

Marcadores inmunológicos de envejecimiento

Patricia Alonso-Fernández^a y Mónica de la Fuente^b

^aServicio de Geriátrica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

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

El envejecimiento es un proceso de modificaciones morfológicas y fisiológicas, que aparecen progresivamente por la acción del tiempo y llevan a la muerte. Debido a la heterogeneidad del proceso entre distintos individuos, e incluso entre diferentes tejidos, órganos y sistemas del mismo individuo, se ha desarrollado el concepto de «edad biológica». La búsqueda de parámetros capaces de valorar la edad biológica del individuo y, consecuentemente, su longevidad, así como analizar la eficacia de estrategias de actuación que permitan hacer más lento el proceso de envejecimiento, son objetivos de la gerontología. Una de las teorías de envejecimiento de mayor impacto actualmente es la «oxidativa-inflamatoria». Dado que la funcionalidad de las células inmunológicas es un excelente marcador de la salud, se revisarán los conceptos que están permitiendo establecer diferentes parámetros funcionales y de estrés oxidativo en las células inmunológicas como marcadores de edad biológica y longevidad. Ninguno de estos parámetros está universalmente aceptado como biomarcador de envejecimiento, aunque cada vez están cobrando mayor relevancia.

Palabras clave

Envejecimiento. Marcadores de edad biológica. Función inmunitaria. Estrés oxidativo. Longevidad.

Immunological markers of ageing

Ageing is a process involving morphological and physiological modifications that gradually appear with time and lead to death. Given the heterogeneous nature of the process among individuals and among the different organs, tissues, and systems in the same individual, the concept of «biological age» has been developed. The search for parameters that enable us to evaluate bio-

logical age—and therefore longevity—and the analysis of the efficacy of strategies to retard the ageing process are the objectives of gerontology. At present, one of the most important theories of ageing is the «oxidative-inflammatory» theory. Given that immune cell function is an excellent marker of health, we review the concepts that enable different functional and oxidative stress parameters in immune cells to be identified as markers of biological age and longevity. None of these parameters is universally accepted as a biomarker of ageing, although they are becoming increasingly important.

Key words

Ageing. Biomarkers. Immune function. Oxidative stress. Longevity.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento se ha definido como un proceso universal, progresivo, intrínseco y deletéreo que supone modificaciones morfológicas y fisiológicas, que aparecen como consecuencia de la acción del tiempo en los seres vivos. Este proceso se acompaña de una disminución de la capacidad para mantener la homeostasis con una pérdida progresiva de rendimiento de cada uno de los órganos, aparatos y sistemas, provocando una mayor vulnerabilidad, que conlleva finalmente al fallecimiento del organismo¹⁻³.

En el intento de explicar el proceso de envejecimiento⁴ se han emitido numerosas teorías, algunos dicen, con cierto cinismo, que casi tantas como biogerontólogos. Una de éstas fue la teoría inmunológica del envejecimiento, basada en la relevancia del sistema defensivo para la supervivencia de los individuos y por ser el sistema inmunológico uno de los que sufren un mayor deterioro en su función con el envejecimiento^{5,6}. Esta teoría, como muchas otras, tal cual fue emitida, no cumple el principio de universalidad que Strehler y Mildvan⁷ indicaron que debe gobernar en el proceso de envejecimiento, ya que no todos los seres vivos que se encuentran sometidos a éste tienen un sistema inmunológico como el que se conoce en mamíferos. No obstante, este sistema fisiológico parece tener un papel relevante en la determinación de la velocidad a la que se desarrollará el envejecimiento⁸. De las más de trescientas

Los trabajos realizados por nuestro grupo han sido financiados por diversos proyectos (BFU2005-06777; RETICEF (RD06/0013/0003)).

Correspondencia: Dra. P. Alonso-Fernández.
Servicio de Geriátrica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón.
Francisco Silvela, 40. 28028 Madrid. España.
Correo electrónico: patriciaafdez@yahoo.es

Recibido el 6-11-2007; aceptado el 5-2-2008.

teorías emitidas, la que ha resultado de mayor validez para entender cómo se produce el proceso de envejecimiento es la de la oxidación^{9,10}. Esta teoría fue perfilada con la teoría mitocondrial, en la que se indicaba dónde se inicia ese proceso³. Es posiblemente la teoría integradora emitida por Miquel⁹, en la que se aúnan conceptos contenidos en antiguas y modernas teorías, y en la que se incluyen aquellas que explican por qué tiene lugar el envejecimiento, la que más parece aproximarse a un entendimiento completo de este proceso.

La «teoría oxidativa-inflamatoria» del envejecimiento, propuesta en 2005 por De la Fuente et al⁸, afirma que el sistema inmunitario no sólo contribuirá a la producción de radicales libres (como consecuencia de sus diferentes funciones), sino que además, por acción de los radicales libres, se provocará un efecto deletéreo sobre la funcionalidad del sistema inmunitario que podrá facilitar el desequilibrio redox, induciendo así una espiral oxidativa sobre la que se asienta el envejecimiento.

El proceso de envejecimiento, en cuanto a la velocidad con que se desarrolla, ocurre de forma muy heterogénea en cada uno de los diferentes tejidos, órganos y sistemas de un mismo individuo, así como entre los distintos individuos de la misma especie o grupo con igual edad cronológica. Estas diferencias interindividuales en el ritmo de envejecimiento en sujetos con igual edad cronológica han conducido al concepto de «edad biológica»¹¹. En 1953, McFarland¹² estableció el término «edad funcional», concepto utilizado para los pilotos de las líneas aéreas para decidir su edad de jubilación y que, en 1963, fue aceptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) porque lo encontró más equitativo que la edad cronológica. El concepto de «edad biológica» fue desarrollado por Confort en 1969¹³, e incluía no sólo parámetros funcionales, sino también no funcionales. Con posterioridad se desarrollaron estudios que acreditaron el valor que tiene la «edad biológica» para predecir la longevidad¹¹.

La «edad biológica» depende de un amplio número de variables fisiológicas, bioquímicas y psicológicas condicionadas por la herencia y el medio ambiente, y permite predecir, mejor que la edad cronológica, no sólo el rendimiento físico y mental, también la duración de la vida de un individuo¹⁴⁻¹⁶. Dado que hay múltiples factores de estilo de vida, como la nutrición, la actividad física o el perfil de personalidad, entre otros, así como el propio fondo genético, que afectan a la velocidad a la que cada individuo experimenta el proceso de envejecimiento y, consecuentemente, su edad biológica, desde hace varias décadas se intentan validar marcadores biológicos que permitan conocer tanto la edad biológica como el efecto de esos factores en ésta. Un proceso más lento de envejecimiento puede seguirse de una mayor longevidad media al evitarse o retrasarse toda una serie de afecciones asociadas al deterioro propio de ese proceso.

Se han propuesto diferentes marcadores biológicos o biomarcadores de edad biológica, si bien ninguno de éstos

se ha aceptado de manera universal. En realidad, cualquier parámetro biológico que se correlacione con el envejecimiento de un organismo podría considerarse un biomarcador de envejecimiento; sin embargo, su aplicación resultaría meramente descriptiva. Tratando de buscar una aplicación más completa de ese concepto, que permita no sólo estimar la edad biológica, sino que se relacione también con la longevidad de cada individuo y permita analizar la eficacia de diferentes estrategias y tratamientos sobre el envejecimiento, en 1988, Barker y Sprott¹⁷ realizaron una definición formal de biomarcador de envejecimiento: «parámetro biológico de un organismo que en un análisis individual o bien en combinación con otros parámetros permite, en ausencia de enfermedad, estimar la capacidad funcional de un organismo a más largo plazo que su edad cronológica».

Dado que el sistema inmunológico se ha considerado marcador de salud y longevidad^{18,19}, y que en los estudios de marcadores de edad biológica clásicos no se incluyó ningún estudio sobre parámetros de este sistema, en el presente artículo se revisarán los marcadores de tipo inmunológico que se han identificado en los últimos años como indicadores de la velocidad de envejecimiento y, consecuentemente, de edad biológica y longevidad.

Antes de indicar los parámetros inmunológicos de edad biológica, parece conveniente hacer un breve recordatorio del funcionamiento de las células inmunológicas y de los cambios que éstas experimentan con el envejecimiento.

INMUNIDAD INNATA: FAGOCITOS Y ACTIVIDAD NK

La inmunidad innata la realizan en las células los fagocitos y las células *natural killer* (NK). Las principales células fagocíticas son los macrófagos tisulares y los monocitos y neutrófilos polimorfonucleares circulantes en la sangre. Estas células desempeñan un importante papel, tanto en la iniciación como en la fase efectora de la respuesta inmunitaria. Las células fagocíticas participan en las primeras fases de defensa contra las infecciones a través de una serie de etapas funcionales que constituyen el denominado «proceso fagocítico». En primer lugar, estas células se adhieren a los endotelios vasculares²⁰, o a otros tejidos; estando esta adherencia mediada por moléculas de adhesión²¹. Tras esa fase se produce la extravasación y migración hacia el foco de infección, a través de un gradiente quimiotáctico compuesto de moléculas tales como productos bacterianos, citocinas y complemento²². Una vez en el foco infeccioso, en el caso de los neutrófilos, que son células con una vida media muy corta, de unas 8-12 h en la sangre periférica, su muerte por apoptosis es retrasada, hasta alcanzar la siguiente fase, mediante estímulos bacterianos, componentes del complemento y citocinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)²³. Tras llegar al foco infeccioso, se lleva a cabo la ingestión o fagocitosis del material extraño, paso previo a

su digestión y destrucción. Esta destrucción involucra toda una serie de mecanismos; los más relevantes son los que implican la producción de radicales libres de oxígeno, el primero de los cuales es el anión superóxido, precursor de diferentes oxidantes con acción microbicida²⁴.

El envejecimiento se acompaña de un aumento en la adherencia de los fagocitos y de los neutrófilos al endotelio²⁵, y de los macrófagos a diversos sustratos²⁶. Este aumento de adherencia se acompaña de una disminución en la siguiente etapa del proceso fagocítico, la capacidad de quimiotaxis, hecho que se ha observado tanto en los neutrófilos humanos como en los macrófagos murinos²⁷⁻³⁰ y que parece contribuir al aumento del riesgo de infecciones en los individuos ancianos³¹. El aumento de la adherencia al endotelio y la disminución de la quimiotaxis son consecuencia de un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión, tales como cVCAM-1 y cICAM-1, asociado a la edad³² y alteraciones en la fluidez de las membranas celulares³³, que se han relacionado con un aumento en los niveles de estrés oxidativo^{34,35}. Estudios de nuestro grupo de investigación han demostrado una clara asociación entre estos parámetros y el envejecimiento^{8,30}. Asimismo, aquellos animales que mantienen estables esos parámetros presentan una mayor supervivencia³⁶ y en centenarios sanos ambos parámetros se mantienen en valores similares a los de los adultos sanos³⁷. Por todo ello, su utilidad como biomarcadores de envejecimiento y longevidad parece importante.

Con el envejecimiento se produce también un deterioro de la capacidad fagocítica^{28,38,39} y la capacidad microbicida^{40,41} de los neutrófilos, que puede contribuir al desarrollo de procesos infecciosos⁴². Estudios previos de nuestro grupo han mostrado que no sólo se produce un deterioro en esta función con la edad cronológica. Además, en un modelo de envejecimiento prematuro en ratones, hemos demostrado que el deterioro en la fagocitosis de macrófagos peritoneales se acompaña de un descenso en la esperanza de vida de estos animales^{30,36,43}. De igual modo, encontramos en los estudios realizados en centenarios sanos³⁷ que el deterioro que se produce con la edad no está presente en estos individuos y, por tanto, también se puede considerar la capacidad fagocítica como un buen marcador de envejecimiento y probablemente predictor de longevidad.

Las células responsables de la actividad NK son células linfoides que reconocen y destruyen células infectadas por virus y células tumorales sin necesidad, al contrario que los linfocitos T, de inmunización o activación previas⁴⁴. Además de su capacidad citotóxica, son responsables de la producción de citocinas y quimiocinas que directamente participan en la eliminación de patógenos o en la activación de otros componentes celulares del sistema inmunológico⁴⁵.

Aunque el número de células con actividad NK parece aumentar claramente al envejecer⁴⁶, hay algunos trabajos en los que no se aprecia una importante alteración de la

actividad citotóxica en individuos ancianos sanos; sin embargo, estudios que no emplean criterios de salud estrictos demuestran la existencia de una actividad citotóxica disminuida con la edad^{27,46-48}. De hecho, hay investigaciones que ponen de manifiesto una clara asociación entre un descenso en esta función en ancianos y el aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas tanto en humanos⁴⁹ como en ratones⁵⁰. De este modo, una actividad NK baja se asocia al desarrollo de infecciones y muerte por este motivo^{49,51}. Individuos ancianos (con edades superiores a los 85 años) con valores de células NK bajos presentan un riesgo tres veces superior de muerte en los siguientes 2 años de seguimiento que aquellos con valores altos⁵² y un mayor riesgo de presentar arteriosclerosis⁵³. En el mismo sentido se ha descrito que una actividad NK elevada se asocia a un mejor estado de salud y a una baja incidencia de infecciones respiratorias, así como a unos títulos superiores de anticuerpos en respuesta a la vacuna de la gripe⁵⁴. Cuando se estudia la actividad NK en individuos ancianos de edades superiores a los 85 años, se ha comprobado que existe una correlación positiva entre los valores de vitamina D, la situación metabólica y nutricional del individuo y la actividad NK⁵⁵, evidenciándose un impacto de las variables hormonales⁵⁶ y nutricionales^{55,57} en la función de las células NK en los ancianos. Nuestro grupo, al igual que otros autores, ha comprobado que los centenarios sanos, el mejor modelo de envejecimiento satisfactorio, mantienen una actividad citotóxica NK bien preservada^{58,59}. Por todo ello se puede considerar que una buena actividad NK puede ser un biomarcador de envejecimiento saludable y longevidad, mientras que el deterioro en esta función podría predecir una morbilidad y mortalidad asociadas a infecciones^{49,51}.

INMUNIDAD ADQUIRIDA: LINFOCITOS

Dado el relevante papel de los linfocitos en la respuesta inmunológica, la mayor parte de los estudios sobre la inmunosenescencia, tanto en humanos como en animales de experimentación, se ha centrado en el análisis del importante deterioro que con la edad se produce en la inmunidad adaptativa llevada a cabo por estas células.

Está claramente establecido que con la edad se produce un descenso en el porcentaje y el número de células T vírgenes y un aumento recíproco de las células T maduras⁶⁰, probablemente como consecuencia del descenso en la salida de linfocitos T del timo por la involución tímica asociada a la edad^{61,62}. Recíprocamente, se produce un aumento en el porcentaje y el número de linfocitos memoria (linfocitos T CD8⁺)⁶³, lo que parece ser consecuencia de la exposición a variados patógenos a lo largo de la vida. Además de los cambios en las diferentes subpoblaciones, se han apreciado importantes variaciones en su capacidad de proliferar en respuesta a un antígeno, hecho que suele analizarse mediante la capacidad proliferativa a diversos

mitógenos. En este sentido, hay clara unanimidad en admitir la menor respuesta linfoproliferativa con el envejecimiento⁶⁴⁻⁶⁶.

En cuanto a los linfocitos B, los cambios que se producen con la edad son menores que los que se observan en la célula T y en parte se deben a una deficiente cooperación por parte de los linfocitos T⁶⁷. Se observa, al igual que en los linfocitos T, un descenso en su capacidad proliferativa⁶⁸, una modificación en la producción de anticuerpos (disminuyendo los neoanticuerpos y aumentando la producción de autoanticuerpos)⁶⁹ y el descenso de algunas poblaciones celulares, como las células dendríticas plasmacitoides con la consecuente reducción en la producción de interferón alfa (IFN- α)⁷⁰.

Mediante el análisis de las células T en estudios en octogenarios y nonagenarios, se ha definido un «fenotipo de riesgo inmunológico» (IRP, *immune risk phenotype*), que originariamente estaba caracterizado por una *ratio* CD4/CD8 invertida y una baja respuesta linfoproliferativa a concanavalina A como predictor de mortalidad⁷¹ y, por tanto, como posible biomarcador de envejecimiento. Estudios posteriores han indicado que el IRP se asocia además a otros parámetros inmunológicos tales como la presencia de un aumento en la proporción de células altamente diferenciadas CD8⁺ CD28⁻, un repertorio de células T restringido, elevados valores de citocinas proinflamatorias y seropositividad para citomegalovirus (CMV)^{72,73}. Este virus parece estar relacionado, al menos parte, con los cambios que se producen en el fenotipo de las células T memoria CD8⁺, que se caracterizan por una baja expresión del CD28 y un aumento en la expresión de los receptores NK-asociados⁷⁴. En relación con la capacidad de predicción de mortalidad y, por tanto, con la utilidad como posible biomarcador de envejecimiento del IRP, resulta de especial interés un estudio reciente del grupo de Wikby⁷⁵. Estos autores han publicado un estudio longitudinal de 2 años, con pacientes octogenario y nonagenarios, en el que 2 individuos cambiaron de categoría de IRP (reduciendo su número de células CD8) y mejoraron su supervivencia con respecto a individuos que presentaban el mismo IRP; este cambio de IRP parece asociarse con unos valores elevados de interleucina (IL)-6 e IL-10. Conocer los mecanismos por los cuales estos 2 individuos han cambiado de categoría de IRP resulta de especial interés, dada la mayor supervivencia de éstos respecto al resto de individuos contemporáneos que estaban en su mismo grupo IRP. Asimismo, resulta interesante el hecho de que el IRP no parece estar influido por la comorbilidad que presenta el individuo; en ese sentido no existen factores de confusión⁷⁶ y, por tanto, se puede considerar el IRP como un buen biomarcador de envejecimiento y predictor de mortalidad.

Otros aspectos no menos importantes, aunque sí menos estudiados de la función linfocitaria, que también muestran un deterioro con la edad, son funciones inespecíficas y, por tanto, más antiguas desde el punto de vista evoluti-

vo, como la de adherencia al endotelio y otros tejidos, así como la migración, especialmente la dirigida al foco de reconocimiento antigénico o quimiotaxis.

Aunque los datos relativos a la función de adherencia en linfocitos son escasos, nuestro grupo ha detectado un aumento de ésta con el envejecimiento, tanto en linfocitos de sangre periférica en humanos⁷⁷ como en linfocitos de órganos inmunocompetentes de ratón⁷⁸. El aumento de la adherencia de los linfocitos, como ocurría en los neutrófilos, lejos de ser una ventaja funcional, manifiesta una limitación a la movilidad leucocitaria, secundaria a un aumento de la expresión de moléculas de adhesión asociada a la edad^{32,79}.

En relación con la capacidad de quimiotaxis de los linfocitos, parece producirse un deterioro de ésta con la edad⁸⁰. Se ha detectado que las alteraciones en la capacidad de migración se relacionan con las que experimenta la expresión de los receptores quimiotácticos con el envejecimiento⁸¹, que a su vez se correlacionan con un aumento en los valores de estrés oxidativo³⁴ y, por ello, con la inflamación y el envejecimiento vascular y las enfermedades vasculares⁸². El hecho de que en nuestro grupo hayamos podido comprobar que, tanto en individuos centenarios sanos³⁷ como en ratones longevos⁸³, esta función se mantiene en valores similares a la de los adultos jóvenes, marcaría su utilidad como biomarcador de envejecimiento.

CITOCINAS

Dado el papel crítico que las citocinas desempeñan en la regulación de la comunicación entre las células y el efecto en la actividad durante la propia respuesta inmunitaria, las alteraciones asociadas a la edad en la función de los linfocitos podrían justificarse, al menos en parte, por las modificaciones acontecidas en la producción de citocinas^{84,85}.

La IL-2, que forma parte de los valores medidos en el IRP, experimenta un claro descenso en su producción y liberación con el envejecimiento, paralelo a la disminución de la linfoproliferación en respuesta a diferentes mitógenos (PHA y Con-A) o diversos antígenos^{36,86,87}. Hay autores que relacionan la disminución de su síntesis, liberación y expresión de su receptor con la pérdida de capacidad de activación y entrada en el ciclo celular que experimentan las células T con la edad^{88,89}. No obstante, trabajos realizados tanto en humanos como en animales de experimentación acreditan que los bajos valores de IL-2 producidos por los linfocitos T de individuos viejos son los que limitan la proliferación de estas células⁹⁰. De hecho, la administración exógena de esta citocina en cultivos de células T de individuos viejos restaura su respuesta proliferativa a ciertos mitógenos⁹¹. Por todo ello, la reducción en los valores de esta citocina podría considerarse, dada su implicación en la linfoproliferación y la maduración linfocitaria, un adecuado biomarcador inmunológico de envejecimiento.

Además de la IL-2, resulta de especial interés la valoración de la IL-6 como posible biomarcador de envejecimiento. La IL-6 es una glucoproteína que en situaciones fisiológicas se produce fundamentalmente por las células del sistema inmunológico, las células del endotelio vascular y los adipocitos. Su concentración plasmática sigue un ritmo circadiano y su expresión está modulada fundamentalmente por el factor nuclear kappa B (NF- κ B). La IL-6 en las situaciones de inflamación aguda promueve la expansión y activación de las células T y la activación de las células B, así como la síntesis de reactantes de fase aguda, como la proteína C reactiva y el fibrinógeno. Manifestaciones clínicas del proceso inflamatorio agudo, como la fiebre, las alteraciones en el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, la anorexia y la letargia, también están inducidas por la acción de la IL-6. Es la citocina más estudiada en los ancianos y ha llegado a denominarse «la citocina de los gerontólogos»⁹². Se ha descrito su aumento con la edad, principalmente a partir de los 75 años⁹³, una estrecha relación entre la dieta y el ejercicio y sus valores⁹⁴, la presencia de osteoporosis⁹⁵, la menopausia⁹⁶ y la andropausia⁹⁷, así como la fragilidad, la sarcopenia, el deterioro funcional (velocidad de la marcha, fuerza física)^{98,99} y la anemia¹⁰⁰, incluso tras eliminar los factores de confusión. Es decir, el aumento de los valores de IL-6 puede contribuir, junto con otros factores proinflamatorios y de estrés oxidativo, al desarrollo de muchas de las enfermedades crónicas asociadas al envejecimiento¹⁰¹ y, por tanto, estar relacionado con una mayor mortalidad¹⁰². Por todo ello, se ha sugerido que la elevación de la IL-6 en ancianos, que bien pudiese ser la responsable del proceso de deterioro en estos individuos o bien un mero espectador que reflejase la alteración de diversos mecanismos, podría ser un buen biomarcador de fragilidad en los individuos ancianos.

Otra citocina importante es el TNF- α , citocina proinflamatoria que se produce en una gran variedad de tipos celulares, incluidos macrófagos y linfocitos activados¹⁰³. Mediante estímulos de supervivencia y apoptosis estimula la proliferación de células normales, tiene una actividad reguladora contra las células tumorales y la capacidad de inducir procesos inflamatorios, antivirales e inmunorreguladores, entre otros¹⁰⁴. Los efectos biológicos del TNF- α se encuentran mediados por dos tipos de receptores de membrana: TNFR-I y TNFR-II¹⁰⁵. Mediante el TNFR-I es capaz de inducir el factor de transcripción NF- κ B, que regula la expresión de un gran número de genes implicados en la respuesta inmunitaria, como aquellos que codifican citocinas, quimiocinas, receptores de la superficie celular y moléculas de adhesión¹⁰⁶. Aunque algunos autores han indicado que los valores de esta citocina disminuyen o no se modifican al envejecer^{107,108}. La mayor parte de los trabajos presentes en la literatura científica señalan que los niveles de TNF- α aumentan durante el envejecimiento^{109,110}, hecho que también hemos observado en estudios llevados a cabo por nuestro grupo^{36,39,111,112}. Dadas las características proinflamatorias de esta citocina, parece ra-

zonable que se libere en mayores cantidades por células de individuos viejos, lo cual puede contribuir a establecer el estado inflamatorio característico del envejecimiento. Otros investigadores han demostrado que valores plasmáticos elevados de TNF- α se encuentran asociados con enfermedades como el Alzheimer y la aterosclerosis en individuos viejos^{113,114}. Además, este grupo ha observado recientemente que los valores elevados en plasma de TNF- α en personas centenarias implican una mayor mortalidad asociada a procesos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares o demencia, entre otras¹¹⁵. Por todo ello, parece que el aumento de esta citocina podría considerarse un adecuado marcador inmunológico de envejecimiento.

MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS CÉLULAS INMUNOLÓGICAS

El desequilibrio entre la formación de oxidantes y las defensas antioxidantes, a favor de los primeros, se ha definido como estrés oxidativo¹¹⁶; es un proceso que tiene lugar en el envejecimiento^{8,117-119}. Es el aumento de oxidantes que tiene lugar al envejecer, lo que parece favorecer el aumento del daño oxidativo que se produce en todas las biomoléculas del organismo (ADN, lípidos, proteínas y glúcidos) con la edad¹²⁰. Este daño progresivo, que altera la funcionalidad de las células, provoca finalmente su muerte y con ello la del individuo. De hecho, es la oxidación, especialmente la que se produce en el ADN mitocondrial, el parámetro que se ha podido correlacionar de forma negativa con la longevidad máxima que adquieren las especies animales¹²¹. Sobre esta base, han sido muchos los intentos para relacionar diferentes marcadores de estrés oxidativo con la velocidad a la que se lleva a cabo este proceso en los individuos, esto es, con la edad biológica y, consecuentemente, con la longevidad media que se pueda alcanzar.

En la bibliografía científica se han propuesto numerosos potenciales biomarcadores, incluidos los productos de peroxidación lipídica (LPO), productos de oxidación proteica, actividad de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRd), así como los valores de ciertos minerales (Se, Mg, Cu y el Zn) y vitaminas (A, C y E), los de glutatión, flavonoides, bilirrubina y los de ácido úrico¹²². Ha habido y hay reticencias para aceptar, por parte de la comunidad científica, cualquiera de estos parámetros como determinante de la esperanza de vida, la edad biológica o la situación de salud del individuo, por el hecho de estar influidos por la carga genética y por factores del estilo de vida, como la nutrición, el tabaquismo, la actividad física y la presencia de enfermedades y de medicación. Para definir tales parámetros como biomarcador, éstos deben reflejar el impacto del estrés oxidativo en el proceso de envejecimiento sin estar influidos por otros factores. Sin embar-

go, es evidente que esto no es posible pues todo lo mencionado anteriormente condiciona el estado de oxidación del individuo. De hecho, existe una marcada influencia de la nutrición sobre los valores de flavonoides y polifenoles, que se sabe reducen el estrés oxidativo en el proceso de envejecimiento y de diversas enfermedades asociados a éste^{123,124}. Parece lógico que se asegure que tales parámetros no pueden usarse como biomarcadores, dado que su concentración en los tejidos humanos depende principalmente de la nutrición del propio individuo y, por ello, los cambios que se produzcan asociados al envejecimiento no pueden diferenciarse claramente. No obstante, sí puede obviarse este inconveniente utilizando animales de experimentación en los que las condiciones de vida pueden ser más homogéneas que en el ser humano. Por este motivo, si se encuentra un parámetro de estrés oxidativo (tanto los considerados oxidantes como los que sean antioxidantes o parámetros de daño por oxidación en biomoléculas) que varíe con la edad y que se relacione con la longevidad que alcancen esos animales, sí puede vislumbrarse como posible biomarcador de envejecimiento en el ser humano máxime si, analizado en una población relativamente homogénea, se encuentran variaciones similares con la edad. En este sentido, nos centraremos en aquellos parámetros que se han estudiado con esa perspectiva en las células del sistema inmunológico.

Peroxidación lipídica

Debido a que los lípidos son constituyentes fundamentales de las membranas celulares, y que compuestos tan importantes como hormonas esteroideas, vitaminas y prostaglandinas pertenecen a este grupo de moléculas y dada su extrema sensibilidad a la oxidación, los productos de peroxidación lipídica pueden ser indicadores importantes de alteraciones en la estructura celular y el metabolismo. Los primeros productos de la oxidación lipídica tienen una utilidad limitada como biomarcadores en la clínica debido a que son altamente reactivos o volátiles; sin embargo, algunos de ellos reaccionan rápidamente convirtiéndose en productos de oxidación secundaria como el malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal (HNE), isoprostanos o los oxisteroles. Estos productos de oxidación secundaria tienen influencia sobre la expresión génica y la síntesis proteica, por lo que pueden considerarse a su vez agentes oxidantes per se.

Los F2-isoprostanos son el resultado de la peroxidación del ácido araquidónico y pueden medirse en la excreción urinaria, si bien existen varios isómeros que necesitan separarse y se precisa una metodología compleja para la cuantificación de éstos. Con el envejecimiento se produce un aumento en la excreción urinaria de los F2-isoprostanos^{125,126}; éstos se han relacionado con el aumento en la adherencia de los neutrófilos al endotelio vascular duran-

te la patogénesis de la cardiopatía isquémica¹²⁷. Existen situaciones patológicas, tales como la mencionada cardiopatía isquémica pero también la diabetes, la cirrosis hepática y la insuficiencia cardíaca, en las que se ha comprobado que los valores de estos compuestos también aumentan¹²⁸, lo que podría generar factores de confusión en la valoración de este biomarcador.

El MDA, medido a través del método del ácido tiobarbitúrico (TBA), es uno de los biomarcadores más comúnmente utilizados debido a que su valoración es sencilla, rápida y barata. En la peroxidación lipídica, uno de los productos finales es el MDA, que reacciona con el TBA dando lugar a la formación de un compuesto coloreado que tiene un máximo de absorción a 532 nm. Numerosos estudios revelan un incremento en la concentración plasmática de MDA con el envejecimiento¹²⁹⁻¹³¹. Estudios de nuestro grupo que analizan el MDA mediante HPLC (*high performance liquid chromatography*) comprueban la existencia de valores mayores de este oxidante en leucocitos peritoneales de ratones prematuramente envejecidos en relación con los de animales de la misma edad que no lo están^{132,133} y debemos tener presente que esos ratones prematuramente envejecidos tienen menor longevidad^{30,36,43}. También hemos comprobado que los valores de MDA en los leucocitos de ratones aumentan al avanzar su edad cronológica y que pueden disminuirse con dietas enriquecidas con antioxidantes; esto se correlaciona con un aumento de la longevidad¹³⁴. En el caso de los humanos, nuestro grupo ha comprobado que tanto en neutrófilos como en linfocitos de sangre periférica el MDA aumenta con la edad³⁷. Todo lo indicado parece apuntar al MDA como un posible marcador de edad biológica y longevidad.

El HNE, con valores muy bajos en el organismo, necesita métodos muy sensibles y complejos para poder determinarse, que han mostrado ser poco reproducibles. Recientemente se ha publicado un estudio en el que se correlacionan las concentraciones de HNE en el plasma y la edad del individuo, encontrando asimismo correlación positiva con los valores de MDA y negativa con los valores antioxidantes del sistema del glutatión en un individuo determinado a nivel individual¹³⁰. Sus valores en relación con la funcionalidad del sistema inmunológico han sido también estudiados, y han evidenciado que el HNE es capaz de estimular la quimiotaxis de los neutrófilos¹³⁵, modular la respuesta de éstos al estrés oxidativo (mediante la regulación de la homeostasis del calcio)¹³⁶ e inhibir la síntesis de anión superóxido en estas células¹³⁷. Así, se ha comprobado que concentraciones bajas del HNE contribuyen de forma positiva en el proceso inflamatorio, mientras que concentraciones altas modularían el alcance de la propia respuesta inmunitaria¹³⁸. En relación con los efectos sobre la inmunidad específica, se ha descrito una inhibición reversible de la capacidad de proliferación de los linfocitos¹³⁹. Por todo lo indicado, y pese a las dificultades técnicas en su valoración, parece que el HNE podría ser

un buen candidato como biomarcador de envejecimiento, aunque todavía quedan muchos estudios por hacer para poder asegurarlo.

La lipofuscina o pigmento del envejecimiento procede de la oxidación lipídica; dado que presenta propiedades de tinción específicas, su cuantificación puede realizarse con facilidad¹⁴⁰. Se ha observado la acumulación de este pigmento en las células posmitóticas al avanzar la edad y también en las células inmunológicas¹⁴¹. Concretamente, nuestro grupo ha observado un aumento de depósitos de lipofuscina en linfocitos de ratones viejos (datos en vías de publicación).

Productos de la oxidación proteica

Se calcula que casi un tercio de las proteínas celulares, tanto enzimas como proteínas estructurales, de los animales viejos son disfuncionales como consecuencia del daño oxidativo¹⁴². Por ello, la estimación de la oxidación proteica, ligada a una variedad de modificaciones en los aminoácidos, podría ser un factor importante a la hora de predecir el proceso de envejecimiento y las enfermedades asociadas a éste. Una revisión detallada de las modificaciones de los distintos aminoácidos alterados, los métodos específicos para determinarlos y el impacto que provocan en el metabolismo celular pueden leerse en Requena et al¹⁴³ y en Stadtman y Levine¹⁴⁴.

Actualmente, se está estudiando la utilidad de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) como biomarcadores, dado que desempeñan un papel importante en la síntesis de proteínas y neurotransmisores. En el caso de los linfocitos, se ha observado que los BCAA son imprescindibles para la síntesis de proteínas, de ARN y ADN y para la proliferación en respuesta a un estímulo¹⁴⁵. En ratones, la restricción de BCAA en la dieta conlleva el deterioro de diferentes funciones inmunológicas, aumentando la susceptibilidad a patógenos^{146,147} y en pacientes sépticos o posquirúrgicos se ha evidenciado que la administración por vía intravenosa de esos aminoácidos mejora su sistema inmunológico y disminuye la mortalidad¹⁴⁸. Sin embargo, los efectos en muchas funciones inmunológicas, como las de tipo más específico, aún no han sido completamente estudiados; es importante destacar que diferentes situaciones patológicas influyen en gran medida en los valores de los BCAA, lo que se ha manifestado como una desventaja a la hora de su utilidad como marcador inmunológico de envejecimiento¹⁴⁹.

Los grupos carbonilos se producen a través de la oxidación de ciertas cadenas de aminoácidos y aumentan con la edad, como se ha comprobado en tejido cardíaco, muscular, cerebro y plasma de individuos sanos^{130,131,150-152}. También los grupos carbonilos varían en linfocitos, dependiendo de la edad del donante¹⁵³, por lo que podría proponerse la cuantificación de los grupos carbonilos como un buen método para valorar el daño oxidativo protei-

co y su correlación con el envejecimiento y la severidad de algunas enfermedades^{150,153,154}.

Oxidación del ADN

El ADN es sensible al estrés oxidativo y, además, si su capacidad de reparación es menor que las lesiones causadas se producirán mutaciones que al acumularse con el tiempo pueden afectar a los genes y conducir a la producción de proteínas alteradas¹⁵⁵.

8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8oxodG). 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, la 8-hidroxiguanina. Su nucleósido, la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, es el biomarcador más utilizado para cuantificar el daño oxidativo al ADN¹²¹. Puede medirse mediante diferentes métodos, si bien no existe consenso sobre los valores normales en personas sanas¹⁵⁶. Se producen más de 200 modificaciones oxidativas de las bases de guanina por célula y día¹⁵⁷, que pueden ser eficientemente reparadas. La pérdida en el equilibrio entre la relación de oxidación y reparación provoca la acumulación de 8oxodG. Este equilibrio puede deteriorarse con el envejecimiento^{119,125,158,159}, aunque algunos autores no han detectado cambios en los valores de ese marcador en personas ancianas¹⁶⁰, y se ha observado que al tener cada tejido una capacidad de reparación diferente, los valores de 8oxodG varían de unos a otros. Los valores de 8oxodG mitocondrial se han relacionado con la longevidad máxima de diferentes especies¹²¹. En leucocitos, nuestro grupo ha evidenciado un aumento progresivo del daño oxidativo al ADN nuclear con la edad³⁹, así como en las células inmunológicas de ratones con envejecimiento prematuro¹³¹. No obstante, la existencia de factores que como la dieta pueden afectar a este marcador^{123,131,157,161} hace que existan algunas dudas sobre la utilidad del mismo en el envejecimiento.

Otros productos de la oxidación del ADN son los aductos de ADN, que constituyen un amplio espectro de compuestos que van desde la simple metilación de la guanina hasta productos como los benzopireno-diolepóxidos del ADN, y que se ha comprobado aumentan con la edad^{162,163}. No obstante, el hecho de que toda una serie de factores, como el sexo, el tipo de tejido analizado o la dieta, influya en sus valores¹⁶⁴, además de las condiciones especiales del laboratorio que deben tenerse para su medición (la necesidad de utilizar compuestos radiactivos), hace que su utilidad como biomarcadores sea limitada.

Acortamiento de telómeros

Además del acortamiento de los telómeros que se produce durante la división celular, los telómeros pueden ser

acortados como consecuencia del daño oxidativo y las mutaciones genéticas^{165,166}. En el caso específico del sistema inmunológico, y dada su dinámica celular (en muchas ocasiones dependiente de la rápida expansión clonal de diferentes poblaciones linfocitarias), el mantenimiento de los telómeros es fundamental y su pérdida puede contribuir a los defectos observados en la respuesta inmunológica de los individuos viejos^{167,168}. De hecho, en el caso de las células NK se ha observado que el acortamiento del telómero se produce, de forma paralela a su pérdida de función, a edades más tardías que en los linfocitos T¹⁶⁹. Además, el acortamiento de los telómeros puede predisponer a respuestas autoinmunitarias y por ello explicar la mayor susceptibilidad a presentar estas enfermedades en la senescencia¹⁷⁰. Sin embargo, pese a la clara relevancia de los telómeros, ni los valores de referencia ni el posible impacto provocado por otros factores están claramente establecidos, por lo que de momento no puede considerarse un buen biomarcador de envejecimiento.

Activación del factor de transcripción NF- κ B

Este factor de transcripción es crucial en la función normal del sistema inmunológico: regula la activación de genes necesarios para dar una rápida y apropiada respuesta de las células de este sistema. Sin embargo, una excesivamente aumentada o prolongada activación de este factor dará como resultado la sobreexpresión de muchos mediadores, como compuestos oxidantes y citocinas proinflamatorias, que pueden tener efectos deletéreos y aumentar o mantener una situación de oxidación¹⁷¹. En este sentido, recientemente hemos comprobado que una mayor activación en leucocitos del NF- κ B se relaciona con un aumento en la mortalidad de los individuos; los ratones longevos tienen unos valores de activación semejante a los de leucocitos de animales adultos (datos pendientes de publicación).

Capacidad antioxidante como biomarcador

Ante la capacidad de daño oxidativo que pueden generar los compuestos oxidantes que se producen en el normal funcionamiento de las células, especialmente en la respiración celular en la mitocondria, pero también en la activación de las células inmunitarias en su misión defensiva, el organismo ha generado toda una serie de defensas antioxidantes para neutralizar o evitar el exceso de tales compuestos y, consecuentemente, la oxidación que producen. De todos los sistemas de defensas antioxidantes, vamos a centrarnos seguidamente en los que han resultado ser más relevantes en el envejecimiento y de los que existen estudios en las células inmunológicas; hay investigaciones que apuntan a algunos de ellos como posibles marcadores de edad biológica.

El glutatión es el antioxidante más importante de nuestro organismo; participa en la eliminación del H_2O_2 y de otros peróxidos orgánicos mediante la actividad de la GPx, enzima que utiliza como sustrato el glutatión peroxidasa reducido (GSH). Las enzimas γ -glutamyl-cisteína sintetasa (γ -GCS) y la glutatión reductasa (GRd) son las responsables de la síntesis y regeneración del GSH, respectivamente. El GSH está presente en el citoplasma, en la mitocondria y en el núcleo, hecho que le permite proteger al ADN frente al daño oxidativo¹⁷², aunque los valores son más elevados en el citoplasma. Cuando las células se ven sometidas a una situación de estrés, primero se consumen las reservas citosólicas; la mitocondria conserva las últimas reservas de GSH, pese a que no tiene capacidad para sintetizarlo y precisa ser transportado, con marcada afinidad, hacia estas organelas¹⁷³. Los valores de GSH adecuados son esenciales en procesos como la síntesis de ADN y proteínas, numerosas reacciones enzimáticas, liberación de neurotransmisores y detoxificación de carcinógenos^{174,175}, así como para la función inmunitaria^{176,177}. En condiciones de oxidación, el GSH elimina los peróxidos pasando a glutatión oxidado (GSSG); ambos compuestos pueden analizarse mediante técnicas sencillas y altamente específicas¹⁷⁸. De este modo, se ha propuesto la relación GSSG/GSH como un excelente indicador del estrés oxidativo; de dispone de una serie de trabajos en los que se valoran los cambios en la capacidad redox de los tejidos durante el envejecimiento con el mencionado cociente¹⁷⁹. En todos los casos, al envejecer se observa un mayor carácter prooxidante, es decir, un aumento del cociente GSSG/GSH en muchos de los órganos estudiados¹⁸⁰⁻¹⁸³. Por otro lado, en 2004, Rebrin y Sohal¹⁸⁴ han mostrado que ratones con envejecimiento prematuro presentan valores más bajos de GSH, más altos de GSSG y un mayor cociente GSSG/GSH en relación con la cepa C57BL/6, cuya esperanza de vida es un 48% superior, hecho que apoya la teoría oxidativa del envejecimiento. Nuestro grupo ha comprobado que el cociente GSSG/GSH aumenta en los leucocitos peritoneales al avanzar la edad de los ratones³⁹. También ese cociente está aumentado en esas células procedentes de ratones con envejecimiento prematuro en relación con los de la misma edad sin envejecimiento prematuro, hecho que parece deberse tanto a una disminución de los valores de GSH como a un aumento de los de GSSG^{132,133}. Esa menor cantidad de GSH se ha detectado también en leucocitos de bazo de animales prematuramente envejecidos¹⁸⁵.

Como se ha indicado anteriormente, el sistema del GSH participa en la eliminación del H_2O_2 y de otros peróxidos orgánicos mediante la actividad de la GPx. En relación con la actividad de esta enzima, se han publicado variaciones contradictorias por lo que su utilidad como biomarcador ha sido cuestionada^{128,180,186,187}. No obstante, nuestro grupo ha encontrado una actividad significativamente inferior en los leucocitos peritoneales de ratones con envejecimiento prematuro en relación con los de su edad sin ese

envejecimiento¹³³. Asimismo, se han descrito correlaciones negativas con la edad en la actividad de las enzimas GRd) y glutatión S-transferasa (GSSG-S-T) necesarias para el paso de GSSG a GSH, lo que se correspondería con un aumento en las condiciones de estrés oxidativo celular con el envejecimiento¹⁸⁰. En los leucocitos de ratones con envejecimiento prematuro se aprecia una menor actividad de la GRd¹³³.

La SOD es la enzima responsable de la eliminación del anión superóxido y produce peróxido de hidrógeno. Diferentes investigadores han descrito descensos en su actividad con el envejecimiento^{128,186}, mientras que otros no han encontrado diferencias¹⁸⁷ o incluso han descrito aumentos¹⁸⁸. Estas discrepancias podrían deberse a la existencia de diferentes isoenzimas¹⁸⁹. En nuestro grupo hemos podido observar que la actividad de la SOD disminuye en los leucocitos peritoneales de ratones al avanzar la edad³⁹ y que ésta es menor en las células inmunitarias de ratones con envejecimiento prematuro^{132,133}. En el ser humano, la actividad de esta enzima desciende con la edad tanto en neutrófilos como en linfocitos de sangre periférica³⁷.

La CAT es la enzima responsable de convertir el peróxido de hidrógeno producido por la SOD en agua. La CAT interviene en situaciones de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, mientras que a bajas concentraciones actúa la GPx. La actividad de la CAT y de la GPx está inversamente correlacionada, mientras que la CAT y la GR presentan una correlación positiva. De esta forma, aunque la CAT no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, su intervención en aquellos momentos en los que la concentración de H₂O₂ es elevada hace que desempeñe un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células. Aunque los resultados publicados en la literatura científica no parecen mostrar modificaciones en la actividad de esta enzima con la edad, en nuestro grupo hemos observado tanto una disminución de su actividad en leucocitos de ratones con envejecimiento prematuro¹³³ como un aumento muy significativo en esa actividad en leucocitos sanguíneos de personas centenarias, lo que podría estar en relación con esa mayor respuesta adaptativa celular. De hecho, hay trabajos que relacionan una elevada actividad de CAT con una mayor longevidad¹⁹⁰.

Diferencias por sexo

En muchos de los parámetros que se han comentado se han detectado diferencias por el sexo de los individuos. De hecho, en los últimos años se ha publicado una serie de trabajos que demuestran que la mayor longevidad de las hembras de mamíferos, incluidas las de la especie humana, se debe a su menor estado de oxidación al mantener mayor capacidad antioxidante¹⁹¹. Esta mayor capacidad antioxidante de las hembras, apreciable a nivel mitocondrial, parece estar relacionada con los niveles de estróge-

nos circulantes¹⁹²⁻¹⁹⁴, dado que estas hormonas son capaces de mejorar esa capacidad¹⁹³. Sin embargo, no todos los trabajos son coincidentes, y hay algunos autores que no han encontrado, por ejemplo, en relación con el GSH, diferencias en relación con el sexo¹⁸⁰. En el sistema inmunitario la capacidad funcional de sus células es mayor en las hembras⁸³ y los leucocitos de éstas se encuentran menos oxidados que los de los machos¹⁸⁵.

CONCLUSIONES

En los últimos años se ha publicado toda una serie de trabajos en los que se apunta a diversas funciones inmunológicas como posibles biomarcadores de envejecimiento. No obstante, en muchos casos los datos son controvertidos debido, probablemente, a una serie de razones, como los diferentes diseños experimentales, las técnicas empleadas por los diferentes grupos de investigación o las edades de estudio que se han elegido, entre las más destacables. Otra causa es el hecho de que son muchos los factores influyentes sobre un solo biomarcador, incluso sobre el propio organismo (dieta, actividad física, personalidad), lo que hace que no sea posible que la medida de un único parámetro pueda ser un adecuado marcador del estado de salud del individuo, de su edad biológica y predictor de su esperanza de vida. Por tanto, se hace necesario analizar un grupo de parámetros para llegar a dichas determinaciones, algo que ya se indicó hace años al estudiar el concepto de edad biológica¹³. Es evidente, por lo indicado en la presente revisión, que ciertos parámetros de función inmunológica y del estado redox de los leucocitos deberían tenerse en consideración a la hora de valorar el estado de salud, la edad biológica y la longevidad funcional de un individuo. Asimismo, tales parámetros nos podrían informar de los efectos que pueden tener los cambios en el estilo de vida sobre esa edad biológica. De hecho, nuestro grupo ha demostrado que aquellos individuos que tienen esos parámetros inmunológicos más envejecidos mueren antes y, por el contrario, los que alcanzan una elevada longevidad los mantienen como en la edad adulta. Así, en los individuos centenarios sanos, paradigma de envejecimiento satisfactorio, hemos podido comprobar cómo muchos de tales parámetros se encuentran como en personas de 30 años³⁷. En general, se podría apuntar que unos leucocitos con menor grado de oxidación funcionarán mejor y el individuo que tiene esos leucocitos tendrá una mayor y mejor longevidad. Por todo ello, y aunque son necesarios más estudios para completar tal conclusión, se pueden sugerir tales parámetros de función y estado redox de las células inmunológicas como biomarcadores de envejecimiento y predictores de supervivencia^{30,36,43}.

BIBLIOGRAFÍA

1. De Magalhaes JP. Open-minded scepticism: inferring the causal mechanisms of human ageing from genetic perturbations. *Ageing Res Rev.* 2005;4:1-22.

2. Miquel J. Envejecimiento fisiológico, celular y subcelular. En: Lelois S, Ochoa S, Oro J, Sols A, editores. *Bioquímica y Biológica Molecular*. Barcelona: Salvat; 1986. p. 241-8.
3. Miquel J, Ecónomos AC, Fleming, Yohnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*. 1980;15:575-91.
4. Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1990;65:375-98.
5. Walford L. *The immunologic Theory of Aging*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1969. p. 70-5.
6. Makinodan T, Kay MM. Age influence on the immune system. *Adv Immunol*. 1980;29:287-330.
7. Strehler BL, Mildvan AS. General theory of mortality and aging. *Science*. 1960;132:14-21.
8. De la Fuente M, Herranz A, Vallejo MC. 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.
9. Miquel J. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr*. 1991;12:99-117.
10. Harman D. Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11:298-300.
11. Borkan A, Norris AH. Assessment of biological age using a profile of physiological parameters. *J Gerontol*. 1980;35:177-84.
12. McFarland RA. *Human factors in air transportation: occupational health and safety*. New York: McGraw-Hill; 1953.
13. Comfort A. Test-battery to measure ageing-rate in man. *Lancet*. 1969;2:1411-4.
14. Singh MA. Exercise and aging. *Clin Geriatr Med*. 2004;20:201-21.
15. Sohal RS, Toy PL, Allen RG. Relationship between life expectancy, endogenous antioxidants and products of oxygen free radical reactions in the housefly, *Musca domestica*. *Mech Ageing Dev*. 1986;36:71-7.
16. Farmer KJ, Sohal RS. Relationship between superoxide anion radical generation and aging in the housefly, *Musca domestica*. *Free Radic Biol Med*. 1989;7:23-9.
17. Baker GT, Sprott RL. Biomarkers of aging. *Exp Gerontol*. 1988;23:223-39.
18. 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.
19. 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.
20. Mollinedo F, Borregaard N, Boxer LA. Novel trends in neutrophil structure, function and development. *Immunol Today*. 1999;20:535-7.
21. Simon SO, Green CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Ann Rev Biomed Eng*. 2005;7:151-85.
22. Zhelev DV, Alteraifi AM, Chodniewicz D. Controlled pseudopod extension of human neutrophils stimulated with different chemoattractants. *Biophys J*. 2004;87:688-95.
23. Van den Berg JM, Weryer S, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW. Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2001;69:467-73.
24. Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci*. 1993;18:43-7.
25. Corberand J, Ngyen F, Laharrague P, Fontaniles AM, Gleyzer B, Gyrard E, et al. Polymorphonuclear functions and aging in humans. *J Am Geriatr Soc*. 1981;29:391-7.
26. Former MA, Collazos ME, Barriga C, De la Fuente M, Rodriguez AB, Ortega E. Effect of age on adherence and chemotaxis capacities of peritoneal macrophages. Influence of physical activity stress. *Mech Ageing Dev*. 1994;75:179-89.
27. Di Lorenzo G, Balistreri CR, Candore G, Cigna D, Colombo A, Romano GC, et al. Granulocyte and natural killer activity in the elderly. *Mech Ageing Dev*. 1999;108:25-38.
28. Wenish C, Patruta S, Daxbock F, Krause R, Horl W. Effect of age on human neutrophil function. *J Leukocyte Biol*. 2000;67:40-5.
29. Ferrandez MD, De la Fuente M. Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. *Acta Physiol Scand*. 1999;166:47-53.
30. 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 Com Immunol*. 2003;27:339-50.
31. Egger G, Burda A, Mitterhammer H, Baumann G, Bratschitsch G, Glasner A. Impaired blood polymorphonuclear leukocyte migration and infection risk in severe trauma. *J Infect*. 2003;47:148-54.
32. Richter V, Rassoul F, Purschwitz K, Hentschel B, Reuter W, Kuntze T. Circulating vascular cell adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in dependence on aging. *Gerontology*. 2003;49:293-300.
33. Alvarez E, Ruiz-Gutierrez V, Sobrino F, Santa-María C. Age-related changes in membrane lipid composition, fluidity and respiratory burst in rat peripheral neutrophils. *Clin Exp Immunol*. 2001;124:95-102.
34. Zou Y, Jung KJ, Kim JW, Yu BP, Chung HY. Alteration of soluble adhesion molecules during aging and their modulation by calorie restriction. *FASEB J*. 2004;18:320-2.
35. Niwa Y, Kasama T, Miyachi Y, Kanh T. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging, cross-sectional and longitudinal studies. *Life Sci*. 1989;44:1655-64.
36. Guayerbas N, Puerto M, Víctor 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.
37. Alonso P. Estudio del perfil inmunológico en individuos centenarios. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 2006.
38. Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, et al. Senescence in innate immune responses, reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol*. 2001;70:881-6.
39. De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Alvarez P, Alvarado C. Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol*. 2004;50:683-90.
40. Lord JM, Butcher S, Killampali V, Lascelles D, Salmon M. Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Dev*. 2001;122:1521-35.
41. Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Vella F, Pace L, Antonaci S. Regulatory role of extracellular matrix proteins in neutrophil respiratory burst during aging. *Mech Ageing Dev*. 2000;119:69-82.
42. Göçer P, Güler US, Erten N, Palandeiz S, Rayaman E, Akarsu B, et al. Comparison of polymorphonuclear leukocyte functions in elderly patients and healthy young volunteers. *Med Princ Pract*. 2005;14:382-5.
43. Guayerbas N, Catalán M, Víctor 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;134:41-8.
44. Papazahariadou M, Athanasiadis GI, Papadopoulos E, et al. Involvement of NK cells against tumors and parasites. *Int J Biol Markers*. 2007;22:144-53.
45. Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol*. 2002;71:173-83.
46. Solana R, Mariani E. NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine*. 2000;18:1613-20.
47. Mariani E, Roda P, Mariani AR, Vitale M, Degraasi A, Papa S, et al. Age-associated changes in CD8+ and CD16+ cell reactivity: clonal analysis. *Clin Exp Immunol*. 1990;81:479-84.
48. 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.
49. Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, et al. Natural killer cells in the late decades of human life. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;84:269-75.
50. Heller DA, Ahern FM, Stout JT, McClearn GE. Mortality and biomarkers of aging in heterogeneous stock (HS) mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1998;53:B217-30.
51. Ogata K, An E, Shioi Y, Nakamura K, Luo S, Yokose N, et al. Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people. *Clin Exp Immunol*. 2001;124:392-7.
52. Remarque E, Pawelec G. T cell immunosenescence and its clinical relevance in man. *Rev Clin Gerontol*. 1998;8:5-14.
53. Bruunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhoj P, Pedersen BK. Decreased natural killer cell activity is associated with atherosclerosis in elderly humans. *Exp Gerontol*. 2001;37:127-36.

54. Mysliwska J, Trzonkowski P, Szmit E, Brydak LB, Macha M, Mysliwski A. Immunomodulating effect of influenza vaccination in the elderly differing in health status. *Exp Gerontol*. 2004;39:1447-58.
55. Mariani E, Ravaglia G, Meneghetti A, Tarozzi A, Folti P, Maioli F, et al. Natural immunity and bone and muscle remodelling hormones in the elderly. *Mech Ageing Dev*. 1998;102:279-92.
56. Mariani E, Ravaglia G, Maioli F, Bastagli L, Facchini A, Mariano E, et al. Vitamin D, thyroid hormones and muscle mass influence natural killer (NK) innate immunity in healthy nonagenarians and centenarians. *Clin Exp Immunol*. 1999;116:19-27.
57. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Bastagli L, Facchini A, Mariano E, et al. Effect of micronutrient status on natural killer cell immune function in healthy free-living subjects aged ≥ 90 y. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:590-8.
58. Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossariza A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today*. 1995;16:12-6.
59. Sansoni P, Brianti V, Fagnoni F, Snelli G, Marcatto A, Passeri G, et al. NK cell activity and T-lymphocyte proliferation in healthy centenarians. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;663:505-7.
60. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstien B, Wikby A. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev*. 2005;205:257-68.
61. Nociari MM, Telford W, Russo C. Postthymic development of CD28-CD8+ T cell subset: age-associated expansion and shift from memory to naive phenotype. *J Immunol*. 1999;162:3327-35.
62. Taub DD, Longo DL. Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol Rev*. 2005;205:72-89.
63. Clambey ET, Van Dyk LF, Kappler JW, Marrack P. Non-malignant clonal expansions of CD8+ memory T cells in aged individuals. *Immunol Rev*. 2005;205:170-89.
64. Pawelec G, Effros RB, Caruso C, Remarque E, Barnett Y, Solana R. T cells and aging. *Front Biosci*. 1999;4:D216-69.
65. Globerson A, Effros RB. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today*. 2000;21:515-21.
66. De la Fuente M. Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56:S5-8.
67. Villarrubia VG, Navarro SR. Inmunopatología del envejecimiento: el deterioro de la inmunidad innata y su repercusión sobre la inmunidad específica. Restauración por AM3. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2000;35:30-42.
68. Frasca D, Nguyen D, Riley RL, Blomberg BB. Effects of aging on proliferation and E47 transcription factor activity induced by different stimuli in murine splenic B cells. *Mech Ageing Dev*. 2003;124:361-9.
69. Weksler ME. Changes in the B-cell repertoire with age. *Vaccine*. 2000;18:1624-8.
70. Shodell M, Siegal FP. Circulating, interferon-producing plasmacytoid dendritic cells decline during human ageing. *Scand J Immunol*. 2002;56:518-21.
71. 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:B378-82.
72. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstien B, Wikby A. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev*. 2005;205:257-8.
73. Wikby A, Ferguson F, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Losgren S, et al. An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005;60:556-65.
74. Koch S, Solana R, De la Rosa O, Pawelec G. Human cytomegalovirus infection and T cell immunosenescence: a mini review. *Mech Ageing Dev*. 2006;127:538-43.
75. Wikby A, Nilsson BO, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Lofgren S, et al. The immune risk phenotype is associated with IL-6 in the terminal decline stage: findings from the Swedish Nona immune longitudinal study of very late life functioning. *Mech Ageing Dev*. 2006;127:695-704.
76. Nilsson BO, Ernerudh J, Johansson B, Evrin B, Lofgren S, Ferguson F, et al. Morbidity does not influence the T-cell immune risk phenotype in the elderly: findings in the Swedish Nona Immune Study using sample selection protocols. *Mech Ageing Dev*. 2003;124:469-76.
77. De la Fuente M, Victor VM. Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol*. 2000;78:49-54.
78. 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;85:519-25.
79. Esparza B, Sanchez M, Ruiz M, Barranquero M, Sabino E, Merino F. Neutrophil function in elderly persons assessed by flow cytometry. *Immunol Invest*. 1996;25:185-90.
80. De la Fuente M, Miquel J, Catalan MP, Victor VM, Guayerbas N. The amount of thiol antioxidant ingestion tended to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Rad Res*. 2002;36:119-26.
81. Miles EA, Thies F, Wallace FA, Powell JR, Hurst TL, Newsholme EA, et al. Influence of age and dietary fish oil on plasma soluble adhesion molecule concentrations. *Clin Sci*. 2001;100:91-100.
82. Yu BP, Chung HY. Oxidative stress and vascular aging. *Diabetes Res Clin Pract*. 2001;54:S73-80.
83. De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, et al. Changes with ageing in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology*. 2004;5:389-400.
84. Straub RH, Miller LE, Schölmerich J, Zietz B. Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Neuroimmunol*. 2000;109:10-5.
85. Sandmand M, Bruunsgaard H, Kemp K, Andersen-Ramberg K, Pedersen AN, Skinhoj P, et al. Is ageing associated with a shift in the balance between Type 1 and Type 2 cytokines in humans? *Clin Exp Immunol*. 2002;127:107-14.
86. Rea IM, Stewart M, Campbell P, Alexander HD, Crockard AD, Morris TC. Changes in lymphocyte subsets, interleukin 2, and soluble interleukin 2 receptor in old and very old age. *Gerontology*. 1996;42:69-78.
87. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, et al. T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci*. 2002;7:1056-183.
88. Solana R, Villanueva JL, Peña J, De la Fuente M. Cell mediated immunity in ageing. *Comp Biochem Physiol*. 1991;A99:1-4.
89. Flurkey K, Miller RA, Harrison DE. Cellular determinants of age-related decrements in the T-cell mitogen response of B6CBAF1 mice. *J Gerontol*. 1992;47:B115-20.
90. Bruunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhoj P, Pedersen BK. Proliferative responses of blood mononuclear cells (BMNC) in a cohort of elderly humans: role of lymphocyte phenotype and cytokine production. *Clin Exp Immunol*. 2000;119:433-40.
91. Candore G, Di Lorenzo G, Caruso C, Modica M, Colucci A, Crescimano G, et al. The effect of age on mitogen responsive T cell precursors in human beings is completely restored by interleukin-2. *Mech Ageing Dev*. 1992;63:297-307.
92. Ershler WB. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. *J Am Geriatr Soc*. 1993;41:176-81.
93. Forsey RJ, Thompson JM, Ernerudh J, Hurst TL, Strindhall J, Johanson B, et al. Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mech Ageing Dev*. 2003;124:487-93.
94. Bruun JM, Helge JW, Richelsen B, Stallknecht B. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290:E961-7.
95. Ferrari SL, Karasik D, Liu J, Karamohamed AG, Cupples LA, Kiel DP, et al. Interactions of interleukin-6 promoter polymorphisms with dietary and lifestyle factors and their association with bone mass in men and women from the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res*. 2004;19:552-9.
96. Pfeilschifter J, Köditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev*. 2002;23:90-119.
97. Straub RH, Konecna L, Hrach S, Rothe G, Kreutz M, Schölmerich J, et al. Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:2012-7.
98. Taaffe DR, Harris TB, Ferrucci L, Rowe J, Seeman TE. Cross-sectional and prospective relationships of interleukin-6 and C-reactive protein with physical performance in elderly persons: MacArthur studies of successful aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2000;55:M709-15.

99. Cesari M, Penninx BW, Pahor M, Laurebani F, Cousi AM, Rhys Williams G, et al. Inflammatory markers and physical performance in older persons: the InCHIANTI study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59:242-8.
100. Leng S, Chaves P, Koenig K, Walston J. Serum interleukin-6 and hemoglobin as physiological correlates in the geriatric syndrome of frailty: a pilot study. *J Am Geriatr Soc*. 2002;50:1268-71.
101. Ferrucci L, Harris TB, Guralnik JM, Tracy R, Corti M, Colan H, et al. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. *J Am Geriatr Soc*. 1999;47:639-46.
102. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH, et al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med*. 1999;106:506-12.
103. Huang H, Patel DD, Manton KG. The immune system in aging: roles of cytokines, T cells and NK cells. *Front Biosci*. 2005;10:192-215.
104. Gupta S, Gollapudi S. Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in naive and memory T cell subsets. *Autoimmun Rev*. 2006;5:264-8.
105. Screaton G, Xu XN. T cell life and death signalling via TNF-receptor family members. *Curr Opin Immunol*. 2000;12:316-22.
106. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Ann Rev Immunol*. 1994;12:141-79.
107. Corsini E, Battaini F, Lucchi L, Marinovich M, Racchi M, Govoni S, et al. A defective protein kinase C anchoring system underlying age-associated impairment in TNF- α production in rat macrophages. *J Immunol*. 1999;163:3468-73.
108. Zissel G, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Age-related decrease in accessory cell function of human alveolar macrophages. *J Invest Med*. 1999;47:51-6.
109. Pedersen B, Bruunsgaard H, Ostrowski K, Krabbe K, Hansen H, Krzykowski K, et al. Cytokines in aging and exercise. *Int J Sports Med*. 2000;21:S4-21.
110. Lord JM, Butcher S, Killampali V, Lascelles D, Salmon M. Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Dev*. 2001;122:1521-35.
111. De la Fuente M, Del Río M, Medina S. Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J Neuroimmunol*. 2001;116:158-167.
112. Puerto M, Guayerbas N, Álvarez 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.
113. Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Pedersen AN, Skinhoj P, Pedersen BK. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1999;54:M357-64.
114. Bruunsgaard H, Skinhoj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, TNF-alpha and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2000;21:255-60.
115. Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Hjelmberg J, Klarlund Pedersen B, Jeune B. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am J Med*. 2003;115:278-83.
116. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 1996;273:59-63.
117. Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol*. 1998;33:113-26.
118. Sastre J, Pallardó FV, Viña J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:1-8.
119. Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci*. 2004;27:595-600.
120. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev*. 2004;125:811-26.
121. Barja G, Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the Herat and brain of mammals. *FASEB J*. 2000;14:312-8.
122. Irshad M, Chaudhuri PS. Oxidant-antioxidant system: Role and significance in human body. *Indian J Exp Biol*. 2002;40:1233-9.
123. Perez Druso D, Strobel P, Fonca R, Diez MS, VAsquez L, Urquiga J, et al. Wine, diet, antioxidant defences and oxidative damage. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;957:136-45.
124. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behaviour: Beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:S313-6.
125. Ward WF, Qi W, Van Remmen H, Zackert WE, Roberts JL 2nd, Richardson A. Effects of age and caloric restriction on lipid peroxidation: Measurement of oxidative stress by F2-isoprostane levels. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005;60:845-7.
126. Roberts LJ 2nd, Reckelhoff. Measurement of F(2)-isoprostanes unveils profound oxidative stress in aged rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;287:254-6.
127. Fontana L, Giagulli C, Cominacini L, Fratta Pasini A, Minuè P, Lecchi A, et al. Beta2 integrin-dependent neutrophil adhesion induced by minimally modified low-density lipoproteins is mainly mediated by F2-isoprostanes. *Circulation*. 2002;106:2434-41.
128. Cracowski JL, Stanke-Labesque F, Souvignet C, Bessard G. Isoprostanes: New markers of oxidative stress in human diseases. *Press Med*. 2000;29:604-10.
129. Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta*. 2001;305:75-80.
130. Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, et al. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic Res*. 2002;40:495-505.
131. Mutlu-Turkoglu U, Ilhan E, Oztezcan S, Kuru A, Aykac-Toker G, Uysal M. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin Biochem*. 2003;36:397-400.
132. Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausserès N, Jiménez 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.
133. Alvarado C, Alvarez P, Jiménez 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.
134. Alvarado C, Álvarez P, Guayerbas N, Puerto M, Jiménez L, De la Fuente M. 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*. 2005;40:362-7.
135. Curzio M, Esterbauer H, Poli G. Possible role of aldehydic lipid peroxidation products as chemoattractants. *Int J Tissue React*. 1987;9:295-306.
136. Siems W, Capuozzo E, Lucano A, Salerno C, Crifò C. High sensitivity of plasma membrane ion transport ATPases from human neutrophils towards 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal. *Life Sci*. 2003;73:2583-90.
137. Siems WG, Capuozzo E, Verginelli D, Salerno C, Crifò C, Grune T. Inhibition of NADPH oxidase-mediated superoxide radical formation in PMA-stimulated human neutrophils by 4-hydroxynonenal—binding to -SH and -NH₂ groups. *Free Radic Res*. 1997;27:353-8.
138. Dianzani C, Parrini M, Ferrara C, Fantozzi R. Effect of 4-hydroxynonenal on superoxide anion production from primed human neutrophils. *Cell Biochem Funct*. 1996;14:193-200.
139. Cambiaggi C, Dominici S, Comporti M, Pompella A. Modulation of human T lymphocyte proliferation by 4-hydroxynonenal, the bioactive product of neutrophil-dependent lipid peroxidation. *Life Sci*. 1997;61:777-85.
140. Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:611-9.
141. Beregi E, Regius O, Rajczy K. Comparative study of the morphological changes in lymphocytes of elderly individuals and centenarians. *Age Ageing*. 1991;20:55-9.
142. Poon HF, Calabrese V, Sacapagnini G, Butterfield DA. Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med*. 2004;20:329-59.
143. Requena JR, Levine RL, Stadtman ER. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Aminoacids*. 2003;25:221-6.
144. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Aminoacids*. 2003;25:207-8.
145. Calder PC. Branched-chain amino acids and immunity. *J Nutr*. 2006;136:S288-93.
146. Tsukishiro T, Shimizu Y, Higuchi K, Watanabe A. Effect of branched-chain amino acids on the composition and cytolytic activity of liver-associated lymphocytes in rats. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15:849-59.

147. Petro TM, Bhattacharjee JK. Effect of dietary essential amino acid limitations upon susceptibility to *Salmonella typhimurium* and the effect upon humoral and cellular immune response in mice. *Infect Immun.* 1981;32:251-9.
148. García de Lorenzo A, Ortiz-Leyba C, Planas M, Montejó JC, Núñez R, Ordóñez FJ, et al. Parenteral administration of different amounts of branch-chain amino acids in septic patients: clinical and metabolic aspects. *Crit Care Med.* 1997;25:418-24.
149. Tom A, Fair KS. Assessment of branched-chain amino acid status and potential for biomarkers. *J Nutr.* 2006;136:324-30.
150. Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem.* 2004;11:1105-12.
151. Grune T, Shringarpure R, Sitte N, Davies KJA. Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001;56:B459-67.
152. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;928:22-38.
153. García-Arumí E, Andreu AL, López-Hellín J, Schwartz S. Effect of oxidative stress on lymphocytes from elderly subjects. *Clin Sci.* 1998;94:447-52.
154. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res.* 2000;33:S99-108.
155. Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging.* 2002;23:795-807.
156. Collins AR, Cadet J, Moller L, Poulsen HE, Vina J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch Biochem Biophys.* 2004;423:57-65.
157. Loft S, Fisher-Nielsen A, Jeding IB, Vistisen K, Poulsen HE. 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *J Toxicol Environ Health.* 1993;40:391-404.
158. Singh KK. Mitochondria damage checkpoint, aging, and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1067:182-90.
159. Chomyn A, Attardi G. MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304:519-29.
160. Sackey JM, Milbury PE, Cannon JG, Roubenoff R, Blumberg JB. Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:1575-88.
161. 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 leucocytes. *Eur J Nutr.* 2006;45:428-38.
162. Randerath K, Putman KL, Osterburg HH, Johnson SA, Morgan DG, Finch CE. Age-dependent increases of DNA adducts (I-compounds) in human and rat brain DNA. *Mutat Res.* 1993;295:11-8.
163. Lee BM, Kwack SJ, Kim HS. Age-related changes in oxidative DNA damage and benzo(a)pyrene diolepoxide-I (BPDE-I)-DNA adduct levels in human stomach. *J Toxicol Environ Health A.* 2005;68:1599-610.
164. Randerath K, Li DH, Randerath E. Age-related DNA modifications (I-compounds): modulation by physiological and pathological processes. *Mutat Res.* 1990;238:245-53.
165. Von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med.* 2005;5:197-203.
166. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet.* 2003;361:393-5.
167. Son NH, Murray S, Yanovski J, Hodes RJ, Weng N. Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity for telomerase expression in human T and B lymphocytes with age. *J Immunol.* 2000;165:1191-6.
168. Hodes RJ, Hathcock KS, Weng NP. Telomeres in T and B cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:699-706.
169. Mariani E, Meneghetti A, Formentini I, Neris S, Cattini L, Ravaglia L, et al. Different rates of telomere shortening and telomerase activity reduction in CD8 T and CD16 NK lymphocytes with ageing. *Exp Gerontol.* 2003;38:653-9.
170. Goronzy JJ, Fujii H, Weyand CM. Telomeres, immune aging and autoimmunity. *Exp Gerontol.* 2006;41:246-51.
171. 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.
172. Sandström BE, Marklund SL. Effects of variation in glutathione peroxidase activity on DNA damage and cell survival in human cells exposed to hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide. *Biochem J.* 1990;271:17-23.
173. Griffith OW, Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:4668-72.
174. Viña J, editor. *Glutathione: metabolism and physiological functions.* Boca Raton: CRC Press; 1990.
175. Miquel J, Weber H. Aging and increased oxidation of the sulfur pool. En: Viña J, editor. *Glutathione: Metabolism and physiological functions.* Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 187-92.
176. Dröge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, et al. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J.* 1994;8:1131-8.
177. Dröge W, Breitkreutz R. Glutathione and immune function. *Proc Nut Soc.* 2000;59:595-600.
178. Camera E, Picardo M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;781:181-206.
179. De la Asuncion JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallado FV, et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.* 1996;10:333-8.
180. Erden-Inal M, Snal E, Kanbak G. Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Funct.* 2002;20:61-6.
181. Jones DP, Mody VC Jr, Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg P Jr. 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.
182. Rebrin I, Kamzalov S, Sohal RS. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:626-35.
183. Gho CG, Kim HJ, Chung SW, Jung KJ, Shim KH, Yu BP, et al. Modulation of glutathione and thioredoxin systems by caloric restriction during the aging process. *Exp Gerontol.* 2003;38:539-48.
184. Rebrin I, Sohal RS. Comparison of redox thiol state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevity. *Exp Gerontol.* 2004;39:1513-9.
185. 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.
186. Kasapoglu M, Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol.* 2001;36:209-20.
187. Barnett YA, King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res.* 1995;338:115-28.
188. Saraymen R, Kilic E, Yazar S, Cetin M. Influence of sex and age on the activity of antioxidant enzymes of polymorphonuclear leukocytes in healthy subjects. *Yonsei Med J.* 2003;44:9-14.
189. Gianni P, Jan KJ, Douglas MJ, Stuart PM, Tarnopolsky MA. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol.* 2004;39:1391-400.
190. Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Rojas C, Cadenas S, Barja G. Longevity and antioxidant enzymes, non-enzymatic antioxidants and oxidative stress in the vertebrate lung: a comparative study. *J Comp Physiol.* 1994;163:682-9.
191. 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;40:1359-65.
192. Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardo FV, Mann GE, et al. 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging Cell.* 2005;4:113-8.
193. Viña J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardo FV. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett.* 2005;579:2541-5.
194. Borrás C, Gambini J, Vina J. Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Front Biosci.* 2007;12:1008-13.