

Cambios con el envejecimiento en los valores de glutatión de células inmunitarias y plasma. Efecto de la administración de N-acetilcisteína

Lorena Arranz^a, Cesáreo Fernández^b, Antonio Rodríguez^b, José Manuel Ribera^b y Mónica De la Fuente^a

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

^bDepartamento de Geriatría. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España.

RESUMEN

Introducción: en trabajos previos hemos demostrado el deterioro con la edad de una serie de funciones de las células inmunitarias descritas como marcadores de salud y longevidad, e igualmente, hemos comprobado cómo éstas mejoran tras la administración del antioxidante precursor del glutatión: N-acetilcisteína (NAC).

Pacientes y métodos: se estudió a 36 mujeres posmenopáusicas seleccionadas aleatoriamente, 18 de 50-60 años y 18 de más de 70 años. La NAC se administró en dosis diaria de 600 mg, durante 4 meses. Antes de iniciarse el tratamiento, a los 2 meses de comenzar el mismo, una vez concluido y 3 meses después de su finalización, se procedió a la extracción de sangre periférica. Como control de edad se empleó a 18 mujeres de 30-40 años, a las que se extrajo sangre una única vez. Se estudiaron los valores de glutatión total en linfocitos, neutrófilos y plasma mediante cinética enzimática por espectrofotometría.

Resultados: con el envejecimiento se produce una disminución en los valores de glutatión. El tratamiento con NAC es capaz de aumentarlos en los leucocitos, efecto que no se ve reflejado en el plasma. El aumento en las células inmunitarias se aprecia ya a los 2 meses de tratamiento, es más relevante a los 4 meses y se mantiene a los 3 meses tras su finalización.

Conclusiones: la disminución en los valores de glutatión de las células inmunitarias con la edad podría explicar el deterioro funcional que éstas experimentan. La administración de NAC podría mejorar la función inmunitaria mediante el aumento de esos valores. Por otra parte, la determinación del glutatión plasmático no es una medida adecuada para conocer los valores de este antioxidante en el organismo y, consecuentemente, de su estado de estrés oxidativo, ya que puede no relacionarse con el experimentado por los leucocitos circulantes.

Este trabajo ha sido financiado por Zambon S.A. (Zambon Group), España. Este trabajo ha recibido el premio Salgado Alba 2006 a la mejor comunicación en forma de póster del Área Biológica presentada durante el 48.º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Geriatría y Gerontología, celebrado en Pamplona del 14 al 17 de junio de 2006.

Correspondencia: Dra. M. De la Fuente.

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.

C/ José Antonio Nováis, 2. 28040 Madrid. España.

Correo electrónico: mondela@bio.ucm.es.

Recibido el 27-12-2006; aceptado el 25-01-2007.

Palabras clave

Glutatión. N-acetilcisteína. Leucocitos. Plasma. Mujeres posmenopáusicas.

Changes with ageing in immune cell and plasma glutathione levels. Effect of N-acetylcysteine administration

ABSTRACT

Introduction: we previously demonstrated the ageing-associated decline of certain immune functions, which have been described as markers of health and longevity and confirmed that administration of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC), which is a glutathione precursor, improves these functions.

Patients and methods: thirty-six randomly selected postmenopausal women, 18 aged 50-60 years old and 18 aged more than 70 years were studied. NAC administration consisted in a daily 600 mg dose for 4 months. Peripheral blood samples were collected before starting administration, after 2 months' administration, at the end of the treatment period, and 3 months later. A group of 18 women aged 30-40 years was used as a control group. Samples from controls were drawn only once. Total glutathione levels in lymphocytes, neutrophils and plasma were studied by enzymatic kinetics using a spectrophotometer assay.

Results: glutathione levels declined with ageing in both leucocytes and plasma. NAC administration increased glutathione levels in leucocytes but not in plasma. The increase in immune cell glutathione levels was observed as early as 2 months after the start of NAC administration and was greater at 4 months. This effect continued for 3 months after the end of the treatment.

Conclusions: the age-related decline of glutathione levels in immune cells could play an important role in the functional impairment of these cells during the ageing process. Additionally, NAC could exert its beneficial effects on immune function via the increase in the glutathione content present in immune cells. Determination of plasma glutathione is not an accurate indication of the body's oxidative stress condition, since plasma levels might not be related to the levels of this antioxidant in blood leucocytes.

Key words

Glutathione. N-acetylcysteine. Leucocytes. Plasma. Postmenopausal women.

INTRODUCCIÓN

El aumento en la esperanza de vida media de las poblaciones de los países desarrollados ha dado lugar a un interés generalizado por conocer cuáles son los mecanismos que nos hacen envejecer y finalmente morir. En la actualidad, la teoría más aceptada que permite explicar el proceso de envejecimiento es la teoría de los radicales libres, propuesta inicialmente por Harman¹ en 1956, y posteriormente evidenciada y perfilada por numerosas aportaciones de diferentes autores^{2,3}. Según esta teoría, el envejecimiento es resultado del estrés oxidativo crónico que experimentan los organismos vivos, debido al desequilibrio entre la producción de compuestos oxidantes y la presencia o actividad de las defensas antioxidantes endógenas, a favor de los primeros. Esta oxidación progresiva conduce al daño de biomoléculas que, finalmente, es la causa del deterioro en las funciones fisiológicas que se produce con la edad, incluido el que se observa en la función inmunitaria^{4,5}. Es más, puesto que las células inmunitarias se encuentran especialmente ligadas a la génesis de especies reactivas de oxígeno para la realización de sus funciones, el equilibrio oxidantes/antioxidantes tiene una especial importancia para los leucocitos que, por otra parte, son particularmente sensibles al daño oxidativo⁶. Así, el sistema inmunitario parece ser especialmente sensible al proceso de envejecimiento; su deterioro está íntimamente relacionado con la morbilidad y la mortalidad asociadas con la edad, debido a las funciones esenciales que este sistema ejerce en el organismo. De hecho, el riesgo de tener infecciones, así como la gravedad de éstas, se encuentran aumentados en la vejez, del mismo modo que lo está la susceptibilidad al cáncer⁷. Por otra parte, la capacidad de preservar una función inmunológica adecuada ha demostrado ser un buen marcador de salud y predictor de longevidad⁸, lo que queda evidenciado en el caso de los animales que alcanzan una elevada longevidad y en los individuos centenarios, los cuales mantienen una buena función inmunitaria^{9,10}.

Dado que las células inmunitarias son una fuente importante de compuestos oxidantes y proinflamatorios, ambos deben encontrarse bajo el control exhaustivo de las defensas antioxidantes, ya que valores aumentados de estos compuestos pueden dañar no sólo a las propias células que los producen, sino también a las que forman parte de los tejidos vecinos¹¹. Por otra parte, el déficit en antioxidantes se ha asociado al declive en las respuestas inmunológicas, lo que a su vez conduce a infecciones graves y frecuentes que resultan en un aumento en la mortalidad¹¹. En este contexto es necesario tener en cuenta que, entre las defensas antioxidantes endógenas, el glutatión (GSH) es el antioxidante tiólico no enzimático más importante que presenta el organismo para prevenir del estrés oxidativo en la mayoría de células, tejidos y órganos¹². Este compuesto se requiere para eliminar el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos a través de la enzima glutatión peroxidasa, que lo transforma en su forma oxidada (GSSG). Así, el cociente glutatión oxida-

do/glutatión reducido (GSSG/GSH) es un importante indicador del estado redox celular¹³, que se encuentra implicado en respuestas tan vitales para el sistema inmunitario como la proliferación o la apoptosis¹⁴. El GSH es, además, esencial para la célula puesto que interviene en numerosas funciones como la síntesis de proteínas y ADN, el transporte de aminoácidos al interior de la célula, el mantenimiento de los grupos tiólicos intracelulares, la reducción enzimática del dehidroascorbato y la eliminación de compuestos tóxicos¹⁵. De esta forma, se ha demostrado que la depleción, incluso moderada, de las reservas intracelulares de GSH tiene dramáticas consecuencias para una variedad de funciones linfocitarias; son especialmente sensibles las dependientes de interleucina 2¹⁶. Por otro lado, el envejecimiento va acompañado de la disminución en este contenido en GSH, lo que se ha observado en numerosas células y tejidos, incluidos algunos componentes del sistema inmunológico¹⁷.

Sobre la base de lo anteriormente comentado, la administración exógena de compuestos tiólicos podría tener efectos beneficiosos mejorando el declive en la función inmunitaria asociado a la vejez. No obstante, dado que el GSH no penetra con facilidad al interior celular, sino que es sintetizado intracelularmente, su administración directa no es un procedimiento eficaz con el objetivo de aumentar los valores de tioles intracelulares^{18,19}. De esta forma, la administración de precursores del GSH, como la N-acetilcisteína (NAC), podría resultar mucho más efectiva gracias tanto a la neutralización directa de radicales libres²⁰ como a la recuperación de las reservas de GSH²¹. Además, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la suplementación de la dieta con NAC es capaz de mejorar la función inmunológica en ratones con envejecimiento prematuro^{22,23}, y que en humanos la administración de NAC es un método eficaz para mejorar el deterioro inmunitario que se produce en los individuos de edad avanzada²⁴⁻²⁶. El objetivo del presente trabajo fue, por una parte, conocer los cambios que experimentan con la edad los 2 tipos principales de células inmunitarias, linfocitos y fagocitos, en los valores de GSH, y comprobar si siguen el mismo perfil que en plasma, que es la muestra habitualmente empleada para verificar el estado oxidativo del organismo. Por otra parte, nos propusimos comprobar si la administración de NAC aumenta los valores de ese antioxidante en las mencionadas localizaciones.

PACIENTES Y MÉTODOS

Participantes

Todas las mujeres participantes eran españolas integrantes de la población de Madrid. Los criterios de inclusión en los grupos experimentales del ensayo fueron los que a continuación se detallan: 1) ser mujer posmenopáusica mayor de 50 o de 70 años, 2) gozar de un buen estado de salud, definido como ausencia de enfermedad o alteración analítica relevante clínicamente en alguno de los

siguientes parámetros: glucosa, urea, creatinina, alanina y aspartato transaminasas, bilirrubina, fosfatasa alcalina, hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y recuentos de células sanguíneas (plaquetas, eritrocitos, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos).

Los criterios de exclusión fueron: enfermedad general grave, enfermedades inmunológicas, cáncer, demencia o alteración cognitiva, enfermedad respiratoria crónica, hipertensión, diabetes, esperanza de vida inferior a 1 año, bajo nivel de colaboración y haber tomado acetilcisteína, vitaminas o antioxidantes durante los 6 meses previos al estudio.

El grupo de mujeres de 50-60 años fue obtenido del personal trabajador del Hospital Clínico San Carlos y de la Universidad Complutense de Madrid, mientras que las mujeres de más de 70 años se obtuvieron de las usuarias del Servicio de Geriatría del mismo hospital pertenecientes al programa «Envejecer con éxito». Se seleccionó aleatoriamente a un total de 1.000 candidatas, de las cuales 600 fueron contactadas. De ellas, 140 aceptaron participar en el estudio, pero 90 fueron retiradas por los criterios de exclusión anteriormente comentados. De las 50 mujeres restantes, se seleccionó a 19 de 50-60 años y 21 de más de 70, de forma aleatoria. De las 40 participantes que iniciaron el estudio en la primera visita, 4 se retiraron (1 de 50-60 años y 3 de más de 70) y no acudieron a la segunda visita. Posteriormente, otras 2 mujeres mayores de 70 años decidieron abandonar la investigación, una en la tercera visita y la otra en la cuarta.

Como control de edad adulta se emplea un grupo de 18 mujeres voluntarias compañeras de trabajo, familiares y conocidas del grupo investigador. Los criterios de inclusión fueron: 1) ser mujer de 30-40 años de edad, 2) gozar de una buena salud. Los criterios de exclusión fueron los mismos que los aplicados para los grupos experimentales.

Todas las participantes recibieron información detallada acerca del objetivo del estudio y dieron su consentimiento escrito para la utilización de sus muestras sanguíneas en investigación científica; se respetó en todo caso su derecho a la privacidad. Las participantes potenciales dieron su consentimiento informado antes del inicio de cualquier procedimiento relativo al estudio. Las muestras de sangre periférica (tomadas por punción venosa) fueron recogidas siempre a la misma hora, en el curso de cada entrevista clínica, con objeto de controlar el efecto de las variaciones circadianas sobre el sistema inmunitario, y en tubos con citrato como anticoagulante (BD Vacutainer Systems). En los grupos experimentales, las muestras sanguíneas fueron tomadas antes de iniciarse la administración de NAC, a los 2 meses del inicio de esa administración, una vez finalizada ésta (a los 4 meses) y 3 meses después de dicha finalización. A los controles de 30-40 años se les extrae sangre una única vez.

El presente estudio fue aprobado por el Comité Ético acreditado de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Se realizó conforme a las normas oficiales vigentes y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y los principios de la Declaración de Helsinki. Un monitor de ensayos clínicos (PHIDEA, S.L.) aseguró el desarrollo adecuado del estudio en los términos mencionados.

Antioxidante en estudio: N-acetilcisteína

La NAC es un derivado de un aminoácido natural, la cisteína, con un elevado grado de seguridad. El presente trabajo consistió en un estudio de fase IV con un principio activo de una especialidad farmacéutica autorizada. El antioxidante en estudio fue Flumil® (producido por Zambon Group, S.p.A., Italia, y suministrado por Pharmazam, S.A., España), en forma de comprimidos orales efervescentes que contienen 600 mg de NAC cada uno. La dosis diaria consistió en 600 mg de NAC disueltos en medio vaso de agua. La administración se realizó por la noche justo antes de acostarse, durante 4 meses. La correcta administración fue comprobada en las entrevistas clínicas correspondientes.

Entrevistas clínicas

Las entrevistas fueron llevadas a cabo por los médicos residentes Cesáreo Fernández y Antonio Rodríguez en una consulta del Departamento de Geriatría del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, en total privacidad. Se efectuaron un total de 4 visitas a los sujetos pertenecientes a los grupos experimentales. La primera visita se realizó el día 1 para la selección. La segunda visita se llevó a cabo a los 2 meses de iniciada la administración de NAC, la tercera, a los 4 meses, el último día de administración del antioxidante, y la cuarta, 7 meses después de iniciarse el estudio, 3 meses después de finalizar la administración de NAC. En cada una de ellas se realizó la extracción sanguínea.

En el curso de la primera entrevista clínica se anotaron los datos demográficos del paciente, las medicaciones concomitantes utilizadas, se realizó un examen físico completo, se evaluaron los síntomas y los parámetros funcionales, se dispensó el fármaco y se explicó al paciente cómo efectuar su correcta administración. En las siguientes entrevistas se valoraron todos los cambios a esta situación y los acontecimientos adversos. En la segunda y tercera visitas se evaluó además la medicación que habían tomado las pacientes.

Obtención de los linfocitos y los neutrófilos sanguíneos

Los linfocitos y neutrófilos periféricos se obtuvieron siguiendo una técnica previamente descrita²⁶, a través de un gradiente de sedimentación empleando Hystopaque de densidad 1,077 (Sigma, St. Louis, USA) para la sepa-

ración de los linfocitos y de 1,119 (Sigma) para los neutrófilos. Se obtuvieron las células de ambas interfases, que a continuación fueron lavadas 2 veces en solución salina tamponada de fosfatos (PBS). Una vez centrifugadas, las células se resuspendieron en 1 ml de medio Hank. Se realizó el recuento celular mediante microscopia óptica y se comprobó la pureza de la suspensión, mediante identificación de la morfología celular; ésta fue mayor o igual al 98% en todos los casos. Se ajustaron las suspensiones celulares a una concentración final de 10^6 linfocitos/ml o 10^6 neutrófilos/ml, utilizando medio Hank. Se comprobó además la viabilidad celular antes de cada ensayo mediante la prueba de exclusión del colorante azul Tripán (Sigma), y sólo se emplearon las muestras en las que ésta era mayor o igual al 99%.

Obtención del plasma

Para la obtención del plasma, se centrifugó 1 ml de sangre mezclada con citrato (0,9:0,1) durante 20 min a 1.000 g.

Medida de los valores de glutatión

Para la medida de los valores de GSH se empleó el método de Tietze²⁷, con algunas modificaciones²⁸; la monitorización de la variación en la absorbancia se realizó a 412 nm. Las alícuotas de 1 ml de suspensión de linfocitos y de neutrófilos (10^6 células/ml medio Hank) se centrifugaron a 1.200 g durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, los precipitados se resuspendieron en una solución de ácido tricloracético (TCA, Panreac, España) al 5% con HCl 0,01N (Panreac) y fueron sonicados en hielo y centrifugados a 3.200 g durante 5 min a 4 °C. Alícuotas de estos sobrenadantes, obtenidos de las suspensiones celulares, y de plasma se valoraron empleando en la mezcla de la reacción los siguientes componentes: 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB, 6 mM) (Sigma), β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, en su forma reducida (β -NADPH, 0,3 mM) (Sigma) y glutatión reductasa (GR, 10 U/ml) (Sigma). Se realizó el seguimiento de la reacción durante 240 s y los resultados se expresaron como nmol/ 10^6 células, en el caso del GSH presente en linfocitos y neutrófilos, y μ M en el caso del GSH circulante en plasma.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. La normalidad de las muestras se comprobó mediante el análisis de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias debidas a la edad fueron estudiadas mediante la prueba de ANOVA para muestras independientes, mientras que las diferencias debidas al tratamiento, dentro de cada grupo experimental, fueron evaluadas mediante la prueba de ANOVA para muestras apareadas. Un valor de $p < 0,05$ fue el criterio de mínima diferencia estadísticamente significativa empleado en todos los casos.

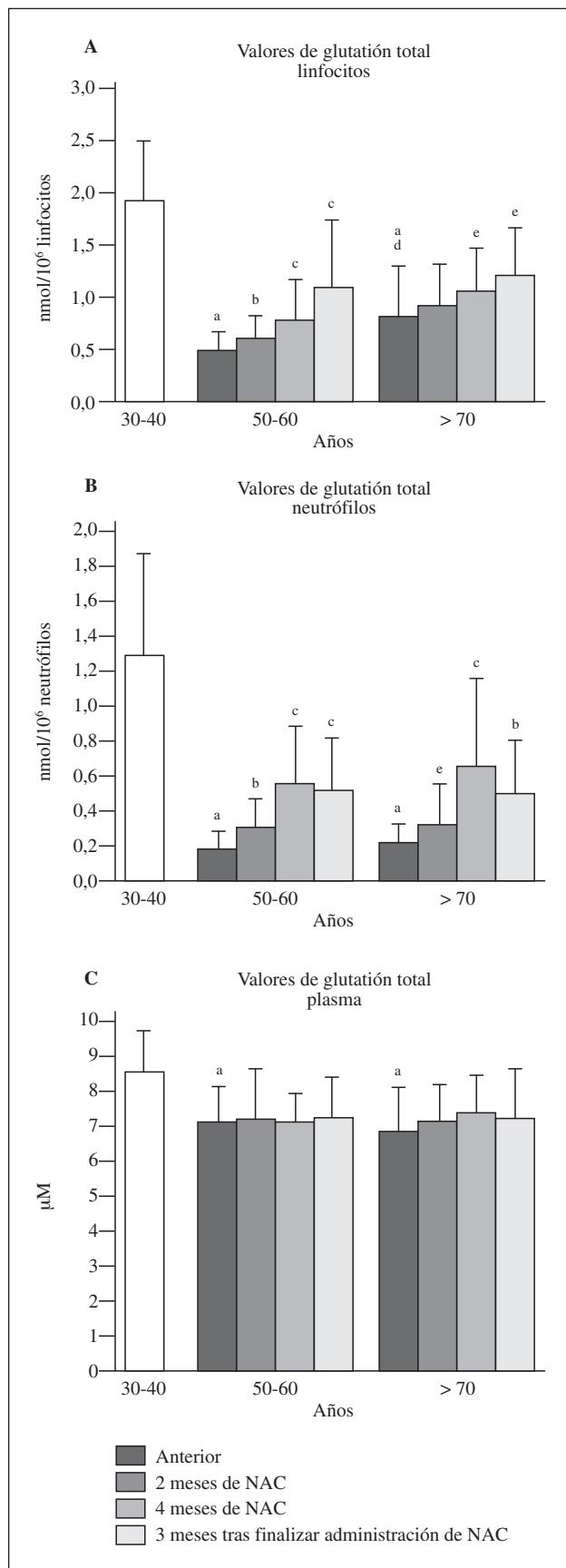
RESULTADOS

Los valores de GSH total presente en linfocitos, en neutrófilos y en el plasma (fig. 1) disminuyen significativamente ($p < 0,001$) con el envejecimiento. Esta disminución respecto a los valores obtenidos en las mujeres de 30-40 años ya se aprecia en las mujeres de 50-60 años, y se mantiene en las de más de 70. No obstante, los linfocitos de las mujeres mayores de 70 años presentan más contenido en GSH que los de las mujeres de 50-60 ($p < 0,01$; fig. 1A).

La administración de NAC produce un aumento en los valores del GSH intracelular de linfocitos y neutrófilos (fig. 1A y 1B), efecto que no se ve reflejado en el plasma (fig. 1C). El aumento del GSH en las células inmunitarias se aprecia ya a los 2 meses de tratamiento (las diferencias son estadísticamente significativas [$p < 0,01$]) en los linfocitos y en los neutrófilos de las mujeres de 50-60 años, y en los neutrófilos ($p < 0,05$) de las mayores de 70 años. Esas diferencias en el aumento de los valores de GSH se hacen más relevantes a los 4 meses del tratamiento (con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0,001$ en neutrófilos en las 2 edades estudiadas y en linfocitos de mujeres de 50-60, y de $p < 0,05$ en los linfocitos de mujeres mayores de 70 años). Trascorridos 3 meses de la finalización de la administración de NAC sigue apareciendo un aumento, estadísticamente significativo, en relación con el valor previo al inicio del tratamiento en los linfocitos y neutrófilos de mujeres de 50-60 ($p < 0,001$) y mayores de 70 años ($p < 0,05$ en linfocitos y $p < 0,01$ en neutrófilos).

DISCUSIÓN

El presente trabajo pone de manifiesto que los valores de GSH, tanto plasmáticos como los presentes en linfocitos y neutrófilos, disminuyen en mujeres mayores de 50 años en relación con los presentes en las mujeres de menor edad (30-40 años). Hay una serie de trabajos en los que se han detectado cambios en los valores de GSH con la edad. Prácticamente todos ellos se han basado en medidas en sangre total, eritrocitos, suero o plasma y, aunque se han encontrado resultados contradictorios, una mayoría detecta menores valores de GSH plasmático en los sujetos ancianos en relación con los jóvenes²⁹. En otros estudios realizados en plasma se ha observado que el declive dramático y rápido del sistema antioxidante del GSH es alrededor de la década de los 50 años³⁰. También se ha descrito una disminución con la edad en las concentraciones de GSH presentes en linfocitos; éstas se encuentran en los individuos de 60-80 años por debajo de la mitad de las detectadas en estas células de sujetos de 20-40 años³¹. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la disminución en los valores de GSH, tanto plasmático como intraleucocitario, se observa ya en las mujeres posmenopáusicas de 50 años, y se mantiene en mujeres mayores de 70 años. Estos datos re-



velan, por tanto, un declive importante de los valores de GSH coincidente con la pérdida de la actividad estrogénica, lo que parece corroborar el hecho descrito por otros autores de que la unión de los estrógenos con sus receptores da lugar al aumento en la expresión de genes asociados con una mayor esperanza de vida, entre los que se encuentran los que codifican para ciertas enzimas antioxidantes como las implicadas en la cinética del GSH³². El hecho de que los linfocitos de las mujeres que superan los 70 años muestren unos valores mayores de GSH que las de 50 podría ser resultado del tipo de colectivos utilizados en el estudio. Así, mientras el grupo de mujeres de 50-60 años fue tomado casi exclusivamente de las trabajadoras del Hospital Clínico San Carlos, que podrían tener unos niveles de estrés, horas de sueño o hábitos alimenticios diferentes de los del resto de la población general de esa edad, las mujeres de más de 70 años fueron obtenidas de las usuarias del Servicio de Geriatría del mismo hospital, concretamente del programa «Envejecer con éxito». Esta especial condición, junto con los criterios rigurosos de selección empleados, y que obligaron a rechazar a muchas de las potenciales participantes, podría haber conducido a que este grupo de mujeres ancianas probablemente sea un colectivo que goce de un estado de salud superior al de la población general de mujeres de su misma edad. Dada esta limitación de nuestro estudio, sería muy interesante llevarlo a cabo en un futuro en una población más variada de individuos. Asimismo, con el fin de obtener una muestra lo más cercana posible a la población general, se debería incluso sacrificar ciertos criterios de exclusión a la hora de obtener el colectivo a estudiar. También, esos mayores valores de GSH en los linfocitos de las mujeres que superan los 70 años, hecho que no sucede en neutrófilos, parecen estar mostrando una homeostasis más preservada en el primer tipo de células que en el segundo. Los linfocitos podrían ser capaces de producir más cantidad de GSH o conservar mejor este antioxidante ante el mayor estrés oxidativo que se sabe aparece al avanzar la edad⁵. Es un hecho, que ya ha sido comprobado en otros modelos experimentales, que los linfocitos de determinadas localizaciones aumentan sus valores de GSH reducido ante una situación de estrés

Figura 1. Valores de glutatión en linfocitos (A: nmol/10⁶ linfocitos), neutrófilos (B: nmol/10⁶ neutrófilos) y plasma (C: μM) de mujeres de 30-40 años (controles) y de mujeres posmenopáusicas de 50-60 años y de más de 70 años antes de iniciar la administración de N-acetilcisteína (NAC), a los 2 meses, transcurridos 4 meses de dicha administración y 3 meses después de su finalización. Cada columna representa la media ± desviación estándar de 18 valores correspondientes a 18 mujeres. La columna de las mujeres de más de 70 años a los 4 meses de NAC representa 17 valores correspondientes a 17 individuos; y la de estas mismas mujeres 3 meses después de finalizar la administración de NAC a 16 valores correspondientes a 16 sujetos.

^ap < 0,001 con respecto al valor de glutatión obtenido en las mujeres de 30-40 años. ^bp < 0,01, ^cp < 0,001, ^dp < 0,01 con respecto al valor de glutatión obtenido en las mujeres de 50-60 años y ^ep < 0,05 con respecto al valor de glutatión obtenido antes de iniciarse el tratamiento.

oxidativo como es una endotoxemia³³. También datos previos de nuestro laboratorio han comprobado que los linfocitos mantienen mejor los valores intracelulares de GSH que los fagocitos ante ese estrés oxidativo³⁴.

El presente estudio también demuestra que la administración de NAC tiene como resultado el aumento del GSH intracelular presente en los leucocitos circulantes sin afectarse en absoluto los valores plasmáticos. Incluso administraciones durante un período relativamente corto, como puede ser 2 meses, tienen este efecto beneficioso en el sentido de aumentar los valores de GSH leucocitario. Los linfocitos de las mujeres mayores de 70 años son una excepción, al no manifestar en ese período ningún efecto, pero hay que considerar que esas células a esa edad son las que presentaban mayores valores basales. Cuando el tiempo de administración de NAC es de 4 meses, el efecto es claramente manifiesto en los 2 tipos de leucocitos y a las 2 edades analizadas. Además, ese efecto es duradero, puesto que se sigue manteniendo 3 meses después de haberse finalizado el tratamiento. Algunos autores han afirmado que los cambios en el estado redox que se producen con la edad son reversibles³⁰. De esta forma, podrían llevarse a cabo intervenciones nutricionales o terapéuticas para intentar restaurar dicho estado redox. Dado que, como anteriormente se ha indicado, el GSH no penetra fácilmente al interior celular^{18,19}, su administración directa únicamente intervendría de forma importante en el mantenimiento del estado redox del plasma. Por tanto, deben emplearse estrategias alternativas, como la provisión de aminoácidos precursores³⁵ y/o de agentes inductores de las enzimas de su síntesis³⁶. Sin embargo, el aminoácido cisteína se oxida fácilmente, es bastante inestable y algunas de sus formas presentan dificultad de absorción y transporte al interior celular³⁷. La mayor parte de las células y los tejidos sólo presenta alta actividad de transporte para la forma reducida de la cisteína, por lo que una suplementación eficaz de ésta es a través de la administración del derivado estable NAC³⁷. La NAC no sólo es un precursor efectivo de la síntesis intracelular de GSH²¹, también puede estimular la actividad de enzimas citosólicas implicadas en el ciclo del GSH, como la GSH reductasa, que aumenta la tasa de regeneración del GSH³⁸, e incluso actuar de forma directa como antioxidante mediante la reducción de especies reactivas de oxígeno a través de su grupo tiol²⁰. De nuestros resultados se puede deducir que el efecto beneficioso de la NAC sobre la función inmunitaria^{22-25,34} se puede realizar de forma importante mediante el aumento de las reservas de GSH. Por otra parte, a pesar de que las reservas de GSH aumentan de forma muy significativa con la administración de NAC en mujeres de 50-60 años y en las de más de 70 años, no llegan al nivel de las más jóvenes, lo que puede estar mostrando una menor actividad y/o expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de GSH a partir de la NAC al envejecer. Dado que los efectos parecen acumulativos, ya que aumentan con el tiempo, sería interesante conocer el efecto de la administración de NAC a más largo plazo o con una dosis algo superior.

Se podría deducir de los resultados del presente estudio que la disminución en los valores de GSH de las células inmunitarias con la edad es una causa, posiblemente de las más relevantes, del deterioro funcional que experimentan dichas células y que conduce al individuo a presentar con mayor frecuencia infecciones graves, así como otras afecciones en las que el sistema inmunitario se encuentra implicado, como el cáncer, dando lugar a un aumento en la morbilidad y la mortalidad a medida que avanza el proceso de envejecimiento. Asimismo, la administración de NAC se muestra como una estrategia eficaz, incluso en tratamientos cortos y a edades avanzadas, para aumentar los valores de GSH en el interior de los leucocitos, hecho que se evidencia como una de las causas principales de la marcada mejora que se observa en la función inmunitaria tras esa administración. De esta forma, la NAC podría contribuir de forma importante a mejorar la salud, y por tanto, la calidad de vida de los individuos en la vejez, potenciando la función de sus defensas inmunológicas. No obstante, no es posible, por el momento, generalizar los resultados obtenidos en el presente estudio. Hay que tener en cuenta que nuestro ensayo se centró exclusivamente en mujeres, con objeto de evitar la posible variabilidad en función del sexo. Aunque varios estudios no han mostrado diferencias entre varones y mujeres con respecto a los cambios que se producen en los valores de GSH con la edad^{19,31}, se hacen necesarios futuros estudios que incidan en las posibles diferencias por sexo, tanto de las consecuencias del proceso de envejecimiento como de la respuesta a la administración de compuestos antioxidantes como el que nos ocupa. Por otra parte, dada la dificultad que se tuvo para encontrar voluntarios que quisieran participar en el estudio y que cumplieran con rigor los criterios de selección planteados, fundamentalmente en el grupo de mujeres de más de 70 años, el número final de participantes fue bastante limitado. Futuras investigaciones con un tamaño muestral mayor serán sin duda de gran interés.

Por último, es importante destacar, como conclusión que se extrae de este trabajo, el hecho de que la determinación del GSH plasmático no es un marcador adecuado para conocer el valor de este antioxidante en el organismo, puesto que puede no relacionarse con el que está presente en otras localizaciones, como son los leucocitos circulantes, sin duda una muestra con significado biológico mucho más relevante que el plasma. Dada la generalizada utilización de plasma en las analíticas que se llevan a cabo para determinar nuestro estado de salud, habría que ser más críticos con las conclusiones que se hacen, en relación con ciertos parámetros, tomando como base únicamente los resultados obtenidos en muestras plasmáticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Harman D. Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11:298-300.

2. Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol.* 1998;33:113-26.
3. 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.
4. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, et al. T-cells and aging. *Front Biosci.* 2002;7:d1056-d183.
5. De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo C. The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antiox Redox Signal.* 2005;7: 1356-66.
6. Izgut-Uysal VN, Tan R, Bülbül M, Derin N. Effect of stress-induced lipid peroxidation on functions of rat peritoneal macrophages. *Cell Biol Int.* 2004; 28:517-21.
7. Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis.* 2000;31:578-85.
8. 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; 114:80-8.
9. Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today.* 1995; 16:12-6.
10. Puerto M, Guayerbas N, Álvarez P, De la Fuente M. Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol.* 2005;165:33-40.
11. Knight JA. Review: free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annu Clin Lab Sci.* 2000;30:145-57.
12. Dröge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol.* 2002;37:1333-45.
13. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:916-21.
14. Ginn-Pease ME, Whisler RL. Redox signals and NF- κ B activation in T cells. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:346-61.
15. Cotgreave IA, Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-preprotein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;242:1-9.
16. 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.
17. 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.
18. Puri RN, Meister A. Transport of glutathione, as glutamylcysteinylglycyl ester, into liver and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80:5228-60.
19. Lenton KJ, Therriault H, Cantin AM, Fülöp T, Payette H, Wagner JR. Direct correlation of glutathione and ascorbate and their dependence on age and season in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1194-200.
20. Gressier B, Cabanis A, Lebegue S, Brunet C, Dine T, Luyckx M, et al. 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.* 1994;16:9-13.
21. 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.
22. Puerto M, Guayerbas N, Víctor VM, De la Fuente M. Effects of the N-Acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature aging. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;73:797-804.
23. Guayerbas N, Puerto M, Alvarado C, De la Fuente M. Effect of diet supplementation with N-acetylcysteine on leucocyte functions in prematurely aging mice. *J Appl Biomed.* 2005;3:199-205.
24. Arranz L, Rodríguez A, Fernández C, Ribera JM, De la Fuente M. Un tratamiento de 2 meses con N-acetilcisteína mejora la función leucocitaria en mujeres mayores de 50 años. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2005;40:9-62.
25. Arranz L, Fernández C, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M. Efecto de un tratamiento de 2 meses con N-acetilcisteína sobre la función de neutrófilos en mujeres mayores de 50 años. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2005; 40:63-118.
26. De la Fuente M, Víctor VM. Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol.* 2000;78:49-54.
27. Tietze F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem.* 1969;27:502-22.
28. 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.
29. Yang CS, Chou ST, Liu L, Tsai PJ, Kuo JS. Effect of ageing on human plasma glutathione concentrations as determined by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1995;674:23-30.
30. Jones DP, Mody VCJr, Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg PJr. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1290-300.
31. Van Lieshout EMM, Peters WHM. Age and gender dependent levels of glutathione and glutathione S-transferases in human lymphocytes. *Carcinogenesis.* 1998;19:1873-5.
32. Viña J, Borrás C, Gambini J, Satre J, Pallardó FV. Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones. *FEBS Lett.* 2005; 23:2541-5.
33. Víctor VM, Guayerbas N, De la Fuente M. Changes in the antioxidant content of mononuclear leukocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Mol Cell Biochem.* 2002;229:107-111.
34. Víctor VM, Rocha M, De la Fuente M. N-Acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. *Free Radic Biol Med.* 2003;37:919-29.
35. Anderson ME, Luo JL. Glutathione therapy: from prodrugs to genes. *Semin Liver Dis.* 1998;18:415-24.
36. Dhakshinamoorthy S, Long DJ 2nd, Jaiswal AK. Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr Top Cell Regul.* 2000;36:201-16.
37. Dröge W. Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome? *Phil Trans R Soc B.* 2005;360:2355-72.
38. Banaclocha MM. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Med Hypotheses.* 2001; 56:472-7.