

El daño peroxidativo en leucocitos peritoneales de ratones viejos disminuye si se suplementa la dieta con galletas enriquecidas con antioxidantes. Relación con la supervivencia

C. Alvarado-Fradua^a, P. Álvarez-Cifuentes^a, N. Guayerbas-Valero^a, M. Puerto-Cantero^a, L. Jiménez^b y M. de la Fuente del Rey^a

^aDepartamento de Fisiología (Fisiología Animal II). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.

^bDanone Vitapole. Palaiseau Cedex. Francia.

RESUMEN

Introducción: el envejecimiento está asociado a un estrés oxidativo crónico que se manifiesta en un mayor daño a macromoléculas como es el caso de los lípidos, y el producto de degradación más representativo de éstos es el malondialdehído (MDA). Los leucocitos producen compuestos oxidantes para realizar sus funciones y son muy sensibles al daño oxidativo. Por ello, se han analizado las concentraciones de MDA en leucocitos peritoneales de ratones durante el envejecimiento, y el efecto, en animales viejos, de una dieta enriquecida con antioxidantes en estas concentraciones, así como su posible incidencia en la longevidad.

Material y métodos: el MDA se valoró por HPLC (*high-performance liquid chromatography*) en leucocitos peritoneales de ratones de la cepa ICR (CD 1) jóvenes (16 ± 2 semanas), adultos (36 ± 2 semanas), maduros (52 ± 2 semanas) y viejos (71 ± 2 y 81 ± 2 semanas), y en los de estos últimos tras la ingestión, durante 5 y 15 semanas de una dieta suplementada (en un 20% p/p) con galletas enriquecidas en antioxidantes. Estos animales viejos ingirieron hasta su muerte la dieta suplementada, para obtener la posible relación entre la ingestión de esta dieta y la longevidad.

Resultados: los valores de MDA aumentan con la edad, y la ingestión, en animales viejos, de una dieta enriquecida con antioxidantes, tanto durante 5 como 15 semanas, los disminuye; se observa una relación inversa entre los valores de MDA y la longevidad.

Conclusiones: en animales viejos, la ingestión de una dieta enriquecida en antioxidantes disminuye el grado de peroxidación lipí-

dica en leucocitos peritoneales, lo que se refleja en un aumento de su longevidad.

Palabras clave

Envejecimiento. Malondialdehído (MDA). Leucocitos. Antioxidantes. Dieta. Peroxidación lipídica. Estrés oxidativo.

Lipid peroxidation in peritoneal leukocytes from aged mice is decreased by antioxidant dietary supplementation. Relationship with survival

ABSTRACT

Introduction: ageing is associated with chronic oxidative stress, which leads to increased damage to macromolecules, such as lipids. One of the most important end products of lipid peroxidation is the malondialdehyde molecule (MDA). Leukocytes produce reactive oxygen species to support their functions and are highly sensitive to oxidative damage. The aim of this study was to ascertain MDA levels in peritoneal leukocytes from mice during ageing, as well as the effect of antioxidant dietary supplementation in aged mice on the levels of this molecule and its possible incidence on longevity.

Material and methods: MDA levels were assessed by high-performance liquid chromatography in peritoneal leukocytes from ICR (CD 1) mice at young (16 ± 2 weeks), adult (36 ± 2 weeks), mature (52 ± 2 weeks) and old (71 ± 2 and 81 ± 2 weeks) ages. At the latter age, MDA content was also measured after 5 and 15 weeks of dietary supplementation (20% w/w) with biscuits enriched with nutritional doses of antioxidants. The mice received the supplementation until death to ascertain the possible relationship between ingestion of an antioxidant-enriched diet and longevity.

Results: MDA levels increased during ageing, whereas the levels of lipid peroxidation decreased after 5 and 15 weeks of antioxidant dietary supplementation in aged mice. Moreover, an inverse relationship between MDA content and longevity was observed.

Conclusions: our results demonstrate that in aged mice ingestion of an antioxidant-enriched diet decreases lipid peroxidation in peritoneal leukocytes, leading to increased longevity.

Key words

Ageing. Malondialdehyde (MDA). Leukocytes. Antioxidants. Diet. Lipid peroxidation. Oxidative stress.

Correspondencia: M. de la Fuente.

Departamento de Fisiología. Fisiología Animal II.

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.

28040 Madrid. España.

Correo electrónico: mondelaf@bio.ucm.es

Recibido el 24-05-05; aceptado el 22-07-05.

Este trabajo ha sido financiado por Danone Vitapole (Francia).

Este trabajo ha recibido el premio Pañella Casas 2004 a la mejor comunicación oral del Área Biológica presentada en el XLVI Congreso nacional de la Sociedad Española de Geriátrica y Gerontología, celebrado en Las Palmas de Gran Canaria del 9 al 12 de junio de 2004.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso progresivo que conlleva el deterioro de las funciones fisiológicas. Hasta el momento, se ha propuesto un elevado número de teorías para explicar los mecanismos que subyacen a este proceso¹, pero es la teoría de los radicales libres, propuesta inicialmente por Harman² en los años cincuenta, la que ha conseguido una mayor aceptación por la gran cantidad de evidencias experimentales aportadas por diferentes autores^{3,4}. Esta teoría se basa en la pérdida de equilibrio entre la tasa de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que aumenta, y la actividad de los diferentes sistemas antioxidantes, que disminuye, hecho que conduce a una situación de estrés oxidativo en la cual la mitocondria desempeña un papel fundamental^{3,5}. Esta oxidación provoca un deterioro irreversible de las principales macromoléculas de la célula, entre las que se encuentran los lípidos⁶. Uno de los productos finales de degradación que se forman durante el proceso de peroxidación lipídica es el malondialdehído (MDA), molécula muy ampliamente utilizada como marcador de daño oxidativo a lípidos y de envejecimiento^{7,8}. En los últimos años, se ha llevado a cabo una serie de estudios que han permitido establecer una relación positiva entre la tasa de producción de radicales del oxígeno en la mitocondria y el daño oxidativo a los lípidos, que a su vez depende estrechamente del grado de insaturación de los ácidos grasos de estas macromoléculas. También, por su parte, el grado de insaturación de los ácidos grasos de los lípidos de membrana es capaz de modular el daño oxidativo tanto de los lípidos como el producido a otras macromoléculas^{9,10}. Este estado de estrés oxidativo presente en las células ha sido correlacionado negativamente con la tasa de envejecimiento de las diferentes especies animales y, consecuentemente, con su esperanza de vida⁹⁻¹². Además, el MDA es capaz de perpetuar el daño oxidativo, ya que puede interaccionar con otras macromoléculas, como las proteínas y el ADN, alterando tanto su estructura como su funcionalidad¹³. Por tanto, el MDA se forma como consecuencia del daño a lípidos originado por el estrés oxidativo que tiene lugar durante el proceso de envejecimiento, y a la vez es precursor de este tipo de daño a otras macromoléculas de la célula, por lo que la elevación de sus concentraciones es a la vez consecuencia y causa del deterioro celular que se observa con la edad.

La función de las células inmunitarias depende en gran medida del equilibrio entre oxidantes/antioxidantes¹⁴⁻¹⁶. Para desempeñar correctamente su función, los leucocitos necesitan producir radicales libres y, consecuentemente, requieren unos valores óptimos de antioxidantes que neutralicen el exceso de compuestos oxidantes, muy reactivos, y que mantengan un ambiente de carácter reductor que les proteja frente al daño oxidativo¹⁵. Al envejecer, los leucocitos aumentan la producción de compuestos oxidantes y disminuyen las defensas antioxidantes, y se produce un estado de estrés oxidativo¹⁶⁻¹⁸. Además, las células inmunitarias son más susceptibles al

daño por el estrés oxidativo que otros tipos celulares, ya que contienen en sus membranas un elevado porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados¹⁴, hecho que favorece el proceso de peroxidación lipídica.

Actualmente es aceptado que con el envejecimiento se produce un deterioro de la función del sistema inmunitario¹⁸⁻²⁰, y se ha sugerido que dicho deterioro tiene como base el estrés oxidativo que aparece en las células de este sistema^{4,16-18} y que es la causa del daño en sus macromoléculas, como se ha comprobado sucede en el ADN nuclear de los leucocitos¹⁷. Apoyando esta hipótesis, toda una serie de grupos, incluido el nuestro, han comprobado que la suplementación de la dieta con compuestos antioxidantes mejora la función de las células inmunitarias^{15,21-23}. Concretamente, la ingestión de una dieta suplementada con galletas enriquecidas en cantidades nutricionales de varios antioxidantes mejora la funcionalidad de leucocitos peritoneales de ratones jóvenes con envejecimiento prematuro²⁴.

Sobre la base de lo anteriormente comentado, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la evolución de los valores de MDA durante el envejecimiento en leucocitos peritoneales de ratones, y el efecto que tiene en este marcador de peroxidación lipídica la ingestión, en animales viejos, de una dieta suplementada con galletas enriquecidas en cantidades nutricionales de varios antioxidantes, así como la relación entre la administración de esta dieta con la longevidad de los animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y grupos experimentales

Se emplearon ratones hembra de la cepa ICR (CD 1) (Harlan Ibérica, Barcelona, España) jóvenes (16 ± 2 semanas), adultas (36 ± 2 semanas), maduras (52 ± 2 semanas) y viejas (de 71 ± 2 semanas y a partir de esa edad hasta su muerte). Los animales se establecieron en condiciones de humedad y temperatura constantes (22 ± 2 °C) y con un ciclo invertido de luz/oscuridad de 12 h. Se alimentaron con una dieta estándar (pienso A04 de Panlab L.S Barcelona, España) y agua del grifo *ad libitum*. Los animales fueron tratados en todo momento de acuerdo con la normativa indicada por la Directiva Comunitaria 86/6091 EEC.

Los animales viejos fueron divididos aleatoriamente en un grupo control (recibieron un 100% de dieta estándar) y un grupo suplementado con antioxidantes, el cual recibió una dieta constituida en un 80% por pienso estándar y en un 20% por galletas (Danone Vitapole) enriquecidas en cantidades nutricionales con antioxidantes tales como vitamina C, E, betacarotenos, cinc y selenio (tabla 1). La suplementación de la dieta con estos antioxidantes se mantuvo hasta la muerte de los animales, obteniéndose leucocitos peritoneales de estos ratones tras 5 semanas

TABLA 1. Composición nutricional de las dietas utilizadas

<i>Dietas</i>	<i>Energía</i>	<i>Hidratos de carbono</i>	<i>Grasas</i>	<i>Proteínas</i>	<i>Vitamina C</i>	<i>Vitamina E</i>	<i>Betacarotenos</i>	<i>Cinc</i>	<i>Selenio</i>
	(kcal/100 g)	(g/100 g)	(g/100 g)	(g/100 g)	(mg/100 g)	(mg/100 g)	(mg/100 g)	(mg/100 g)	(μg/100 g)
Estándar (Panlab A04)	291	60,0	2,83	15,3	0	1,7	0	7,9	20,0
Galletas	323,6	62,3	5,7	14,5	13,9	6,2	0,7	4,3	28,2

(animales de 18 meses de edad) y 15 semanas (animales de 20 meses de edad) de ingestión de dicha dieta. Se analizó la esperanza de vida de estos ratones que continuaron ingiriendo la dieta suplementada en comparación con los que tomaban dieta estándar.

Valoración del daño oxidativo a los lípidos: concentraciones de malondialdehído

La valoración de MDA se llevó a cabo mediante una técnica basada en el método del ácido tiobarbitúrico (TBA). El MDA tiene la capacidad de reaccionar con el TBA, lo que da lugar a la formación de un compuesto coloreado rosa que tiene un máximo de absorción a 532 nm, el cual se detecta mediante HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) con detector UV. La medida se realizó en alícuotas de 5×10^5 leucocitos peritoneales resuspendidos en Hank's y congelados a -80°C hasta el momento de la valoración. Las muestras se lavaron por centrifugación a 5.000 g durante 10 min a 4°C , desechando el sobrenadante se añadieron 100 μl de KH_2PO_4 50 mmol pH 6,8. A continuación se homogeneizaron las células por sonicación, siempre mantenidas en hielo. Una vez sonicadas se añadió al Eppendorf la mezcla de reacción que consistió en 150 μl de H_3PO_4 (Fluka), 0,44 mol, 50 μl de TBA (Sigma) (6 mg/ml) y 10 μl de hidroxitolueno butilado (BHT) (Sigma) 3 mmol (compuesto que previene la autooxidación de la muestra durante la fase de calentamiento, evitando así la obtención de valores de MDA más elevados). Después se incubaron en un baño a 95°C durante 30 min, transcurridos los cuales se paró la reacción con hielo y se añadieron 250 μl de n-butanol (Panreac), centrifugando rápidamente a 13.000 rpm durante 5 min a 4°C . De la fase superior (fase orgánica) se inyectaron 50 μl en el HPLC. Las condiciones de la medición fueron las siguientes: flujo, 0,4 ml/min; fase móvil, 80%; KH_2PO_4 , 50 mmol; pH, 6,8; 20% de metanol; λ, detector UV a 532 nm, Columna Novapack C18 (15 cm x 3,9 mm). Los valores de MDA se expresaron como nmol/ 10^6 células.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE). En primer lugar se llevó a cabo el análisis estadístico de la evolución de los niveles de MDA durante el envejecimiento, para lo cual se utilizó el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). La evaluación del efecto de la suplementación con antioxidantes se efectuó mediante

la prueba de la t de Student. El estudio de la normalidad de las variables se realizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Para la obtención de las curvas de longevidad se utilizó el test de Kaplan-Meier, con la base de la prueba de rangos logarítmicos para las comparaciones entre los diferentes grupos. En todos los casos el criterio de mínima diferencia estadísticamente significativa fue $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Como se observa en la figura 1 los valores de MDA aumentan progresivamente durante el envejecimiento: desde los jóvenes, que presentan los valores más bajos, hasta los viejos, cuando las cifras de MDA alcanzan los valores más elevados; entre ellos hay diferencias estadísticas muy significativas ($p < 0,001$). También, en comparación con los valores de adultos, el análisis estadístico revela diferencias significativas tanto en jóvenes como en viejos ($p < 0,01$).

En ratones viejos, la ingestión de una dieta suplementada con compuestos antioxidantes, después de 5 o 15 semanas, disminuye significativamente ($p < 0,001$) los valores de peroxidación lipídica (fig. 2); resulta más efectivo el tiempo mayor de ingesta ($p < 0,05$).

En relación al estudio de la esperanza de vida, el análisis estadístico basado en el test de Kaplan-Meier revela que el grupo suplementado con antioxidantes a partir de la vejez, experimenta un aumento significativo de la longevidad media ($p = 0,01$) con respecto al grupo control que ingirió únicamente dieta estándar (fig. 3).

Con los datos del presente trabajo y otros obtenidos también en nuestro laboratorio en ratones de la misma cepa suplementados durante 5 semanas con la dieta aquí administrada, se efectuó un análisis de regresión lineal entre los valores de MDA a lo largo de las diferentes edades (fig. 4), para comparar la asociación entre el grado de peroxidación lipídica y el envejecimiento en animales que recibieron dieta estándar o suplementada con varios antioxidantes. Los resultados revelan que en el grupo control existe un alto grado de asociación entre el valor de peroxidación lipídica y la edad de los animales ($p < 0,001$). Sin embargo, en el grupo cuya dieta fue suplementada con antioxidantes, el grado de asociación entre la edad y los valores de MDA fue bajo ($p = 0,018$).

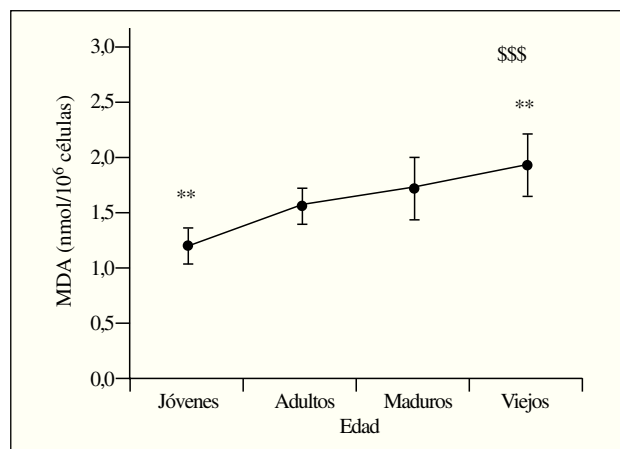


Figura 1. Evolución de las concentraciones de malondialdehído (MDA) (nmol/10⁶ células) con el envejecimiento en animales jóvenes (J), adultos (A), maduros (M) y viejos (V). Cada punto representa la media $\pm$ desviación estándar (DE) de 10 valores correspondientes a 10 animales; cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado. ** $p < 0,01$ con respecto del valor de MDA obtenido en los animales adultos. \$\$\$ $p < 0,001$ respecto del valor de MDA obtenido en los animales jóvenes.

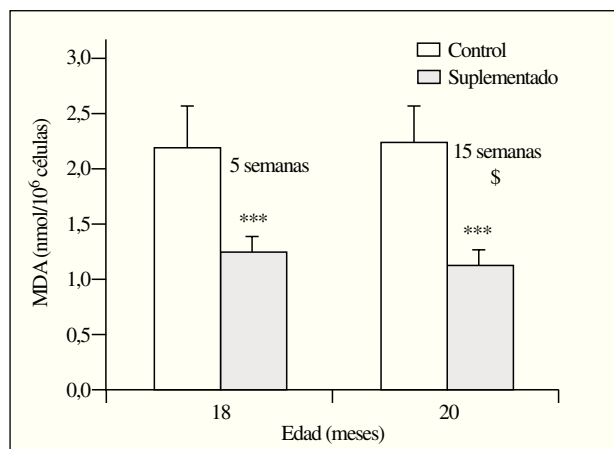


Figura 2. Valores de malondialdehído (MDA) (nmol/10⁶ células) en ratones viejos tras 5 y 15 semanas de suplementación de la dieta con compuestos antioxidantes. Cada columna representa la media $\pm$ desviación estándar (DE) de 10 valores correspondientes a 10 animales; cada valor es la media de ensayos realizados por duplicado. *** $p < 0,001$ con respecto del valor de MDA obtenido en los animales que han recibido dieta estándar. \$ $p < 0,05$ respecto del valor de MDA obtenido tras 5 semanas de dieta suplementada con antioxidantes.

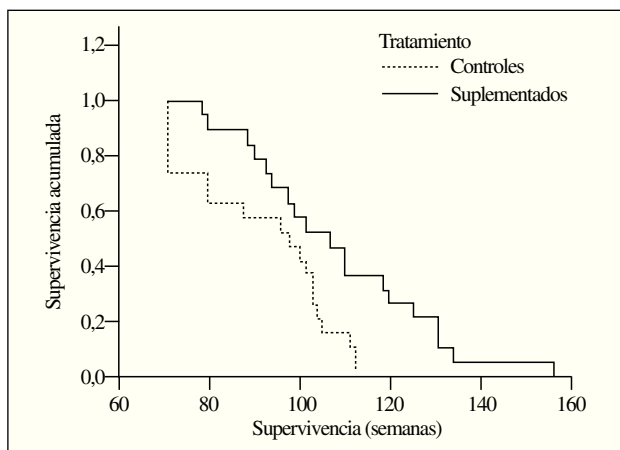


Figura 3. Supervivencia de los controles frente a los suplementados. Para obtener las curvas de supervivencia se utilizaron los animales cuya suplementación se inició en la vejez y se mantuvo hasta el momento de la muerte, contabilizando el tiempo de supervivencia en semanas. Prueba de rangos logarítmicos, 0,0102.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha comprobado que la peroxidación lipídica, valorada por las concentraciones de MDA en leucocitos peritoneales de ratón, aumenta con la edad. Este hecho confirma aportaciones previas que han demostrado que al envejecer el daño oxidativo a macromoléculas tales como el ADN, los lípidos o las proteínas va aumentando debido al estado de estrés oxidativo crónico que se establece con el paso del tiempo²⁵. Es de destacar que en nuestro estudio se han utilizado células inmu-

nitarias obtenidas del peritoneo de los ratones sin necesidad de sacrificar a los animales. De este modo, si bien en trabajos previos ya confirmamos que la valoración del estado funcional de los leucocitos peritoneales era un excelente marcador de esperanza de vida²⁶, y que con la edad aparece un aumento del estrés oxidativo en estas células¹⁷, en el presente estudio se ha podido demostrar que la valoración del daño oxidativo a lípidos en leucocitos es un buen marcador de la longevidad que pueden alcanzar los individuos de una especie. Ya otros autores relacionaron los valores de MDA, junto con una mayor producción de radicales de oxígeno por la mitocondria, con la menor esperanza de vida de unas especies en relación con otras^{9,11}. En el presente trabajo, la disminución de las concentraciones de MDA en el grupo suplementado con antioxidantes, en comparación con los valores obtenidos en animales de la misma edad alimentados con dieta estándar (grupo control), se relaciona con una mayor longevidad.

Se debe tener en cuenta que las células inmunitarias tienen una gran tendencia a presentar un elevado grado de estrés oxidativo debido a la gran cantidad de oxidantes que producen para llevar a cabo muchas de sus funciones y al hecho de gastar muy rápidamente, en el desarrollo de sus actividades, las defensas antioxidantes que poseen^{16,18}. Asimismo, son muy sensibles al estrés oxidativo como consecuencia de la composición lipídica de sus membranas¹⁴. De hecho, como ha sugerido recientemente nuestro grupo, los leucocitos participan de forma importante en el estado de oxidación del organismo que se produce con el envejecimiento¹⁷. Por ello, comprobar que el aumento en el daño peroxidativo de los lípidos de estas células durante la vejez puede ser significativamente dis-

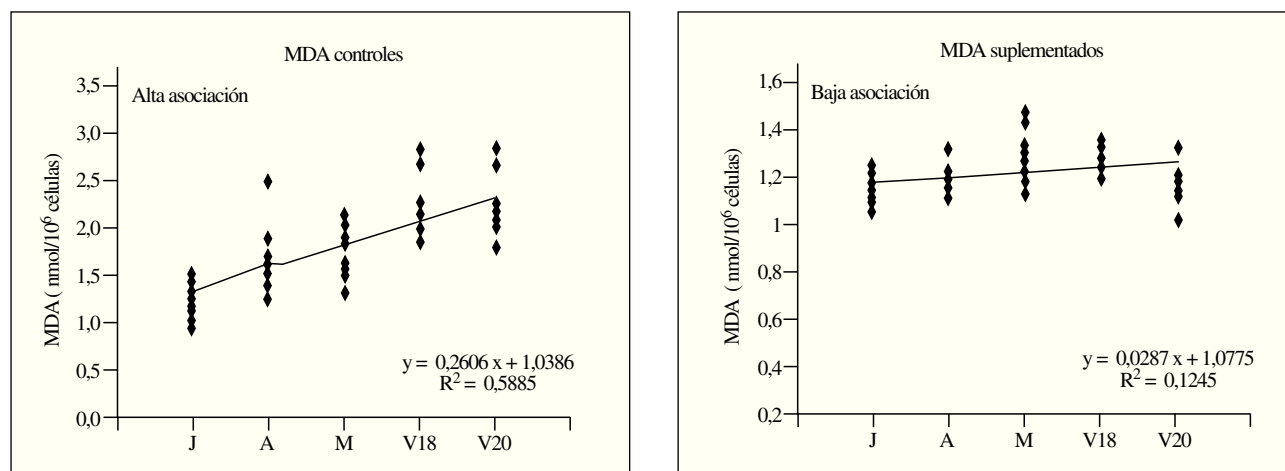


Figura 4. Regresión lineal entre las concentraciones de malondialdehído (MDA) (nmol/10⁶ células) y la edad en controles y suplementados. En cada edad están representados los valores de MDA de 10 animales. La ecuación obtenida en el caso de los controles nos indica un elevado grado de asociación entre ambas variables; sin embargo, en el caso de los animales en que se suplementó la dieta con antioxidantes el grado de asociación entre ambas variables es muy bajo. J: jóvenes; A: adultos; M: maduros; V18: viejos (18 meses); V20: viejos (20 meses).

minuido con una dieta enriquecida en antioxidantes, iniciada su administración a una edad avanzada, tiene una gran relevancia, y mucho más demostrar que esa disminución del daño peroxidativo se relaciona con una mayor longevidad de estos animales. Es evidente la repercusión de estos datos en el establecimiento de marcadores de envejecimiento y de estrategias de estilo de vida que permitan retardar los efectos inexorables del paso del tiempo. Además, el MDA no sólo es un buen marcador del envejecimiento y del daño oxidativo a lípidos, también es un compuesto que tiene la capacidad de propagar dicho daño al interactuar con otras moléculas, modificando tanto su estructura como su funcionalidad¹³. De este modo, la disminución de sus concentraciones en los leucocitos de los ratones que ingirieron la dieta enriquecida en antioxidantes, y la mayor longevidad de éstos, es una prueba más que confirma la teoría oxidativa del envejecimiento y apoya el hecho de que disminuir el estrés oxidativo en la vejez permite mantener una mejor salud y, consecuentemente, una mayor esperanza de vida media de los individuos.

Centrándonos en la eficacia de dietas ricas en antioxidantes, hay un elevado número de trabajos científicos que demuestran que toda una serie de diferentes compuestos con capacidad antioxidante son efectivos para mejorar la función inmunitaria, muy deteriorada en el envejecimiento²¹⁻²⁴. Todos los antioxidantes con los que están enriquecidas las galletas que se incorporan a la dieta administrada en el presente trabajo han demostrado tener efectos positivos en la función inmunitaria, tanto en humanos como en animales de experimentación^{14,22-24}. También, hay algunos trabajos que demuestran que esos antioxidantes pueden disminuir el estado de estrés oxidativo y el daño a macromoléculas como los lípidos. Así, la vitamina C y la vitamina E, en concentraciones moderadas, son necesarias para una protección óptima contra el

proceso de peroxidación lipídica en cobayas²⁷ y la suplementación con estas vitaminas también se ha mostrado eficaz en pacientes con lupus eritematoso, quienes presentan un gran estrés oxidativo que desencadena una serie de procesos patológicos asociados con una alta mortalidad²⁸. Además, el efecto protector de estos antioxidantes también se muestra en situaciones de estrés agudo inducido mediante lipopolisacárido bacteriano (LPS), en que los antioxidantes como la vitamina E, el betacaroteno y la N-acetilcisteína fueron capaces de disminuir las concentraciones de los indicadores de estrés oxidativo como el MDA y el contenido en glutatión en cerebro de rata²⁹.

No obstante, una serie de autores han comprobado que puede resultar más eficaz una mezcla de antioxidantes en cantidades apropiadas que cada uno de ellos por separado en cantidades mayores²². De hecho, se ha demostrado una mayor eficacia de estos compuestos cuando se utilizan de manera combinada³⁰. En un trabajo reciente de Actis-Goretta et al³¹, una suplementación regular con una mezcla de antioxidantes disminuye las concentraciones plasmáticas de MDA ya a los 20 días tras el inicio de la suplementación en humanos sanos. Nuestros resultados demuestran que la ingestión de una dieta enriquecida en una mezcla de cantidades muy bajas de antioxidantes, tanto durante 15 semanas como durante sólo 5 semanas, es efectiva para disminuir los valores de MDA; no obstante, resultó más eficaz el tiempo mayor de suplementación. Por otro lado, el análisis de la asociación entre el grado de peroxidación lipídica y las diferentes edades, en ratones controles y suplementados, reveló que estos últimos prácticamente no experimentaron cambios con el envejecimiento; sus concentraciones de MDA se modificaron sólo ligeramente y permanecieron con valores muy próximos a los encontrados en ratones jóvenes, mientras que, en el grupo

que recibió únicamente la dieta estándar, el aumento de las concentraciones de MDA fue mucho más marcado.

En relación con el efecto que puede tener una suplementación con antioxidantes en la esperanza de vida de los individuos, una serie de investigaciones, incluidas las de nuestro grupo, han comprobado un aumento de la longevidad en animales de experimentación³²⁻³⁴. Ese efecto se ha relacionado con la modulación que los antioxidantes son capaces de efectuar en parámetros relacionados con el grado de estrés oxidativo, tanto en diferentes órganos³²⁻³⁴ como en células inmunitarias (datos en vías de publicación).

Todo lo expuesto, así como lo que se deduce de recientes resultados obtenidos en otros trabajos en curso de nuestro laboratorio, sugiere que tomar una dieta que contenga cantidades apropiadas de compuestos con capacidad antioxidante, incluso a una edad avanzada, al controlar el estrés oxidativo, puede ayudar a mantener un mejor estado de salud y, consecuentemente, retardar la tasa de envejecimiento y aumentar la longevidad media de los individuos.

BIBLIOGRAFÍA

- Medvedev Z. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 1990;65:375-98.
- Harman D. Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J. Gerontol*. 1956;11:298-300.
- Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol*. 1998;33:113-26.
- Dröge W. Oxidative stress and aging. En: Roach RC, Vagner PD, Ackelt PH, et al, editors. *Hypoxia: Through the lifecycle*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003. p. 191-200.
- Sastre J, Pallardó FV, Viña J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:1-8.
- Pratico D. Lipid peroxidation and the aging process. *Sci Aging Knowledge Environ*. 2002;50:re5.
- Gil P, Farinas F, Casado A, López-Fernández E. Malondialdehyde: a possible marker of ageing. *Gerontology*. 2002;48(4):209-14.
- Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, et al. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCL(4) poisoning? *Free Radic Biol Med*. 2005;38(6):698-710.
- Barja G. Free radicals and aging. *Trends in Neurosci*. 2004;27:595-600.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Sanz A, Requena J, Barja G. Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exp Gerontol*. 2004;39(5):725-33.
- Pamplona R, Barja G, Portero-Otin M. Membrana fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Ann N Y Acad Sci*. 2002;959:475-90.
- Viña J, Pallardó F, Borrás C. Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males. *Antioxid Redox Signal*. 2003;5:549-56.
- Traverso N, Menini S, Maineri EP, Patriarca S, Odetti P, Cottalasso D, et al. Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59(9):B890-5.
- De la Fuente M. La nutrición y el sistema inmunitario en el envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2002;37(S3):17-25.
- Knight JA. Review: free radicals, antioxidants and the immune system. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30(2):145-58.
- De la Fuente M. Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56:5-8.
- 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:OL683-90.
- De la Fuente M. Inmunosenescencia. En: Cascales M, Cabezas JA, García P, editores. *Bioquímica y fisiopatología del envejecimiento*. Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia; 2003. p. 133-68.
- Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Ageing Cell*. 2004;3(4):161-7.
- Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, et al. T cells and aging. *Front Biosci*. 2002;7:d1056-183.
- Guayerbas N, Puerto M, Álvarez P, De la Fuente M. Improvement of the macrophage functions in prematurely ageing mice by a diet supplemented with thiolic antioxidants. *Cell Mol Biol*. 2004; Suppl 50:OL-667-75.
- Chandra RK. Impact of nutritional status and nutrient supplements on immune responses and incidence of infection in older individuals. *Ageing Res Rev*. 2004;3:91-104.
- Meydani M. Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction. *Mech Ageing Dev*. 1999;111:123-32.
- Alvarado C, Álvarez P, Jiménez J, 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(9-10):1203-10.
- Mecacci P, Fano G, Fulle S, Mac Garvey U, Shinobu L, Polidori MC, et al. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(3-4):303-8.
- 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(4):339-50.
- Barja G, Cadenas S, Rojas C, Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Prat J, et al. Effect of dietary vitamin E levels on fatty acid profiles and nonenzymatic lipid peroxidation in the guinea pig liver. *Lipids*. 1996;31(9):963-70.
- Tam LS, Li EK, Leung VY, Griffith JF, Benzie IF, Lim PL, et al. Effects of vitamin C and E on oxidative stress markers and endothelial function in patients with systemic lupus erythematosus: a double blind, placebo controlled pilot study. *J Rheumatol*. 2005;32(2):275-82.
- Kheir-Eldin AA, Motawi TK, Gad MZ, Abd-ElGawad HM. 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*. 2001;33(5):475-82.
- Mukai K, Mitani S, Ohara K, Nagaoka S. Structure-activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(9):1243-56.
- Actis-Goretta L, Carrasquedo F, Fraga CG. The regular supplementation with an antioxidant mixture decreases oxidative stress in healthy humans. Gender effect. *Clin Chim Acta*. 2004;349(1-2):97-103.
- Navarro A. Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. *Mol Aspects Med*. 2004;25(1-2):37-48.
- 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(5):279-85.
- Harman D. Aging: prospect for further increases in the functional life span. *Age*. 1994;17:119-46.