus, the oxidative and inflammatory stress that appears to play a fundamental role in the aging of both the immune system and the nervous system could be counteracted to a certain degree by antioxidant administration. Therefore,

antioxidant diet supplementation may be a useful procedure to neutralize or postpone the age-related homeostatic impairment and consequently increase life span, as has been observed in mice (De la Fuente et al. 2011). Since the effects of antioxidants on the immune system are similar in mice and humans and because these changes in mice are accompanied by an increase in longevity, it is probable that similar effects could be obtained in humans.

In summary, it seems reasonable to propose that the administration of adequate amounts of antioxidant compounds may be effective in neutralizing or slowing down the loss of homeostasis that occurs with age and consequently to slow down the aging process. Nevertheless, the effectiveness of the antioxidants depends on the administered amount of these compounds; therefore, the age-related appropriate dose, especially to improve the immune response, should be investigated further (for more details, see Chaps. 20 and 22).

2.5.1.2 Caloric Restriction (CR)

There are many studies showing that CR can slow down multiple aspects of the aging process and thus delays senescence and increases life span in a variety of animals, when these are compared to the respective controls fed ad libitum (Anderson and Weindruch 2012). Moreover, CR seems to delay the onset of numerous age-associated diseases including vascular diseases, atherosclerosis, diabetes mellitus, and autoimmune diseases and therefore decreases the death rate. Nevertheless, the universal applicability of CR as a strategy to slow down the rate of aging and extend life span is currently a highly controversial subject (Masoro 2009).

With respect to the effects of CR on immunity, several studies have reported this is a good strategy to improve immune function, protecting against infections and delaying or preventing development of cancer and metastasis. In this action, among other factors, the NF κ B is involved. In aged animals CR can maintain several functional parameters of immune cells at a level typically seen in healthy adults (Messaoudi et al. 2008; Ahmed et al. 2009; Masoro 2009).

However, the delay of immunosenescence that CR produces in experimental animals needs to be verified in humans. Recent studies have even suggested that CR might compromise the host's defense against infections (Pae et al. 2012). Although it is evident that most of the effects of CR are due to the decrease in the oxidative stress produced through its action on the metabolism, the exact mechanism of the antiaging action of CR remains poorly understood (Cavallini et al. 2008) (for more details, see Chap. 20).

2.5.2 Physical Activity

Physical exercise, since its association with health is well known (Kokkinos 2012), is another of the lifestyle factors proposed to improve health and quality of life in elderly. Physical exercise modulates physiological systems such as the muscle and cardiovascular systems but also the regulatory systems such as the immune system. In fact, performance of physical exercise has been associated with lower susceptibility to infections and other pathologies related with the immune system, compared to sedentary subjects. There is a wealth of information on the effects of physical exercise on the immune function of adult experimental animals and humans. Although conflicting results have been obtained, depending on the type, intensity, and frequency of exercise, as well as the immune function studied and state of the subject, it is generally accepted that acute or strenuous physical exercise induces an impairment of immune functions, increasing the risk of infections. Moreover, moderate training exercise leads to adaptations of the immune cells with improvement of their functions (Radak et al. 2008). Nevertheless, this is not true for all cell types and in all cases. Thus, intensity training has been associated with symptoms of transient depression of many immune functions, especially those of lymphocytes, leading to increased susceptibility to infection. However, this exercise also seems to induce an overstimulation of the response of phagocytic cells. It has been suggested that this stimulation of phagocytes, which involves the activation of factors

such as NF κ B, might counterbalance the decreased lymphoid activity and thus help the organism to prevent infectious diseases in situations where the specific adaptive immune response seems to be depressed. In addition, moderate training exercise leads to clear benefits of the immune system with improvement of its functions, both of adaptive and innate response, and therefore, it is associated with decreased susceptibility to infection processes. Moreover, in response to repetitive or graded exercise training, a decrease in oxidative stress and a resistance to oxidative damage also appears. This seems to be due to a downregulation of the release of ROS as consequence of an adaptation of antioxidant defenses, which increases their levels and activities (Walsh et al. 2011; De la Fuente et al. 2011).

Although in old animals or elderly humans the effects of physical exercise on the immune functions have been scarcely studied, the available data show that the practice of regular and moderate exercise is an important candidate for improving the immune function throughout the aging process and in elderly subjects, delaying the onset of immunosenescence (Simpson et al. 2012). However, the conflictive results on the effect of exercise on the immune system, abovementioned, are more common in aged subjects. In this context the question is if exercise produces oxidation, how could it decrease the increased levels of ROS of immune cells from old subjects? But, it is evident that physical exercise improves immune cell functions through the recovery of the oxidant/antioxidant and inflammatory/anti-inflammatory balance of these cells and consequently decreases oxidative-inflammatory-aging. Since the immune system is a homeostatic system if it is well controlled and its functions take place in the physiological context, they are efficient in infections and inflammatory situations. However, a badly regulated immune response can be detrimental and cause oxidative and inflammatory diseases. Currently, the optimal level of exercise that improves, but does not impair or overstimulate, a healthy immune function is still not really known.

For the optimal use of exercise as a therapeutic strategy against aging, many aspects have to be resolved, as it was previously proposed (De la

Fuente et al. 2011). For example, it should be answered when an increase in the production of ROS by immune cells, especially phagocytic cells, is positive and can enhance the microbicidal capacity and when it is negative, causing oxidative stress damage, or when an increase in inflammatory cytokine production is positive for improving the defenses of the body, or when does it become negative, causing inflammatory damage? It is possible that the levels of ROS and inflammatory compounds produced, as well as the capacity of these levels in each organism in promoting and maintaining the expression of antioxidant and anti-inflammatory defenses, could give us an answer to these questions.

In summary, before recommending physical exercise as a good therapeutic intervention in oxidative-/inflammatory-associated diseases in general and aging in particular, it is necessary to know the intensity, regularity, and duration of this exercise as well as the physiological state of each subject. Perhaps, it would be more interesting (from a physiological point of view) to think in terms of avoiding modern lifestyle-induced inactivity (sedentary), because this itself can deregulate the oxidative and inflammatory responses accelerating the aging processes. Thus, having an active life is another strategy to slow down aging (De la Fuente et al. 2011).

2.5.3 Environmental Enrichment

Environmental enrichment (EE) could be defined as an experimental approach in animal models that mimics the maintenance of an active social, mental, and physical life in humans. Thus, EE is a continuous enhancement in cognitive, sensorimotor, and physical activity, which overcomes emotional stress. In general, the positive effects of EE are manifested by many molecular, cellular, and functional modifications, which lead to an overall improvement in the physiological and physical well-being of the subjects (De la Fuente et al. 2011; Arranz et al. 2010c; De la Fuente and Arranz 2012).

The most frequently used EE protocol in rodents is housing the animals in large groups

and cages with several types of objects (running wheels, tunnels, ladders, etc.) and spatial configurations, which are changed frequently. This more complex housing, with the continual introduction of new objects, induces sensory, cognitive, motor, and social stimulation. Moreover, the availability of running wheels, ropes, ladders, tunnels, or bridges allows the animal to exercise, and since EE animals are housed in relatively large cages, typically in groups of 6–12 animals, they have the opportunity for more social interaction. The beneficial effects of EE on the nervous and endocrine systems have been largely studied. Thus, EE produces improvements in learning and memory, preventing age-related cognitive impairments and reversing some of the negative consequences of neurodegenerative diseases. Moreover, it increases brain plasticity and neurogenesis, particularly at the level of the hippocampus and cerebral cortex. These effects can also be mediated, at least in part, by the effect of EE modulating the levels of hormones, such as the sexual hormones. In addition, EE can be positive in the regulation of stress-related disorders, conferring stress resistance, since it is able to protect the animal from the consequences of uncontrollable stress exposure (Schloesser et al. 2010). Nevertheless, there are few studies on the effects of EE on the immune system. We have carried out a study on mice using the type of EE mentioned above, and the results have shown an improvement in many functions of immune cells as well as a decrease in the oxidative-inflammatory stress of these cells. These positive effects were especially remarkable in old animals after a short period of EE. Moreover, when the EE starts at an adult age, a great increase in longevity occurs (Arranz et al. 2010c). A recent study showed that in triple transgenic mice for Alzheimer's disease, EE improved several immune functions in males. The results obtained also suggested that active life (by means of EE) should be maintained until the natural death of the animal in order to preserve all the positive effects that this strategy exerts on the immune system (Arranz et al. 2011).

Hydrotherapy is another strategy, which can be considered as a type of EE, for improving the

neuroimmunoendocrine communication in old animals. In mice this therapy has consisted of simple baths (of 15 min/day) in normal hot tap water. After 2 and 4 weeks mice submitted to this EE showed an improvement of many behavioral parameters, which are clearly impaired with age. Moreover, this EE not only rejuvenated the nervous system of mice but also the immune system, improving all the functions of the immune cells studied, as well as their redox state (De la Fuente et al. 2011).

These results show that EE may reverse the age-related dysfunction in immunity, as well as confirm the importance of maintaining active mental and/or physical activity to improve the quality of life and even to obtain a healthy longevity.

2.5.4 Hormesis

A phenomenon called "hormesis" has been proposed as a good strategy to achieve a healthy aging (Calabrese et al. 2012). It can be defined as "a process in which exposure to a low amount of a chemical agent or environmental factors that are damaging in higher doses induces an adaptive beneficial effect on the cell or organism" (Mattson 2008). Hormesis is based on the fact that all living systems have the intrinsic ability to respond, to counteract, and to adapt to external and internal stress (Rattan 2008). In these adaptive responses to single or multiple mild stresses, after initial disruption of homeostasis, the organism responds with molecular and cellular protection and compensatory mechanisms, which provide beneficial effects activating the pathways of maintenance and repair of the biological systems. Thus, whereas excessive stress accelerates the aging process, the exposure to low doses of otherwise harmful agents, such as irradiation, food limitation, heat stress, exercise, hypoxia, and oxidant compounds, produces a variety of beneficial effects including improved health and an extended life span of organisms. These stressors which are called "hormetins" can be defined as any condition that may be potentially hormetic in physiological terms by involving one or more

pathways of stress response within a cell (Rattan and Demirovic 2009).

Many of the effects of the strategies mentioned above seem to be due to their hormetic properties. Several groups of hormetins have been proposed: (1) physical hormetins, such as heat, radiation and exercise; (2) biological and nutritional hormetins, such as nutrients and infections; and (3) physiological hormetins, such as mental challenge and focused attention or meditation (Rattan and Demirovic 2009). The mentioned above strategies, such as nutrition, exercise, as well as mental and social challenges of EE, which slow down aging belong to one of these groups. Thus, the positive effects of those strategies on the immune system and on a healthy aging could be based on the capacity of these strategies to carry out hormesis mechanisms through stimulating repair systems (Gaman et al. 2011).

In spite of the recent increase in studies on hormesis, the basic nature of this phenomenon remains largely unknown (Vaiserman 2010). Nevertheless, hormetic interventions seem to be relevant strategies to improve immune function, and the functionality of the other regulatory systems, and therefore to slow down the aging process (De la Fuente et al. 2011; Calabrese et al. 2012).

2.5.4.1 Hormetic Effects of Nutrition

The mechanism of action of many antioxidant compounds in oxidative stress may not be related only to their antioxidant properties but to their hormetic activities. For example, antioxidants can activate, at a determined level, hormetic transcription factors such as NF κ B and cAMP response element-binding protein (CREB), which result in the induction of genes encoding growth factors, antiapoptotic proteins, and antioxidant defenses (Mattson 2008). Moreover, several antioxidants such as polyphenols induce mitochondrial biogenesis, which is related to a more efficient energy production that contributes to a decrease in the levels of free radicals in the mitochondria and therefore to less oxidative tissue damage. Thus, many of the positive results obtained with a diet enriched with appropriated

amounts of antioxidants in the functions of the nervous, endocrine, and immune systems during aging could be attributed to the hormetic effects of these compounds. In fact, a hormetic role of dietary antioxidants with a U-shaped dose response in the redox situation of the organism has been proposed (Calabrese et al. 2010). Thus, many of the conflictive results obtained with the administration of antioxidant compounds could be due to the hormetic balance between the amount of antioxidant and the physiological state of the subject, especially at redox levels.

With respect to dietary caloric restriction (CR), this strategy represents a mild dietary stress that produces hormetic responses in the organism. For this reason, when the CR is carried out without malnutrition, it delays most age-related physiological changes and extends life span in experimental animals (Kouda and Iki 2010). CR can show its hormetic properties increasing the silent mating-type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1) mRNA expression, SIRT1 being a key regulator of many cellular defenses that allows survival in response to stress (Kouda and Iki 2010). CR also increases the levels and functions of heat shock proteins (HSP), these chaperones enhancing the stress resistance and consequently protecting cells against otherwise lethal levels of oxidative and metabolic stress. Other cytoprotective molecules upregulated by dietary energy restriction are the antioxidant defenses, which modulate the age-related oxidative stress situation.

Many cell responses to CR are the result of the upregulation of expression of proteins involved in the regulation of mitochondrial oxidative state, which is denominated mitohormesis (Ristow and Zarse 2010; Ristow and Schmeisser 2011).

2.5.4.2 The Hormetic Effects of Physical Exercise and EE

Physical exercise is another strategy, which acts using hormetic mechanisms. Exercise performance involves the activation of NF κ B signaling cascade, various stress kinases, antioxidant genes, as well as increasing levels of HSP and the expression of the mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2), allowing the generation of more

ATP and improving the mitochondria functions. All this provides crucial protection against oxidative stress and molecular damage in aging. Thus, exercise is a hormesis intervention, which could be a good preventive strategy in aging. It is necessary to take in account that physical exercise, even with moderate intensity, is a stress situation, and if this stress is weak, it can also generate hormetic responses. As previously mentioned, physical activity can produce a decrease in oxidative stress and a resistance to oxidative damage due to an upregulation in antioxidant enzymes. This happens especially in the skeletal muscle, which is recognized as a major source of free radical generation, but also in other tissues and cells and can be the cause of the beneficial effects on the immune function of regular and moderate physical exercise (Rattan 2008; Radak et al. 2008; De la Fuente et al. 2011).

The hormetic effect of EE is based on the fact that the continuous exposure to new objects and social interactions could be considered a mild stress condition. In fact, in experimental animals with EE, increased levels of adrenocorticotropic hormone (ACTH) and glucocorticoids along with an adrenal hypertrophy occur. This mild stress seems to be beneficial for the enriched animals to cope with other stressors (Moncek et al. 2004). The effect of EE on the hippocampus as already mentioned can explain how it may confer stress resistance, protecting the animal from the consequences of uncontrollable stress exposure. Most of the beneficial effects of hydrotherapy may also be due to thermal stress-inducing neuroendocrine reactions such as an enhancement of the HHA axis, leading to an increase of ACTH and corticosterone levels, as well as those of prolactin (PRL) and the growth hormone (GH). This therapy also induces a release of beta-endorphin that shows analgesic properties and improves the immune functions (De la Fuente et al. 2011).

2.5.4.3 Other Hormesis Interventions

Environmental toxins have also been used as possible hormetins (reviewed by Calabrese and Blain 2005). Since the response to low doses of toxins could be a good model of hormesis, we have studied the effects of an endotoxin, such as

lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli*, as a hormetin, using it in very low doses during the adult life of mice to try to improve the function and redox state of the immune cells in these animals when they are old. The results showed an improvement of nervous function as well as in several functions of the immune cells and in their redox state, all the values obtained being closer to those in the adult-mature control group (De la Fuente et al. 2011).

2.6 Conclusions and Recommendations

In recent publications, much research has been proposed in order to better define immunosenescence beyond the usual relative poorer responses of old subjects compared to young subjects (Vallejo 2011). This chapter attempts to highlight the relevant involvement of the immune system in the rate of aging through its involvement in oxi-inflamm-aging, as well as the relevance of several functional parameters of immune cells as markers of biological age and, therefore, predictors of mean longevity. Although more investigations are necessary in this scientific field, and it has been questioned that if any of the markers shown in the literature are true biomarkers of aging (Vasto et al. 2010), it seems proved that maintaining an immune function in conditions similar to that of an adult can assure better health and a longer life span. In addition, having similar values in the functions of immune cells as older subjects is related to a shorter life. Thus, several lifestyle strategies such as a good nutrition, the practice of mental and physical exercise, social relationship, and overcoming emotional stress, all of which produces hormetic adaptation, could be useful, improving those immune functions, necessary for maintaining our health, and therefore increasing our mean longevity. The fact that health preservation depends on the style of life and environmental factors in about 75 % suggests all the strategies mentioned above as good candidates to achieve a long and healthy longevity, and it shows our responsibility for obtaining this state of health. Moreover, the control of the effects of

these lifestyle factors on physiological systems, especially on the immune system, is very relevant, not only in the aging process but also from the fetal life of each subject (Dietert and Piepenbrink 2008).

More research is needed in order to clarify the best amount, frequency, time, moment, and organism situation for each individual with which these strategies would show higher beneficial effects. With respect to all the hormetic strategies commented, more studies are needed in order to better discriminate between their positive and possible negative effects to maintain health in the later stage of life. Nevertheless, the effectiveness of these strategies can be measured through their effects improving the immune function and thus the biological age, which allows a healthy longevity (Fig. 2.1).

Acknowledgements The author thanks Mr. D. Potter for his help with the English language revision of the manuscript and also expresses her gratitude to Dr. Ortega, Dr. Vallejo, Dr. Medina, Dr. Victor, Dr. Alvarado, Dr. Alvarez, Dr. Alonso, Dr. Arranz, Dr. Baeza, Dr. Gimenez-Llort, Ms De Castro, Ms Vida, Ms Hernandez, Ms Cruces, and Ms Maté for their invaluable help in performing several of the experiments which have allowed us to arrive at the ideas expressed in this chapter. This work was supported by grants of the MINECO (BFU2011-03336), Research Group of UCM (910379ENEROINN), and RETICEF (RD06/0013/0003) (RD12/0043/0018)(ISCIII-FEDER of the European Union).

References

- Ahmed T, Das SK, Golden JK et al (2009) Caloric restriction enhances T-cell-mediated immune response in adult overweight men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64:1107–1113
- Alonso-Fernandez P, De la Fuente M (2011) Role of the immune system in aging and longevity. *Curr Aging Sci* 4:78–100
- Alonso-Fernandez P, Maté I, De la Fuente M (2010) Neutrophils: markers of biological age and predictors of longevity. In: DeFranco JE (ed) *Neutrophils: lifespan, functions and role in disease*. Nova Science Publisher Inc, New York
- Anderson RM, Weindruch R (2012) The caloric restriction paradigm: implications for healthy human aging. *Am J Hum Biol* 24:101–106
- Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M (2007) Impairment of multiple immune functions in anxious women. *J Psychosom Res* 62:1–8
- Arranz L, De Vicente A, Muñoz M et al (2009) Impairment of immune function in the social excluded homeless population. *Neuroimmunomodulation* 16:251–260
- Arranz L, Caamaño J, 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. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65A:941–950
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I et al (2010b) Differential expression of Toll-like receptor 2 and 4 on peritoneal leukocyte populations from long-lived and non-selected old female mice. *Biogerontology* 11:475–482
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I et al (2010c) Environmental enrichment improves age-related immune system impairment. Long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Res* 13:415–428
- Arranz L, Lord JM, De la Fuente M (2010d) Preserved ex vivo inflammatory status and cytokine responses in naturally long-lived mice. *Age (Dordr)* 32:451–466
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I (2011) Effect of environmental enrichment on the immunoendocrine aging of male and female triple-transgenic 3xTg-AD mice for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 25:727–737
- Arranz L, Naudi A, De la Fuente M, Pamplona R (2013) Exceptionally old mice are highly resistant to lipoxidation-derived molecular damage. *Age (Dordr)* 35(3):621–635
- Atzmon G, Cho M, Cawthon RM et al (2010) Evolution in health and medicine Sackler colloquium: genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1710–1717
- 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
- Bandeau-Roche K, Walston JD, Huang Y et al (2009) Measuring systemic inflammatory regulation in older adults: evidence and utility. *Rejuvenation Res* 12:403–410
- Barak Y (2006) The immune system and happiness. *Autoimmun Rev* 5:523–527
- Barja G (2004) Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 27:595–600
- Bauer ME (2008) Chronic stress and immunosenescence. A review. *Neuroimmunomodulation* 15:244–253
- Benfante R, Reed R, Brody J (1985) Biological and social predictors of health in an aging cohort. *J Chronic Dis* 38:175–181
- Benjamin H (1947) Biologic versus chronologic age. *J Gerontol* 2:217–227
- Besedovsky HO, Del Rey A (2007) Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun* 21:34–44
- Besedovsky HO, Del Rey A (2011) Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem Res* 36:1–6

- Borkan A, Norris AH (1980) Assessment of biological age using a profile of physical parameters. *J Gerontol* 35:177–184
- Bulpitt CJ, Antikainen RL, Markowe HL et al (2009) Mortality according to a prior assessment of biological age. *Curr Aging Sci* 2:193–199
- Calabrese EJ, Blain R (2005) The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. *Toxicol Appl Pharmacol* 202:289–301
- Calabrese V, Cornelius C, Trovato A, Cavallaro M, Mancuso C, Di Rienzo L, Condorelli D, De Lorenzo A, Calabrese EJ (2010) The hormetic role of dietary antioxidants in free radical-related diseases. *Curr Pharm Des* 16:877–883
- Calabrese EJ, Iavicoli I, Calabrese V (2012) Hormesis: why it is important to biogerontologists. *Biogerontology* 13:215–235
- Carnes BA, Staats DO, Sonntag WE (2008) Does senescence give rise to disease? *Mech Ageing Dev* 129:693–699
- Cavallini G, Donati A, Gori Z et al (2008) Towards an understanding of the anti-aging mechanism of caloric restriction. *Curr Aging Sci* 1:4–9
- Corona AW, Fenn AM, Godbout JP (2012) Cognitive and behavioral consequences of impaired immunoregulation in aging. *J Neuroimmune Pharmacol* 7:7–23
- Couillard-Depres S, Iglsteder B, Aigner L (2011) Neurogenesis, cellular plasticity and cognition: the impact of stem cells in the adult and aging brain. *Gerontology* 57:559–564
- De la Fuente M (1985) Changes in the macrophage function with aging. *Comp Biochem Physiol* 81:935–938
- De la Fuente M (2004) The immune system as a marker of health and longevity. *Antiaging Med* 1:31–41
- De la Fuente M (2010) Murine models of premature ageing for the study of diet-induced immune changes. Improvement of leukocyte functions in two strains of old prematurely ageing mice by dietary supplementation with sulphur-containing antioxidants. *Proc Nutr Soc* 69:651–659
- De la Fuente M, Arranz L (2012) The importance of the environment in brain aging: be happy, live longer! In: Thakur MK, Rattan SI (eds) *Brain aging, therapeutic interventions*. Springer, New York
- De la Fuente M, De Castro NM (2012) Obesity as a model of premature immunosenescence. *Curr Immunol Rev* 8:63–75
- 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
- De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo MC (2005) The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal* 7:1356–1366
- De la Fuente M, Hernandez O, Cruces J et al (2011) Strategies to improve the functions and redox state of the immune system in aged subjects. *Curr Pharm Des* 17:3966–3993
- Dewan SK, Zheng SB, Xia SJ (2012) Senescent remodeling of the immune system and its contribution to the predisposition of the elderly to infections. *Chin Med J* 125:3325–3331
- Dietert RR, Piepenbrink MS (2008) The managed immune system: protecting the womb to delay the tomb. *Hum Exp Toxicol* 27:129–134
- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95
- 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. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50:B378–B382
- Franceschi C, Bonafe M, Valensin S et al (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908:244–254
- Frasca D, Blomberg BB (2009) Effects of aging on B cell function. *Curr Opin Immunol* 21:425–430
- Fulop T, Larbi A, Kotb R et al (2011) Aging, immunity, and cancer. *Discov Med* 11:537–550
- Gaman L, Stoian I, Atanasiu V (2011) Can ageing be slowed?: hormetic and redox perspectives. *J Med Life* 4:346–351
- Garrido P (2011) Aging and stress: past hypothesis, present approaches and perspectives. *Aging Dis* 2:80–99
- Gayoso I, Sanchez-Correa B, Campos C et al (2011) Immunosenescence of human natural killer cells. *J Innate Immun* 3:337–343
- Gimenez-Llort L, Mate I, Masnassra 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
- Gouin JP, Hantsoo L, Kiecolt-Glaser JK (2008) Immune dysregulation and chronic stress among older adults: a review. *Neuroimmunomodulation* 15:254–262
- Goyns MH (2002) Genes, telomeres and mammalian ageing. *Mech Ageing Dev* 123:791–799
- 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
- Guayerbas N, Puerto M, Víctor VM et al (2002) Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 37:249–256
- Haman D (2006) Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 1067:10–21
- Harman D (1956) Ageing: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 2:298–300
- Hayflick L (2007) Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* 1100:1–13
- Haynes L, Maue AC (2009) Effects of aging on T cell function. *Curr Opin Immunol* 21:414–417
- Hernanz A, Bayon J, Bisbal E et al (2008) Leukocyte functions are altered in patients with depressive disorder. *J Neuroimmunol* 197:167–168

- Jenny NS (2012) Inflammation in aging: cause, effect, or both? *Discov Med* 13:451–460
- Kirkwood TBL (2008) Gerontology: healthy old age. *Nature* 455:739–740
- Kokkinos P (2012) Physical activity, health benefits, and mortality risk. *ISRN Cardiol*. doi:10.5402/2012/718789
- Kouda K, Iki M (2010) Beneficial effects of mild stress (hormetic effects): dietary restriction and health. *J Physiol Anthropol* 29:127–132
- Lang PO, Govin S, Aspinall R (2013) Reversing T cell immunosenescence: why, who and how. *Age* 35(3):609–620
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:434–445
- Makrantonaki E, Schonknecht P, Hossini AM (2010) Skin and brain age together: the role of hormones in the ageing process. *Exp Gerontol* 45:801–813
- Masoro EJ (2009) Caloric restriction induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1790:1040–1048
- Mattson MP (2008) Hormesis defined. *Ageing Res Rev* 7:1–7
- Medvedev ZA (1990) An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* 65:375–398
- Messaoudi I, Fischer M, Warner J et al (2008) Optimal window of caloric restriction onset limits its beneficial impact on T-cell senescence in primates. *Aging Cell* 7:908–919
- Miquel J (1998) An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 33:113–126
- Miquel J, Economos AC, Fleming J et al (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 15:575–591
- Moncek F, Duncko R, Johansson BB et al (2004) Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol* 16:423–431
- Nakamura E, Miyao K (2007) A method for identifying biomarkers of aging and constructing and index of biological age in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62:1096–1105
- Ogata K, Yokose N, Tamura H et al (1997) Natural killer cells in the late decades of human life. *Clin Immunol Immunopathol* 84:269–275
- Pae M, Meydani SN, Wu D (2012) The role of nutrition in enhancing immunity in aging. *Aging Dis* 3:91–129
- Pandey KB, Rizvi SI (2010) Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Med Cel Longevity* 3:2–12
- Park J, Cho B, Kwon H (2009) Developing a biological age assessment equation using principal component analysis and clinical biomarkers of aging in Korean men. *Arch Gerontol Geriatr* 49:7–12
- Pauwels EK (2011) The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk. *Med Princ Pract* 20:103–111
- Pawelec G (2006) Immunity and ageing in man. *Exp Gerontol* 41:1239–1242
- Pawelec G, Larbi A, Derhovanesian E (2010) Senescence of the human immune system. *J Comp Pathol*. doi:10.1016/j.jcpa.2009.09.005
- Puerto M, Guayerbas N, Alvarez 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
- Radak Z, Chung HY, Koltai E et al (2008) Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev* 7:34–42
- Rattan SI (2008) Hormesis in aging. *Ageing Res Rev* 7:63–78
- Rattan SI, Demirovic D (2009) Hormesis can and does work in humans. *Dose Response* 8:58–63
- Ristow M, Schmeisser S (2011) Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 51:327–336
- Ristow M, Zarse K (2010) How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: the concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol* 45:410–418
- Ruiz Torres A (1991) Basic results for assessment of human ageing. *Arch Gerontol Geriatr* 12:261–272
- Salim S, Chugh G, Asghar M (2012) Inflammation and anxiety. *Adv Protein Chem Struct Biol* 88:1–25
- Salminen A, Huuskonen J, Ojala J (2008a) Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev* 7:83–105
- Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T et al (2008b) SIRT1 longevity factor suppresses NF- κ B-driven immune responses: regulation of aging via NF- κ B acetylation? *Bioessays* 30:939–942
- Schloesser RJ, Lehmann M, Martinowich K et al (2010) Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol Psychiatry* 15:1152–1163
- Shaw AC, Joshi S, Greenwood H et al (2010) Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 22:507–513
- Simpson RJ, Lowder TW, Spielmann G et al (2012) Exercise and the aging immune system. *Ageing Res Rev* 11:404–420
- Strehler BL (1977) *Time, cells and aging*, 2nd edn. Academic, New York
- Vaiserman AM (2010) Hormesis, adaptive epigenetic reorganization, and implications for human health and longevity. *Dose Response* 8:16–21
- Vallejo AN (2011) Is immune aging a cause of disease among the elderly, or is it a passive indicator of general decline of physiologic function? *Aging Dis* 2:444–448
- Vasto S, Scapagnini G, Bulati M et al (2010) Biomarkers of aging. *Front Biosci* 2:392–402
- Viveros MP, Arranz L, Hernanz A et al (2007) A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 14:157–162
- Walford L (1969) *The immunologic theory of aging*. Williams & Wilkins, Baltimore

- Walsh NP, Gleeson M, Shepard RJ et al (2011) Positive statement. Part one: immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 17:6–63
- Wang L, Xie Y, Zhu LJ et al (2010) An association between immunosenescence and CD4(+) CD25(+) regulatory T cells: a systematic review. *Biomed Environ Sci* 23:327–332
- Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ et al (1990) Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 114:80–88
- Williams GC (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 2:397–411
- Yirmiya R, Goshen I (2011) Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun* 25:181–213
- Yoon SO, Yun CH, Cheng AS (2002) Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev* 50:1–8

