

ARTÍCULOS DE REVISIÓN REVIEW ARTICLES

Estrés oxidativo y suplementación antioxidante de la dieta en el envejecimiento, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria

Oxidative stress and antioxidant diet supplementation in ageing, atherosclerotic and immune dysfunction processes

MIQUEL J. Y RAMÍREZ-BOSCA A.

Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante. Campus de San Vicente del Raspeig, Ap.99.
E-03080 Alicante. E-mail: kiri_miquel@yahoo.com

RESUMEN

El aumento de la longevidad en los países industrializados requiere costosos servicios sanitarios y asistenciales, pues muchas personas ancianas sufren un proceso de envejecimiento patológico ligado a enfermedades degenerativas crónicas y déficits funcionales de larga duración. Por otra parte, numerosos estudios sugieren que más personas podrían evitar el envejecimiento patológico si consumieran dietas ricas en antioxidantes. Así sería posible proteger más eficazmente al organismo contra el estrés oxidativo, que contribuye al envejecimiento normal y tiene un papel aún más importante en la aterosclerosis, la inmunodepresión y otros procesos degenerativos que a menudo forman parte del envejecimiento patológico.

De acuerdo con lo anterior, y según los datos revisados, la suplementación de la dieta de los sujetos de edad madura o avanzada con antioxidantes (como la *tioprolina*, la *N-acetilcisteína* y los *antioxidantes fenólicos de la cúrcuma*) podría aumentar las probabilidades de prevenir o frenar los mencionados procesos degenerativos, ayudando así a conseguir una mayor longevidad con adecuada preservación funcional.

PALABRAS CLAVE: Envejecimiento. Aterosclerosis. Inmunodepresión. Antioxidantes. Tioprolina. N-acetilcisteína. *Curcuma longa*.

ABSTRACT

The increase in longevity in the developed countries requires costly health and social aid programs, since many elderly persons suffer from pathological ageing processes linked to chronic degenerative diseases and long-lasting functional deficiencies. However, many studies have suggested that a greater number of persons could prevent pathological ageing by consuming diets rich in antioxidants. Such diets could provide the organism with more effective protection against the oxidative stress that contributes to normal ageing, and have an even more important role in atherosclerosis, immune depression and other degenerative processes that are often found in pathological ageing.

In accordance with these concepts and with the data reviewed, diet supplementation in mature or advanced age subjects with antioxidants (such as thioproline, N-acetylcysteine and the phenolic compounds of curcuma longa) could increase the chances of preventing or retarding the above-mentioned degenerative processes, thus helping to reach greater longevity with the adequate preservation of functional capacity.

KEY WORDS: Ageing. Oxidative stress. Atherosclerosis. Immune depression. Thioproline. N-acetylcysteine. *Curcuma longa*.

INTRODUCCIÓN: DESARROLLO DE LOS CONCEPTOS BÁSICOS RELACIONADOS CON LOS RADICALES LIBRES, EL ESTRÉS OXIDATIVO Y SUS EFECTOS FISIOPATOLÓGICOS

Según se resume en la anterior revisión de Miquel¹, las actuales investigaciones sobre los efectos fisiopatológicos del estrés oxidativo derivan de la observación del farmacéutico sueco C.W. Scheele de que, en estado puro, el oxígeno es un gas tóxico. Sin embargo el descubrimiento de que el oxígeno en altas concentraciones efectivamente puede tener efectos tóxicos sobre las células de los organismos animales se debe a Paul Bert², que describe en su tratado *La Pression Barometrique* los aspectos más esenciales del envenenamiento por oxígeno, o sea la gran variedad de sus síntomas, la distinta vulnerabilidad a dicho envenenamiento de las diversas especies y la particular sensibilidad a la hiperoxia del sistema nervioso. Más recientemente, Bean^{3,4} investigó sistemáticamente estos temas, y el uso de atmósferas con altas concentraciones de oxígeno en submarinos y vehículos espaciales de la NASA dio impulso a numerosos estudios sobre los mecanismos fisiopatológicos de la toxicidad de este gas.

El primer trabajo sobre radicales libres se debe a Raab⁵, que mostró que algunos colorantes, inocuos en condiciones normales, se vuelven tóxicos en presencia de oxígeno y de una luz intensa. Esta observación llevó a Mulliken⁶ a proponer que el oxígeno puede adoptar un "estado de excitación" o activación mediante un cambio de su estructura electrónica. Esta activación del oxígeno produce radicales libres, pues según explica Michaelis⁷, la molécula de este gas se reduce gradualmente, o sea gana electrones de uno en uno, con lo cual se forman fragmentos moleculares con un electrón no apareado y muy alta reactividad. La gran importancia biomédica de esta peculiaridad de la química del oxígeno ha sido resumida por Gutteridge et al.⁸: "La ventaja de este proceso para la vida aerobia es un enlentecimiento de las reacciones de oxígeno con compuestos no radicales. La desventaja es que (...) se forman especies reactivas de oxígeno." Estas incluyen el anión superóxido, el radical hidroxilo y otras especies relacionadas⁹.

INTRODUCTION: THE DEVELOPMENT OF BASIC CONCEPTS RELATED TO FREE RADICALS, OXIDATIVE STRESS AND ITS RESULTING PHYSIOPATHOLOGICAL EFFECTS

As stated in the previous revision carried out by Miquel¹, the current research on the physiopathological effects of oxidative stress derives from the observation made by the Swedish pharmacist, C.W. Scheele, that oxygen, in its pure state, is a toxic gas. However, the discovery of the fact that high concentrations of oxygen may have toxic effects in cells in animal organisms is attributable to Paul Bert², who described in his treatise, the Barometric Pressure, the most essential aspects of oxygen poisoning, the great variety of its symptoms, the different degrees of vulnerability to such a poisoning in different species, and the particular sensitivity of the nervous system to hyperoxia. In a more recent study, Bean^{3,4} carried out systematic research on these subjects. The fact that atmospheres with high concentrations of oxygen were used in submarines and NASA spacecraft gave rise to numerous studies on the physiopathological toxicity mechanisms of this gas.

The first work on free radicals was carried out by Raab⁵, who demonstrated that some food colourings, which are innocuous under normal conditions, become toxic in the presence of oxygen and in intense light. This observation led Mulliken⁶ to propose that oxygen may adopt "states of excitation" or activation through changes in its electronic structure. Such an activation of oxygen produces free radicals since, according to Michaelis⁷, the molecule of this gas is reduced gradually. This is to say that it gains electrons one by one, and thus fragments of molecules are formed with a single unpaired and highly reactive electron. The great biomedical significance of this chemical peculiarity of oxygen was summarised by Gutteridge et al.⁸: "The advantage of this process for aerobic life is the retardation of oxygen reactions with non-radical compounds. The disadvantage is that (...) oxygen reactive species are formed". These include the superoxide anion, the radical hydroxyl and other related species⁹.

Oxygen radicals have an essential role in biological processes, such as those occurring in the mitochondrial respiratory chain^{10,11}, detoxifying

Los radicales de oxígeno tienen un papel esencial en procesos biológicos, como son las reacciones enzimáticas que tienen lugar en la cadena respiratoria mitocondrial^{10,11}, las reacciones detoxificadoras del sistema citocromo p-450¹², la fagocitosis^{13,14}, y la síntesis de prostaglandinas¹⁵. No obstante, dada la toxicidad del oxígeno, su utilización por las células de los organismos aerobios requiere que éstos dispongan de numerosos mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para proteger sus membranas y genoma contra la desorganización causada por reacciones oxidativas no programadas.

Ya en 1945 Dam y Granados¹⁶ habían demostrado la importancia de los mecanismos antioxidantes para prevenir la excesiva peroxidación de las grasas, al observar que se acumulan peróxidos de lípido en el tejido adiposo de animales deficientes en vitamina E. Por otra parte, tiene gran interés en relación con el papel de la peroxidación de grasa en el envejecimiento patológico la identificación de peróxidos de lípido en aortas humanas ateromatosas¹⁷. Casi simultáneamente Dubouloz y Dumas^{18,19} demostraron que los peróxidos de lípido también se forman en la piel expuesta a agentes físicos agresivos como son las radiaciones X y ultravioleta, llegando a la conclusión de que estos peróxidos están estrechamente ligados a los procesos inflamatorios, lo que explica por qué casi todos los antioxidantes muestran una marcada acción anti-inflamatoria.

Según nuestra anterior revisión¹, numerosas investigaciones apoyan el concepto de que la peroxidación de los lípidos está relacionada tanto con las normales funciones fisiológicas²⁰ como con procesos patológicos de las membranas celulares y subcelulares, peroxisomas, lisosomas, retículo endoplasmático y mitocondrias²¹.

Desde el punto de vista gerontológico tiene gran interés que la peroxidación de los lípidos, a causa de la reacción del malonaldehído formado en dicha peroxidación con los grupos amino del nADNA²², puede causar mutaciones del genoma nuclear y procesos neoplásicos (Ames²³). Por otra parte, el malonaldehído también puede causar lesiones del genoma de las mitocondrias (mtADN), lo que dificulta la regeneración de estos organelos en los organismos viejos, con el consiguiente descenso del rendimiento bioenergético y funcional (Miquel^{24,25}). Por todo ello, los mecanismos prooxidantes y antioxidantes tienen

reacciones en el citocromo p-450 system¹², in phagocytosis^{13,14}, and in the synthesis of prostaglandins¹⁵. However, given that oxygen is a toxic gas, its use by cells in aerobic mechanisms requires these cells to have numerous enzymatic and non-enzymatic antioxidants, in order to protect their genome and membranes from the disorganisation caused by non-programmed oxidative reactions.

As early as 1945 Dam and Granados¹⁶ had demonstrated the importance of antioxidant mechanisms in the prevention of excessive peroxidation in fats, on observing an accumulation of lipid peroxides in adipose tissue in vitamin E deficient animals. Similarly, the identification of lipid peroxides in human atherosclerotic aortas¹⁷ is of great interest, due to its relationship with the role of fat peroxidation in pathological ageing. Almost simultaneously, Dubouloz and Dumas^{18,19} demonstrated that lipid peroxides are also formed in skin that has been exposed to aggressive physical agents, such as ultraviolet and X radiation. They arrived at the conclusion that these peroxides are closely linked with inflammatory processes, which explains why almost all antioxidants show a marked anti-inflammatory action.

In a previous revision carried out by this research group¹, numerous investigations supported the concept that lipid peroxidation is related to both normal physiological functions²⁰ and to pathological processes in cellular and sub-cellular membranes, peroxisomes, lysosomes, endoplasmic reticulum and mitochondria²¹.

From the point of view of gerontology, the peroxidation of lipids is of great interest, since the reaction of malonaldehyde, formed in peroxidation, with the nADNA²² amino acid groups²², may cause mutations in the nuclear genome and neoplastic processes (Ames²³). On the other hand, malonaldehyde may also cause lesions in the mitochondrial genome (mtDNA), which hampers the regeneration of these organelles in ageing organisms, leading to the consequent decrease in bio-energetic and functional performance (Miquel^{24,25}). In summary, as we have already mentioned²⁶⁻²⁸ and will continue to revise below, prooxidant and anti-oxidant mechanisms are of great importance in ageing and related pathological processes.

una gran importancia en el envejecimiento y procesos patológicos relacionados, según ya hemos comentado²⁶⁻²⁸ y revisaremos a continuación.

ENVEJECIMIENTO

Estrés oxidativo

Los doctores Denham Harman^{29,30} y Rebeca Gerschman³¹ trabajando independientemente en la Universidad de California, en Berkeley, publicaron una serie de trabajos que implican en el envejecimiento a los radicales libres de oxígeno (que derivan del metabolismo aerobio), y al estrés oxidativo. Así, según Harman²⁹: "La vida surgió como resultado de reacciones de radicales libres, seleccionó reacciones de radicales libres para jugar un papel en el metabolismo y aseguró la evolución empleando estas reacciones para causar las mutaciones y la muerte". Además, Harman^{29,30} propuso que los radicales libres no solo causan el envejecimiento normal (caracterizado por una pérdida progresiva de rendimiento fisiológico) sino que también están implicados en la patogénesis de muchos procesos degenerativos cuya incidencia aumenta al envejecer.

Estos conceptos han inspirado el siguiente comentario de Vijg y Müller³²: "La teoría gerontológica de los radicales libres propuesta por Denham Harman en 1956 aún ofrece la explicación más atractiva de un mecanismo general responsable del envejecimiento. La diferencia es que, mientras en 1969 sólo había cien trabajos publicados sobre radicales libre, envejecimiento y enfermedad, la cantidad aumentó a 2000 en 1990 y será ahora mucho mayor".

Las ideas de Rebeca Gerschman³¹ sobre el papel de los radicales libres en el envejecimiento derivan de sus estudios sobre el *efecto del oxígeno* en radiobiología, es decir del hecho de que los efectos nocivos de la radiación ionizante aumentan en presencia del oxígeno, mientras que la falta de este gas tiene un efecto protector sobre las células irradiadas. No había una explicación para este fenómeno hasta que esta autora propuso una teoría general del *envenenamiento por oxígeno*, que mantiene que la toxicidad de este gas está ligada a un aumento en la concentración intracelular de radicales libres, igual que sucede en las células irradiadas. Por lo tanto, según Gerschman³¹, "las oxidaciones incontroladas que

AGEING

Oxidative stress

The doctors Denham Harman^{29,30} and Rebeca Gerschman³¹ working independently at the University of California, in Berkeley, published a series of works in which oxygen free radicals (derived from the aerobic metabolism) and oxidative stress were considered to be involved in the ageing process. According to Harman²⁹: "Life emerged as a result of free radical reactions, it selected free radical reactions to play a role in the metabolism, and assured its evolution by employing these reactions to cause mutations and death". Furthermore Harman^{29,30} proposed that free radicals not only caused normal ageing (characterised by the progressive loss of physiological performance), but were also involved in the pathogenesis of many degenerative processes, which appear more increasingly with the onset of the ageing process.

These concepts inspired the following comments made by Vijg and Müller³²: "The free radical theory in gerontology, as proposed by Denham Harman in 1956, still offers the most attractive explanation of the general mechanism responsible for the ageing process. However, the difference is that in 1969, only one hundred works on free radicals, ageing and disease had been published. In 1990 this figure had increased to 2000, and currently the number of articles on the subject is much greater".

The ideas expressed by Rebecca Gerschman³¹ on the role of free radicals in ageing were based on her studies on *the effect of oxygen in radiobiology, in which* the harmful effects from ionizing radiation increase in the presence of oxygen, while its absence has a protecting effect on irradiated cells. There was no explanation for this phenomenon until this same author proposed a general theory for *oxygen poisoning*, in which the toxicity of the gas is suggested to be linked to an increase in the intracellular concentration of free radicals, as occurring in irradiated cells. Therefore, according to Gerschman³¹, "uncontrolled oxidation deriving from a slight insufficiency in the anti-oxidant defence system may represent a crucial factor in ageing processes and life span".

A similar idea was proposed by Sies³³, who defined oxidative stress as an alteration of the

derivan de una pequeña insuficiencia en el sistema de defensa antioxidante podrían ser un factor crucial en el proceso del envejecimiento y en la duración de la vida".

Una idea parecida ha sido propuesta por Sies³³, que define el estrés oxidativo como una alteración del equilibrio prooxidante/antioxidante, en favor del primero. Y más recientemente se afirma que el estrés oxidativo causante del envejecimiento no solo deriva de los radicales de oxígeno sino también de los efectos desorganizadores de otros productos tóxicos ligados a reacciones de oxidación, como el óxido nítrico y los aldehídos resultantes del antes mencionado proceso de peroxidación de los lípidos.

De acuerdo con los anteriores conceptos sobre el papel de los radicales libres y estrés oxidativo en el proceso de envejecimiento, los estudios de nuestro laboratorio²⁴⁻²⁶ se han centrado en el papel de las mitocondrias como diana principal de dicho estrés. Así, nuestras observaciones por microscopía electrónica sugieren que el envejecimiento deriva de una desorganización progresiva de las mitocondrias con formación del pigmento *lipofuscina* (a partir de membranas mitocondriales oxidadas), que sólo alcanza niveles importantes en las células terminalmente diferenciadas²⁴. De acuerdo con estos datos, hemos propuesto una teoría gerontológica del *estrés oxidativo-lesión mitocondrial*^{24,25} que ha encontrado considerable apoyo en investigaciones más recientes²⁶⁻²⁸. Según esta teoría la causa fundamental del envejecimiento sería el estrés oxidativo de las mitocondrias. Así, desde el punto de vista de la evolución biológica²⁷, "el oxígeno no sólo fue un factor clave en el proceso de diferenciación celular sino también en el origen del envejecimiento, pues tanto las células diferenciadas como el envejecimiento celular aparecieron simultáneamente cuando el oxígeno se acumuló en la biosfera y la vida *aprendió* a utilizarlo para aumentar la producción celular de energía (...). Las células diferenciadas irreversiblemente contienen una alta concentración de membranas mitocondriales internas, que usan oxígeno (y producen radicales de oxígeno). Esto permite la síntesis de las altas concentraciones de ATP necesarias para apoyar las funciones fisiológicas hasta la edad en que la supervivencia de la especie se asegura a través de la reproducción sexual. Sin embargo (...) la adquisición de la fosforilación oxidativa es un "arma de dos filos" pues los altos niveles

pro-oxidant/anti-oxidant equilibrium, in favour of the former. More recently, it is claimed that oxidative stress, as a cause of ageing, is not only attributable to oxygen radicals, but also to the disorganizing effects of other toxic products that are linked to oxidative reactions, such as nitric oxide and the resulting aldehydes arising from the previously mentioned lipid peroxidation process.

The previously mentioned concepts concerned with the role of free radicals and oxidative stress in the ageing process served as a basis for the work carried out at our laboratories²⁴⁻²⁶, which was focused on the role of the mitochondria as the main target of such stress. Our observations, carried out by electron microscopy, suggested that ageing is based on a progressive disorganisation of the mitochondria with the formation of the pigment *lipofuscin* (from oxidated mitochondrial membranes), only reaching significant levels in terminally differentiated cells²⁴. In accordance with this data, we have proposed an oxidative stress - mitochondrial lesion theory^{24,25} which suggests that the fundamental cause of ageing is oxidative stress in mitochondria. This possibility has been corroborated to a considerable degree by more recent research²⁶⁻²⁸. From a biological evolutionary point of view²⁷, "oxygen was not only a key factor in the process of cellular differentiation, but also in the ageing process, given that both cell differentiation and cellular ageing appeared simultaneously, when oxygen accumulated in the biosphere and life learnt to use it, in order to increase cellular energy production"(...). Irreversibly differentiated cells contain a high concentration of internal mitochondrial membranes, which use oxygen, and produce oxygen radicals. This permits the synthesis of high concentrations of ATP, which is necessary to support physiological functions, until the species has reached sufficient age to assure its survival through sexual reproduction. However, (...) oxidative phosphorylation acquisition is a "double edged sword", given that high levels of cellular respiration appear to be accompanied by both an imperfect detoxification of oxy-radicals and mitochondrial regeneration. Such a situation is incompatible with unlimited cell survival". The importance of oxidative stress in the loss of genetic information, the fundamental mechanism in ageing, has also been highlighted previously²⁷: Metazoa cells (...) undergo progre-

de la respiración celular parecen acompañarse de una imperfecta detoxificación de los oxi-radicales y de la regeneración mitocondrial, lo que es incompatible con una ilimitada supervivencia celular." La importancia del estrés oxidativo en la pérdida de información genética, que es el mecanismo fundamental del envejecimiento, también ha sido destacada anteriormente²⁷: "Las células de los metazoos (...) sufren una desorganización progresiva que deriva de la lesión genética que sufren sus mitocondrias a causa del estrés oxidativo crónico". Así, la aparente insuficiencia de los mecanismos antioxidantes celulares explica la paradoja de que, según Williams³⁴, "después del hecho milagroso de la morfogénesis, un metazoo complejo es incapaz de realizar la tarea aparentemente más fácil de preservar lo que ya está formado."

Protección antioxidante

Con objeto de mejorar la protección antioxidante, para así prevenir el envejecimiento prematuro o patológico, es digno de mención que el aumento del estrés oxidativo que tiene lugar al envejecer se acompaña de un progresivo descenso en los niveles tisulares de glutatión reducido (Miquel y Weber³⁵). Esto es muy importante, pues el glutatión reducido (GSH) es necesario para la síntesis de ADN y proteínas, actividad de muchos enzimas, liberación de neurotransmisores y detoxificación de compuestos carcinógenos. Además, las moléculas de GSH pueden ceder un átomo de hidrógeno a un oxidante o radical libre para formar glutatión oxidado (GSSG), protegiendo así a las lipoproteínas contra el estrés oxidativo que puede llevar a reacciones de peroxidación, con el consiguiente aumento de la permeabilidad de las membranas a los iones de calcio y probable muerte celular. Esto justifica las investigaciones para aumentar la longevidad de animales de laboratorio mediante la suplementación de la dieta con dos antioxidantes tiólicos precursores de la cisteína³⁶ o sea el *ácido tiazolidin carboxílico* (*tioprolina*, TP) y la *N-acetilcisteína* (NAC). Según nuestros datos, esta suplementación causa, en insectos y ratones, aumentos de la longevidad media de aproximadamente un 10% y retrasa la involución que tiene lugar con la edad en ciertos parámetros bioquímicos y funcionales^{37,38}.

ssive disorganisation arising from the genetic lesions that occur in their mitochondria caused by chronic oxidative stress".

Therefore, it is the apparent insufficiency of the anti-oxidant cellular mechanisms which explains the paradox that, in the words of Williams³⁴, "after the miracle of morphogenesis, a complex metazoa is incapable of carrying out the apparently easier task of preserving that which has already been formed".

Antioxidant protection

In an attempt to improve antioxidant protection, and in so doing, prevent premature or pathological ageing, it should be taken into account that an increase in oxidative stress, taking place in the ageing process, is accompanied by a progressive decrease in tissue levels of reduced glutathione (Miquel & Weber³⁵). This is of important significance, given that reduced glutathione (GSH) is necessary for the synthesis of DNA and proteins, the activity of many enzymes, the liberation of neurotransmitters and the detoxification of carcinogenic compounds. Furthermore, GSH molecules may cede a hydrogen atom to an oxidant or free radical, forming glutathione oxide (GSSG), and thus affording protection to the lipoproteins against oxidative stress, which could lead to peroxidation reactions, with the consequent increase in membrane permeability to calcium ions and probable cellular death. This would justify research into increasing longevity in laboratory animals through diet supplements with two thiolic antioxidant cysteine precursors³⁶, that is to say thiazolidin carboxylic acid (thioprolin (TP)) and N-acetylcysteine (NAC). According to our data, the use of these supplements produces an average increase in life span of 10% in insects and mice and also delays age involution in certain biochemical and functional parameters^{37,38}.

The effects of TP & NAC have also been studied by other authors³⁹⁻⁴², who confirm that ageing is accompanied by progressive oxidation of the glutathione and other thiolic compounds in the tissues of vertebrates and invertebrates, producing changes in the oxidised glutathione/reduced glutathione quotient (much more apparent in the mitochondria than in the extramitochondrial compartment), and oxidative lesions in the mtDNA⁴⁰.

Los efectos de la TP y NAC también han sido estudiados por otros autores³⁹⁻⁴², que confirman que el envejecimiento se acompaña de una progresiva oxidación del glutatión y de otros compuestos tiólicos en los tejidos de los vertebrados e invertebrados, con cambios en el cociente *glutathion oxidado/glutathion reducido* (mucho más marcados en las mitocondrias que en el compartimento extramitocondrial), y lesiones oxidativas del mtADN⁴⁰.

Otros antioxidantes tiólicos de composición similar protegen contra la pérdida de rendimiento funcional de ratones de laboratorio, al envejecer⁴¹, así como contra los efectos nocivos del envejecimiento mitocondrial en lo que respecta a los descensos en el cociente GSSG/GSH y lesión oxidativa del mtDNA⁴². Y también hemos observado una preservación de la actividad de los enzimas respiratorios de mitocondrias hepáticas del hígado de ratones que reciben una dieta suplementada con NAC⁴³.

Desde un punto de vista práctico, con respecto a la posible aplicación clínica de la TP y el NAC en el envejecimiento acompañado de un excesivo nivel de estrés oxidativo, es importante que en varias enfermedades degenerativas crónicas se encuentran niveles bajos de GSH en sangre⁴⁴. Por lo tanto, según Chen et al.⁴⁵, "hay considerable justificación para estrategias de intervención terapéutica con objeto de corregir la deficiencia de GSH en tales situaciones." Sin embargo, como el GSH tiene una limitada capacidad para penetrar en las células, su administración no es adecuada para elevar los niveles tisulares de tioles⁴⁵. Por ello conviene utilizar compuestos precursores del GSH o de la cisteína, como son los ésteres de GSH o la mencionada TP, que penetran en las células más fácilmente y por lo tanto son eficaces para elevar los niveles de grupos tiol en los tejidos⁴⁶. Probablemente, así se podrían frenar los efectos del envejecimiento sobre la pérdida de homeostasis y rendimiento funcional de diversos sistemas fisiológicos, sobre todo de los más sensibles al estrés oxidativo que incluyen el sistema circulatorio y el inmunitario.

Other thiolic antioxidants of a similar composition afford protection against the loss of functional performance in ageing laboratory mice, as well as against the harmful effects from mitochondrial ageing, with respect to decreases in the GSSG/GSH quotient and oxidative lesions of mtDNA⁴². We have also observed a preservation of respiratory enzymes in hepatic mitochondria in the liver of mice that had been receiving an NAC supplemented diet⁴³.

From a practical point of view, it is important, with regard to the possible clinical application of TP and NAC in ageing processes that are accompanied by excessive oxidative stress, that in numerous chronic degenerative diseases low levels of GSH in blood are present⁴⁴. Therefore, according to Chen et al.⁴⁵, "there is considerable justification for strategic therapy intervention with the objective of correcting GSH deficiencies in such situations". However, since GSH has a limited cellular penetration capacity, its administration would not be appropriate for the objective of increasing levels of thiol in tissue structures⁴⁵. For this reason, the use of GSH or cysteine precursor compounds would be appropriate, because it is the GSH esters or the previously mentioned TP, that penetrate more easily into the cells, and are therefore efficient at increasing the levels of thiol groups in tissues⁴⁶. In this way, the effects of ageing, with regard to the loss of homeostasis and functional performance of numerous physiological systems, could probably be retarded. This would especially be true in the case of cells that are more sensitive to oxidative stress in the circulatory and immune systems.

ATHEROSCLEROSIS

Oxidative stress

As stated in a recent revision⁴⁷, atherosclerosis is the most prevalent disease in the industrialised world and is fundamentally responsible for ischemic syndromes. This is particularly the case with regard to ischemic cardiopathy, which causes over 40% of all deaths in Western Europe. Furthermore, it is already well known that although atherosclerosis appears in young individuals, it accelerates throughout the ageing process. Consequently, although a high number of atherosclerotic lesions are encountered in indivi-

ATEROSCLEROSIS

Estrés oxidativo

Según se comenta en una reciente revisión⁴⁷, la aterosclerosis es la enfermedad más prevalente en el mundo industrializado, responsable fundamental de los síndromes isquémicos, en particular de la cardiopatía isquémica, y causa de más del 40% de todas las muertes en la Europa occidental. Además, es bien sabido que aunque el proceso de aterosclerosis aparece en sujetos jóvenes, se acelera a lo largo del envejecimiento. Así, aunque se encuentran lesiones ateroscleróticas en una alta proporción de sujetos en la segunda y tercera décadas de la vida, el 80% de los casos de enfermedad clínica cardiovascular aparece a partir de los 65 años. Estos autores⁴⁷ concluyen: "La aterosclerosis es, pues, un fenómeno universal relacionado con el envejecimiento, pero en su génesis no sólo influye éste, sino que también existen unos factores extrínsecos (dieta, ejercicio, etc.) que, sobre una base genética determinada, producen la alteración."

Las investigaciones más recientes apoyan la hipótesis de Harman⁴⁸ de que uno de los principales factores que desencadenan el proceso aterosclerótico es el estrés oxidativo, mientras que los mecanismos antioxidantes tienen un efecto protector contra dicho proceso. Más concretamente, la hipótesis de que el estrés oxidativo crónico, a través de la acción irritante de los peróxidos de lípido sobre la pared arterial y consiguientes procesos inflamatorios, tiene una acción aterogénica es casi generalmente aceptada⁴⁹⁻⁵⁶. Esta hipótesis está de acuerdo con los estudios de Glavind et al.⁵⁷, que muestran una acumulación de peróxidos de lípido en las placas ateroscleróticas de intensidad paralela a la del proceso de degeneración vascular. Más recientemente, Yagi et al.⁵⁸ observaron que la inyección intravenosa de hidroperóxidos de ácido linolénico causa lesiones en la íntima de la aorta de conejo, y Santos et al.⁵⁹ mostraron niveles elevados de peróxido de lípido en el plasma de pacientes que se recuperan de infarto de miocardio o angina pectoris y de sujetos con otros factores de riesgo aterosclerótico, como tabaquismo, estrés psicológico, hipertensión diastólica y edad avanzada.

Según resumen Miquel et al.⁶⁰, los peróxidos de lípido son un importante factor de riesgo de

duals in the second and third decades of life, 80% of clinical cardiovascular disease cases appear in patients of over 65 years of age. These authors⁴⁷ conclude that: "atherosclerosis is therefore a universal phenomenon related to ageing. However, its genesis is not only influenced by ageing, but it is also influenced by extrinsic factors (diet, exercise, etc.) which on a determined genetic basis produce the alterations".

The most recent research supports the Harman hypothesis⁴⁸ that one of the main factors that triggers the atherosclerotic process is oxidative stress, while it is the antioxidant mechanisms which provide a protective effect against such a process. More concretely, the hypothesis that chronic oxidative stress, through lipid peroxide induced arterial wall irritation and the consequent inflammatory processes, has an atherogenic action, is almost generally accepted⁴⁹⁻⁵⁶. This hypothesis is consistent with the studies carried out by Glavind et al.⁵⁷, who demonstrated that an accumulation of lipid peroxides in the atherosclerotic plaques is concurrent with degenerative vascular processes. More recently, Yagi et al.⁵⁸ observed that the intravenous administration of linoleic acid hydroperoxide caused lesions of the aortic intima in rabbits. Santos et al.⁵⁹ showed that high levels of lipid peroxide existed in the plasma of patients recovering from myocardial infarction or angina pectoris, as well as in individuals presenting other atherosclerotic risk factors, such as smokers, elderly patients, and patients presenting psychological stress and diastolic hypertension.

As pointed out by Miquel et al.⁶⁰, lipid peroxides represent an important risk factor in arteriosclerosis, given that these possess a greater negative charge than the native LDL and therefore induce an accumulation of cholesterol esters in monocytes and macrophages. Such a process increases the atherogenic potential of these cells⁶¹. Additionally, O'Keef et al.⁶² commented that LDL susceptibility to oxidation may be as important as cholesterol levels, given that this must undergo an oxidative modification, before acquiring atherogenic action subsequent to being captured by endothelial receptors⁶³⁻⁶⁴. On the other hand, vascular tissue may produce reactive oxygen species (ROS), including the superoxide anion, which alters vascular tone and contributes to atherosclerosis⁶⁵. A further point to take into account is that species of NAD(P)H oxidases have been

arteriosclerosis, puesto que tienen una mayor carga negativa que las LDL nativas y, por tanto, inducen una acumulación de éster de colesterol en los monocitos y macrófagos, aumentando así el potencial aterogénico de estas células⁶¹. Además, comentan O'Keefe et al.⁶² que la susceptibilidad de las LDL a la oxidación puede ser tan importante como los niveles de colesterol, pues éste debe sufrir una modificación oxidativa antes de adquirir una acción aterogénica tras su captación por los receptores endoteliales⁶³⁻⁶⁴. Por otra parte, los tejidos vasculares pueden producir especies reactivas de oxígeno (ROS), incluido el anión superóxido, que alteran el tono vascular y contribuyen a la aterosclerosis⁶⁵. Y además se han identificado NAD(P)H oxidasas que solo se encuentran en las células endoteliales, donde liberan ROS que tienen una acción reguladora del crecimiento celular y también están implicadas en la disfunción endotelial y la inflamación que acompañan la formación de ateromas⁶⁶.

Es también muy importante desde un punto de vista patogénico que, según la revisión de Offerman y Medford⁶⁷, los presentes modelos de aterogénesis ligan el estrés oxidativo de la pared vascular a la reacción del sistema inmunológico, que desencadena un ciclo de inflamación localizada y reacciones de proliferación celular que llevan a la lesión aterosclerótica madura. Así, las LDL oxidadas pueden contribuir a la aterosclerosis aumentando la producción de células espumosas en la pared arterial y estimulando la proliferación de las células del músculo liso, con el consiguiente aumento de espesor de dicha pared y reducción del diámetro de las arterias afectadas⁶⁸. E incluso, las LDL oxidadas podrían aumentar el riesgo de trombosis, a causa del aumento que causan en la agregación y adhesión plaquetaria. En resumen, los presentes estudios indican que la oxidación de las LDL contribuye a la patogénesis de la aterosclerosis, y por lo tanto de los infartos de miocardio y accidentes cerebro vasculares.

Con respecto a los mecanismos implicados, Abizanda Soler y Luengo Márquez⁴⁷ concluyen que la enfermedad aterosclerótica podría estar ligada al hecho de que las LDL atrapadas subendotelialmente están expuestas a un medio prooxidante que contiene radical superóxido, lipooxigenasas producidos por las células de la placa, y metales de transición como el cobre. Esto lleva a una disfunción endotelial, con inducción o

identified that are only found in endothelial cells. These liberate ROS which exercise a regulatory growth function but are also involved in endothelial dysfunction and the inflammation that accompanies the formation of atheromas⁶⁶.

From a pathogenic point of view, it is also very important, according to a revision carried out by Offerman & Medford⁶⁷, that current atherogenesis models associate oxidative stress in the vascular wall with the reaction of the immunological system, which triggers a cycle of localised inflammation and cell proliferation reactions which lead to mature atherosclerotic lesions. Consequently, oxidized LDL may contribute to atherosclerosis by inducing an increased production of foam cells in the arterial wall and stimulating the proliferation of smooth muscle cells. As a result, an increase in the thickness of the wall occurs, thus reducing the diameter of the arteries affected⁶⁸. Oxidized LDL may even increase the risk of thrombosis, due to the increase in the plaque aggregation and adhesion that it causes. In summary, the present studies indicate that LDL oxidation contributes to the pathogenesis of atherosclerosis, and consequently to myocardial infarction and cerebral vascular accidents.

With regard to the mechanisms involved, Abizanda Soler & Luengo Márquez⁴⁷ concluded that atherosclerotic disease could be linked to the fact that LDL trapped in the subendothelial space is exposed to a pro-oxidant medium containing radical superoxide, lipooxigenases produced by plaque cells, and transition metals such as copper. This leads to an endothelial dysfunction, with the induction or suppression of gene expression, changes in motility and cell adherence, attraction and immobilisation of inflammatory cells, the liberation of inflammation mediators, and the proliferation of smooth muscle cells.

Menopause and atherosclerosis With regard to the prevention of atherosclerosis, it is interesting that although in human subjects oxidative stress increases with age (judging from the levels of lipid peroxide in blood; Yagi⁶⁹), the increase in peroxidation is more notable in women than it is in men of the same age. Similarly, according to Miquel et al.⁶⁰, "at the ages of 21-40 years the levels of final products from oxidative stress are slightly lower in women than in men. At the ages 41-60 years they are found to

supresión de la expresión de genes, cambios en la motilidad y adherencia celular, atracción e inmovilización de células inflamatorias, liberación de mediadores de la inflamación y proliferación de las células musculares lisas.

Menopausia y aterosclerosis. Es interesante para la prevención de la aterosclerosis que, aunque con la edad aumenta el estrés oxidativo que sufren los sujetos humanos (a juzgar por los niveles de peróxido de lípido en sangre; Yagi⁶⁹), el aumento de la peroxidación es más marcado en las mujeres que en los hombres de la misma edad. Así según Miquel et al.⁶⁰, "A la edad de 21-40 años, los niveles de los productos finales del estrés oxidativo son ligeramente inferiores en las mujeres que en los hombres, a los 41-60 son aproximadamente iguales en los dos sexos, y a mayor edad, al igual que sucede con la tensión sanguínea y el colesterol, los efectos del envejecimiento sobre la homeostasis de las lipoproteínas séricas son más marcados en las mujeres que en los hombres (...). Unos mecanismos semejantes pueden estar implicados en la pérdida progresiva de protección contra las enfermedades cardiovasculares ligadas a la aterosclerosis, a causa de la falta de estrógenos con la edad y el aparente descenso del equilibrio antioxidante/pro-oxidante en las mujeres, a diferencia de lo que ocurre en los hombres. Nuestros datos sugieren que en los hombres este equilibrio depende de la dieta y de otros factores del estilo de vida, mientras que en las mujeres puede estar estrechamente relacionado con cambios homeostáticos intrínsecos asociados con la edad". Más concretamente, la hipótesis de que este aumento de la peroxidación de lípidos está ligado al déficit de estrógeno, y consiguiente pérdida de protección antioxidante, está de acuerdo con el hecho de que el estradiol muestra un potente efecto protector contra la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) *in vitro* e *in vivo* (Arteaga et al.⁷⁰). Además, "durante la menopausia, el aumento del estrés oxidativo de origen plasmático influye en la degeneración ateromatosa de la aorta" (Signorelli et al.⁷¹). Por ello Subbiah⁷² concluye que, "aunque los efectos beneficiosos de los estrógenos para la prevención primaria de la enfermedad coronaria se atribuían a la disminución de las LDL y al aumento de las HDL, los estudios recientes han demostrado que los estrógenos protegen contra el estrés oxidativo y disminuyen la oxidación de las LDL".

an approximately equal extent. In the elderly, as also occurs with blood pressure and cholesterol, the effects of ageing on the homeostasis of the serum lipoproteins are more marked in women than in men (...). Similar mechanisms may be involved in the progressive loss of protection against atherosclerosis related cardiovascular diseases, due to the lack of estrogens associated with ageing and the apparent decrease in antioxidant/pro-oxidant balance in women, in contrast to that occurring in men. Our data suggests that equilibrium in men depends on diet and other lifestyle factors, while in women it may be closely related to intrinsic homeostatic changes associated with age". More concretely, the hypothesis that this increase in lipid peroxidation is related to an estrogen deficit and the consequent loss of antioxidant protection, is consistent with the fact that estradiol presents a potent protective effect against low density lipoprotein oxidation (LDL) in *in vitro* and *in vivo* trials (Arteaga et al.⁷⁰). Furthermore, "during menopause, the increase in oxidative stress of plasmatic origin has an influence to bear in the atheromatous degeneration of the aorta" (Signorelli et al.⁷¹). For this reason Subbiah⁷² concludes that "although the beneficial effects of estrogens in the primary prevention of coronary disease are attributed to a decrease in LDL and to an increase in HDL, recent studies have demonstrated that estrogens afford protection against oxidative stress and decrease the oxidation of LDL".

From the points mentioned above, the effects of antioxidant supplements in the diet of menopausal women would constitute an appropriate subject for further research. Additionally, the administration of antioxidants in menopausal women would also find justification in a study that shows that in women of an average age of 52 years, those that have higher plasmatic levels of the biomarker of lipid peroxidation, also present a greater atheromatous degeneration of the common carotid artery wall⁷¹.

Antioxidant protection

According to a revision by Meydani⁷³, numerous studies have demonstrated an inverse relationship between the consumption of fruit and vegetables rich in antioxidants and the risk of morbidity and mortality through cardiovascular

De acuerdo con lo anterior, convendría investigar los efectos de la suplementación de la dieta de las mujeres menopáusicas con antioxidantes. Además, la administración de antioxidantes a las menopáusicas también podría encontrar justificación en un estudio que muestra que, en mujeres de una edad media de 52 años, las que tienen unos niveles plasmáticos más altos del biomarcador de peroxidación de lípidos *malondialdehído* también muestran una mayor degeneración ateromatosa de la pared de la arteria carótida común⁷¹.

Protección antioxidante

Según la revisión de Meydani⁷³, varios estudios muestran una relación inversa entre el consumo de frutas y verduras ricas en antioxidantes y el riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares. En sus palabras: "El conjunto de la evidencia de varios estudios epidemiológicos y ensayos clínicos indica que la ingesta de las vitaminas C y E a dosis mayores que las dosis recomendadas puede disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular." También comenta Meydani que este efecto beneficioso de las vitaminas antioxidantes probablemente se debe a su acción protectora contra la formación de radicales libres, agregación plaquetaria, síntesis excesiva de citoquinas pro-inflamatorias y oxidación de las LDL.

De acuerdo con lo anterior, evitar deficiencias de la dieta en vitaminas antioxidantes parece esencial para proteger contra el efecto aterogénico de los peróxidos de lípido⁷⁴, cuyos niveles sanguíneos aumentan con la edad^{60,69}. Por otra parte, también pueden ser útiles otros compuestos antioxidantes, de acuerdo con la observación de Goudev et al.⁷⁵ de que la suplementación de la dieta con una combinación de "antioxidantes naturales" disminuye la concentración sérica de las moléculas de adhesión de origen endotelial (que son también marcadores de inflamación) en mujeres postmenopáusicas, disminuyendo así su riesgo cardiovascular.

También se puede justificar la administración de los compuestos fenólicos liposolubles de *Curcuma longa*⁷⁶ en los tratamientos anti-arterioescleróticos, pues, debido a su probable acción "co-antioxidante"⁷⁷, pueden proteger contra la peroxidación excesiva de los lípidos de la san-

diseases. In their own words: "the overall evidence from the numerous epidemiological studies and clinical tests indicate that the intake of vitamins C and E at higher dosages than those recommended may decrease the risk of cardiovascular disease". Meydani also commented that the beneficial effects of antioxidant vitamins are probably attributable to their protective action against the formation of free radicals, plaque aggregation, excessive synthesis of proinflammatory cytokines and LDL oxidation.

With all such factors taken into account, avoiding dietary deficiencies of antioxidant vitamins appears to be essential in the prevention of the atherogenic effects of lipid peroxides⁷⁴, whose levels in the blood stream increase with age^{60,69}. On the other hand, other antioxidant compounds may also be of value. According to observations made by Goudev et al.⁷⁵ diet supplements with a combination of "natural antioxidants" decrease the serum concentration of adhesion molecules of endothelial origin (these are also inflammation markers) in postmenopausal women, and consequently also decrease the risk of cardiovascular disorders.

The administration of liposoluble phenolic compounds from *Curcuma longa*⁷⁶ in anti-arteriosclerotic treatments can also be justified, due to a probable "co-antioxidant action"⁷⁷, which may afford protection against excessive lipid peroxidation in blood. Similarly, the antioxidant effect of vitamin E, enhanced by curcuma phenolic compounds, could afford more efficient protection against atherosclerosis than antioxidant dietary supplements with Vitamin E only⁷⁸. With this possibility taken into account, we investigated the effects of a hydroalcoholic extract (ZCL4) from *Curcuma longa* rich in phenolic antioxidants. Among the results obtained, the most significant finding was that the oral administration in laboratory animals and human subjects brought about a decrease in levels of lipid peroxide in the blood of mice⁷⁹ and in healthy men and women that had abnormally high values of these peroxides, before the start of the treatment⁸⁰. The administration of the extract also decreased the oxidised concentrations of HDL and LDL in the serum of women aged between 40 and 90 years, in which no toxic effect upon hepatic or renal function was observed⁸¹. Additionally, the extract was found to afford protection against oxida-

gre. Así el efecto antioxidante de la vitamina E, potenciado por el de los compuestos fenólicos de la cúrcuma, podría tener mayor eficacia para proteger contra la aterosclerosis que la suplementación antioxidante de la dieta sólo con vitamina E⁷⁸. De acuerdo con lo anterior, hemos investigado los efectos de un extracto hidroalcohólico (ZCL4) de *Curcuma longa* de alto contenido en antioxidantes fenólicos. De entre los resultados de su administración oral a animales de laboratorio y sujetos humanos destaca el descenso de los niveles de peróxido de lípido en sangre de ratón⁷⁹ y de hombres y mujeres sanos que tenían valores anormalmente elevados de estos peróxidos antes de iniciarse el tratamiento⁸⁰. La administración del extracto también disminuye las concentraciones de HDL y LDL oxidadas en el suero de mujeres de edad comprendida entre los 40 y 90 años sin ningún efecto tóxico sobre la función hepática o renal⁸¹, y protege contra la oxidación a las LDL séricas de conejos con aterosclerosis experimental⁸².

La complementación del tratamiento farmacológico anti-aterosclerótico con la administración de antioxidantes en la dieta estaría particularmente indicada en la menopausia y post-menopausia, pues como ya hemos señalado, la aterosclerosis se acelera en las mujeres a partir de la pérdida de protección antioxidante ligada a la deficiencia de estrógeno^{72,73}.

DISFUNCIÓN DEL SISTEMA INMUNITARIO

Estrés oxidativo

Según la revisión de De la Fuente y Víctor⁸³, el sistema inmunitario (S.I.) es una diana esencial del estrés oxidativo, pues la función de algunas de sus células, como la actividad microbicida de los linfocitos y la linfoproliferación inducida por los mitógenos, están ligadas a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que como "efecto secundario" pueden alterar la competencia de dicho sistema debido a las reacciones oxidativas no programadas con los ácidos nucleicos, los lípidos de las membranas, las proteínas y los carbohidratos.

Los efectos nocivos del estrés oxidativo han sido demostrados en poblaciones envejecidas de células inmunitarias en las que la exposición a

tion in serum LDL in rabbits with experimental atherosclerosis⁸².

The administration of antioxidants, as a supplement in anti-atherosclerotic treatments, in the diet of menopausal and post-menopausal women would be particularly indicated, given that atherosclerosis in women accelerates on commencement of the loss of the antioxidant protection associated with estrogenic deficiency^{72,73}.

DYSFUNCTION OF THE IMMUNE SYSTEM

Oxidative stress

According to a revision by De la Fuente & Víctor⁸³, the immune system is a primary target for oxidative stress. The function of some immune system cells, such as the microbicidal activity of the lymphocytes and the proliferation of lymphocytes induced by the mytogens are associated with the production of reactive oxygen species (ROS), which as a "side effect" may alter the competence of the system. This is attributable to non-programmed oxidative reactions with nucleic acids, membrane lipids, proteins and carbohydrates.

The harmful effects of oxidative stress have been demonstrated in ageing populations of immune system cells, in which exposure to such stress was observed to bring about a decrease in proliferation, IL-2 synthesis and the activation of nuclear transcription factors⁸⁴. Given that these same alterations take place in normally ageing T cells, the data suggest that oxidative stress and the normal ageing of these cells share the same pathogenic mechanisms.

In another type of immune system cell, the activated human neutrophil, ageing is accompanied by an accumulation of hydrogen peroxide, which is linked to a decrease in the detoxifying enzyme glutathione peroxidase. This offers convincing evidence that human ageing processes are accompanied by an alteration in the defence mechanism against oxidative lesions and that this deficiency takes place *in vivo*⁸⁵.

On the other hand, studies on neutrophil apoptosis in human subjects confirm that in ageing processes, these cells are subject to a high degree of oxidative stress, probably due to an increase in intracellular concentrations of H₂O₂ and

dicho estrés causa un descenso de la proliferación, de la síntesis de IL-2 y de la activación de factores de transcripción nuclear⁸⁴. Puesto que estas mismas alteraciones tienen lugar en células T que envejecen normalmente, los datos sugieren que el estrés oxidativo y el envejecimiento normal de estas células comparten mecanismos patogénicos.

En otro tipo de célula del S.I., el neutrófilo humano activado, el envejecimiento se acompaña de una acumulación de peróxido de hidrógeno, ligada a un descenso en la actividad del enzima detoxificador glutatión peroxidasa, lo que "ofrece evidencia convincente de que en los sujetos humanos se produce, al envejecer, una alteración de los mecanismos de defensa contra las lesiones oxidativas, y de que esta deficiencia tiene lugar *in vivo*"⁸⁵.

Por otra parte, los estudios sobre apoptosis de los neutrófilos de sujetos humanos confirman el alto nivel de estrés oxidativo que sufren estas células al envejecer, probablemente a causa de un aumento en la concentración intracelular de H₂O₂ y deficiencia en enzimas antioxidantes⁸⁶. Estas alteraciones homeostáticas ligadas al envejecimiento tienen graves consecuencias funcionales, pues el equilibrio entre la generación de ROS y la capacidad reductora del citoplasma de los granulocitos activados es esencial para la preservación de una función óptima de estas células⁸⁷, y cuando se pierde este equilibrio el estallido respiratorio de los neutrófilos puede resultar muy dañino para los tejidos del organismo huésped. Por ello, la activación incontrolada del S.I., con la consiguiente producción excesiva de ROS tan tóxicas como son el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, puede contribuir a la patogénesis de la artritis reumatoide y de otros síndromes inflamatorios y autoinmunes²¹.

También conviene recordar que el estrés oxidativo ligado a la disfunción del S.I. puede ser carcinogénico, pues las ROS que liberan los neutrófilos pueden causar mutaciones del genoma nuclear en los tejidos que sufren una inflamación crónica.

En conclusión, los efectos de los radicales libres de oxígeno sobre el S.I. pueden ser incompatibles con el mantenimiento de la homeostasis y la salud en los sujetos ancianos. En efecto, según comenta De la Fuente⁸⁸: "Una consecuencia de los cambios que con la edad establece el estrés oxidativo en las células inmunitarias sería

a deficiencia en antioxidantes⁸⁶. These age associated homeostatic alterations have serious functional consequences, given that the equilibrium between ROS generation and the reduction capacity in the cytoplasm of activated granulocytes is essential for the preservation of optimal functioning of these cells⁸⁷. When such an equilibrium has been lost, the neutrophil respiratory burst may be highly damaging to the host organism's tissues. Consequently, the uncontrolled activation of the immune system, with the ensuing excessive production of ROS, equally as toxic as the superoxide radical and hydrogen peroxide, may contribute to the pathogenesis of rheumatoid arthritis and other inflammatory and autoimmune syndromes²¹.

It should also be taken into account that oxidative stress associated with immune system dysfunction may be carcinogenic, given that ROS liberate neutrophils, which may cause mutations in the nuclear genome of the tissues in which chronic inflammation takes place.

In conclusion, the effects of oxygen free radicals on the immune system may be incompatible with the maintenance of homeostasis and health in elderly patients. In effect, as stated by De la Fuente⁸⁸: "a consequence of the changes caused by the oxidative stress in the immune cells with age, would be an alteration in intracellular signalling, resulting in inadequate responses to the stimuli that reach them".

Antioxidant protection

According to a recent revision⁸⁹, "the ideal physiological system in the study of the beneficial effect of antioxidants has been and is still the immune system. The immune system, an indicator of health and a predictor of an individual's longevity, deteriorates with age, as a consequence of oxidation (..), but improves significantly with antioxidant supplementation". On the other hand, antioxidant deficient diets may intensify immune system dysfunction. An adequate consumption of micro-nutrients, that include antioxidant compounds, is essential in order to preserve system functionality throughout maturity and old age.

As mentioned previously, the fact that high levels of hydrogen peroxide accumulate in neutrophils in healthy elderly persons⁸⁵ supports the

una señalización intracelular alterada en las mismas, lo que las puede hacer responder de forma inadecuada a los estímulos que les llegan. Así, al envejecer, y teniendo como base el estrés oxidativo, no sólo se altera la respuesta del sistema nervioso, la del endocrino y la del inmunitario, sino también la capacidad de comunicación entre ellos, lo que conduce al fallo homeostático que conlleva el aumento en morbilidad y mortalidad que tiene lugar con la edad".

Protección antioxidante

Según una reciente revisión⁸⁹. "Un sistema fisiológico idóneo para el estudio del efecto beneficioso de los antioxidantes ha sido y está siendo el sistema inmunitario. Este sistema, indicador de la salud y predictor de la longevidad del individuo, se va deteriorando al envejecer como consecuencia de la oxidación (...) y mejora significativamente con la suplementación con antioxidantes." Por otra parte, dietas deficientes pueden agravar la disfunción del S.I. ligada al envejecimiento, mientras que un consumo adecuado de micronutrientes, incluidos los compuestos antioxidantes, es esencial para preservar las funciones de dicho sistema en la madurez y en la ancianidad.

El hecho antes mencionado de que se acumulen niveles altos de peróxido de hidrógeno en los neutrófilos de personas mayores sanas⁸⁵ apoya la hipótesis de que efectivamente se alteran con la edad los mecanismos de defensa antioxidante de las células del S.I. y justifica los estudios para aclarar el papel que tienen en la preservación de la inmunidad los diversos antioxidantes de la dieta.

De acuerdo con lo anterior, Meydani⁷³ señala que una ingesta insuficiente de vitamina E causa alteraciones de la membrana de las células del S.I. y aumenta la producción de inmunosupresores, como son las prostaglandinas. Según este autor, "Hay evidencia convincente de que la administración de antioxidantes de la dieta como la vitamina E aumenta la respuesta inmunitaria en los ancianos y puede proteger contra las infecciones, con la consiguiente mejora de la calidad de vida." También se ha observado que la ingestión de suplementos de vitaminas C y E mejora la función del S.I. de mujeres ancianas⁹⁰.

hypothesis that with age, immune system antioxidant defence mechanisms are actually altered. This justifies research aimed at elucidating the role that the numerous antioxidants in the diet may have in the preservation of immunity.

Accordingly, Meydani⁷³ indicates that an insufficient vitamin E intake causes alterations in the membranes of the immune system cells and increases the production of immunosuppressors, such as the prostaglandins. This author claims that "there is convincing evidence that the administration of antioxidants in the diet, such as vitamin E, increases the immune response in the elderly and may protect against infections, thus resulting in an improvement in the subject's quality of life". The intake of vitamin C & E supplements has also been observed to improve immune system function in elderly women⁹⁰.

As has already been discussed in detail in previous revisions and experimental studies⁹¹⁻⁹⁴, thiolic antioxidants have been demonstrated to be highly efficient in the protection of immune system function, which is highly sensitive to the modulating function of the reduced thiol/oxidated thiol quotient⁸³. For this reason, it is hardly surprising that the previously mentioned thiolic antioxidants (TP & NAC) have a beneficial effect on the ageing of immune functions in laboratory mice⁹²⁻⁹⁵. A better understanding of the normalising mechanisms that these antioxidants have on immune system function is of great interest. According to studies revised by De la Fuente & Victor⁸³, vitamin E and NAC not only normalise antioxidant defence/oxidative stress equilibrium, but also demonstrate anti-inflammatory action.

Due to its possible relevance with regard to future clinical applications, the fact that the beneficial effects of TP are more evident in immunodepression models in prematurely aged mice, through high anxiety levels, than in control mice of the same age, which have aged normally⁹³, is also of importance. Given that immune dysfunction contributes very significantly to morbidity and mortality in elderly persons, the fact that at only five weeks after administering TP, immune system functions were greatly improved in mice⁹³ is significant, and could provide the justification for clinical studies to test the immune stimulating properties of this thiolic compound in human subjects. In such a way, an assessment could be carried out of the usefulness of TP diet su-

Como se comenta detalladamente en revisiones y estudios experimentales anteriores⁹¹⁻⁹⁴, los antioxidantes tiólicos han demostrado gran eficacia para proteger las funciones del sistema inmunitario, que es muy sensible tanto al estrés oxidativo ligado al envejecimiento como a la función moduladora del cociente tiol reducido/tiol oxidado⁸³. Por ello no puede sorprender que muestren una acción beneficiosa los dos antioxidantes tiólicos ya mencionados (la TP y la NAC) sobre el envejecimiento de las funciones inmunitarias del ratón de laboratorio⁹²⁻⁹⁵. Es interesante para comprender mejor los mecanismos normalizadores de estos antioxidantes sobre la función del S.I. que, según los trabajos revisados por De la Fuente y Victor⁸³ la vitamina E y la NAC no sólo normalizan el equilibrio defensa antioxidante/estrés oxidativo sino que muestran también una acción anti-inflamatoria.

También es importante, por su posible relevancia para futuras aplicaciones clínicas de los antioxidantes tiólicos, que los efectos beneficiosos de la TP son más evidentes en un modelo de inmunodepresión en ratones que envejecen prematuramente, a causa de sus altos niveles de ansiedad, que en los ratones control de la misma edad que envejecen normalmente⁹³. Puesto que las disfunciones inmunitarias contribuyen muy significativamente a la morbilidad y mortalidad de las personas mayores, el hecho de que tras sólo 5 semanas de administrar TP a los ratones ya mejoraban muy eficazmente las funciones del S.I.⁹³ podría justificar estudios clínicos para poner a prueba la eficacia inmuno-estimulante de dicho compuesto tiólico. Así se podría valorar la utilidad de la suplementación de la dieta con TP para proteger contra el envejecimiento no óptimo del S.I. que probablemente sufren los sujetos cuyos análisis de plasma sanguíneo muestran niveles altos de peróxidos de lípido, con el consiguiente estrés oxidativo^{92,96}.

CONCLUSIONES

Los conceptos sobre el papel clave que tienen en el envejecimiento los radicales libres y el estrés oxidativo encuentran una aceptación casi general entre los gerontólogos experimentales y otros científicos interesados en los mecanismos moleculares del envejecimiento. Por ello también se acepta que la dieta debe tener un nivel

de suplementos en la protección contra el envejecimiento no óptimo del sistema inmunitario, en sujetos cuyo plasma sanguíneo muestra altos niveles de peróxidos de lípido, y el consiguiente estrés oxidativo^{92,96}, que probablemente sufren.

CONCLUSIONS

Apparently, the key concepts involved in the relationship between ageing, free radicals and oxidative stress are almost generally accepted by both gerontologists and other scientists interested in the molecular mechanisms of ageing. It has also been accepted that the diet should contain an appropriate level of antioxidants to protect against the pathogenic effects of oxygen free radicals, and to obtain a greater "functional longevity", together with the preservation of health. Even with optimal diets, a loss of oxidant/antioxidant equilibrium takes place throughout ageing, leading to chronic oxidative stress, which has a pathogenic role in both normal ageing and in many other degenerative processes. The incidence of such processes increases with age, representing a threat to the health of the elderly, from conditions such as atherosclerosis and immune dysfunction. These concepts provide the justification for further research aimed at testing the hypothesis that the dietary supplementation of hydro soluble antioxidants such as thioproline and N-acetylcysteine (which have been demonstrated to be effective in the delay of pathological ageing in laboratory animals) may help to prevent pathological ageing in human subjects, who due to factors concerning genetic inheritance or lifestyle suffer from high levels of oxidative stress. Both of these compounds, which stand out for their immune modulating action and mitochondrial protection, could be useful as dietary supplements (reduced thiolic amino acid precursors), in order to prevent or retard pathological processes associated with excessive levels of such stress occurring in disorders such as atherosclerosis and immune dysfunction.

On the other hand, the liposoluble "co-antioxidants" from curcumin may also help prevent the pathological processes mentioned, thanks to the protection that they afford against the oxidation of sub-cellular membranes rich in polyunsaturated fatty-acids.

adecuado de antioxidantes para proteger contra los efectos patogénicos de los radicales libres de oxígeno y conseguir una mayor "longevidad funcional", con preservación de la salud. Incluso con una dieta óptima, al envejecer se pierde el equilibrio antioxidantes/oxidantes, lo cual lleva a un estrés oxidativo crónico que tiene un papel patogénico tanto en el envejecimiento normal como en muchos procesos degenerativos cuya incidencia aumenta con la edad, entre los que destacan, por la amenaza que suponen para la preservación de la salud de las personas mayores, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria. Esto justifica la realización de estudios para poner a prueba la hipótesis de que la suplementación de la dieta con antioxidantes hidrosolubles como la *tioprolina* y la *N-acetilcisteína* (que han mostrado eficacia para retrasar el envejecimiento de animales de laboratorio) puede ayudar a prevenir el envejecimiento patológico de los sujetos humanos que por su herencia genética o estilo de vida sufren altos niveles de estrés oxidativo. Estos dos compuestos, que destacan por su acción inmunomoduladora y protectora mitocondrial, podrían ser útiles como suplementos dietéticos (precursores de aminoácidos tiólicos reducidos), para prevenir o frenar los procesos patológicos ligados a niveles excesivos de dicho estrés, como son la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria.

Por otra parte, los "*co-antioxidantes*" liposolubles de la *curcuma* también podrían ayudar a prevenir los mencionados procesos patológicos gracias a su acción protectora contra la oxidación de las membranas subcelulares ricas en ácidos grasos poli-insaturados.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Miquel J. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. En: Miquel J, Quintanilha AT, Weber H. (Eds): CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants, vol.1. Boca Raton, FL: CRC Press; 1989. p. 3-13.
2. Bert P. Barometric Pressure: Researches in Experimental Physiology, 1878, translated by Hitchcock MA y Hitchcock FA. Columbus: College Book Co; 1943.
3. Bean JW. Effects of oxygen at increased pressure. *Physiol Rev* 1945; 25: 1-4.
4. Bean JW. General effects of oxygen at high tension. En: Dickens F, Neil E (Eds): *Oxygen in the Animal Organism*. New York: Pergamon Press; 1964. p. 455-461.
5. Raab O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z Biol* 1900; 39: 524-527.
6. Mulliken RS. Interpretation of the atmospheric absorption bands of oxygen. *Physiol Rev* 1929; 32: 880-883.
7. Michaelis L. Fundamental principles in oxido-reductions. *Biol Bull* 1949; 92: 2939-2941.
8. Gutteridge JMC, Westermarck T, Halliwell B. Oxygen radical damage in biological systems. En: Johnson JE Jr, Walford R, Harman D, Miquel J (Eds). *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*. New York: Alan R Liss; 1986. p.99-135.
9. Singh A. Chemical and biochemical aspects of activated oxygen: singlet oxygen, superoxide anion, and related species. En: Miquel J, Quintanilha AT, Weber H (Eds): *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants*, vol 1. Boca Raton, FL: CRC Press; 1989. p.17-28.

10. Nohl H, Hegner D. Do mitochondria produce oxygen radicals in vitro? *Eur J Biochem* 1978; 82: 563-567.
11. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
12. Sato R, Omura T. Cytochrome P-450. New York: Academic Press; 1978.
13. Allen RC, Yevich SJ, Orth RW, Steele RH. The superoxide anion and singlet molecular oxygen, their role in the microbicidal activity of the polymorphonuclear leucocyte. *Biochem Biophys Res Comm* 1974; 60: 909-917.
14. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med* 1980; 93: 480-487.
15. Porter NN. Prostaglandin endoperoxides. En: Pryor WA (Ed): *Free Radicals in Biology*, vol 4. New York: Academic Press; 1986. p. 261-267.
16. Dam H, Granados GH. Peroxidation of body fat in vitamin E deficiency. *Acta Physiol Scand*. 1945; 10: 162-167.
17. Glavind J, Hartmann S, Clemmensen J, Jensen KE, Dam H. Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the arteriosclerotic aorta. *Acta Pathol Microb Scand* 1952; 30: 1-7.
18. Dubouloz F, Dumas J. Sur le metabolisme des peroxydes lipidiques dans le peau au cours des processus "inflammatoires". *Bull Soc Chem Biol* 1954; 36: 983-986.
19. Dubouloz F, Dumas J. Sur le rôle des peroxydes dans la genèse des lésions produites par les radiations. *J Radiol Electrol* 1955; 36: 343-350.
20. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-7.
21. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Cambridge: Clarendon Press; 1985.
22. Mukai FH, Goldstein BD. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science* 1976; 191: 868-871.
23. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 1983; 221: 1256-1258.
24. Miquel J, Economos AC, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980; 15: 575-591.
25. Miquel J, Fleming JE. Theoretical and experimental support for an oxygen radical-mitochondrial damage hypothesis of cell aging. En: Johnson JE Jr., Harman D., Walford R., Miquel J. (Eds). *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*. New York: Alan R Liss; 1986. p. 51-74.
26. Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 1998; 23: 113-126.
27. Miquel J. Envejecimiento celular y molecular: teorías del envejecimiento. En: Guillén F, Ruipérez I (Eds). *Manual de Geriátría*, 3ª edición. Barcelona: Masson; 2002. p.29-42.
28. Miquel J. Estrés oxidativo en el envejecimiento y enfermedades degenerativas ligadas a la edad. *Geriatrka* 1996; 12: 345-350.
29. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
30. Harman D. The aging process. *Proc Nat Acad Sci USA* 1981; 78: 7124-7128.
31. Gerschman R. Historical introduction to the "Free radical theory of oxygen toxicity." En: Gilbert DL (Ed). *Oxygen and Living Processes: An Interdisciplinary Approach*. New York: Springer Verlag; 1981. p. 44-46.
32. Vijg J, Müller WEG. The science of aging and the need for a mechanistic approach. *Mech Ageing Dev* 2000; 114: 1-3.
33. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem* 1986; 25: 1058-1071.
34. Williams GC. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evol-ution* 1957; 2: 398-411.
35. Miquel J, Weber H. Aging and increased oxidation of the sulfur pool. En: Viña J (Ed). *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1990. p.187-192.
36. Dansette PM, Sassi A, Deschamps C. Sulfur containing compounds as antioxidants. En: *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine*. Emerit I, Packer L, Auclair C (Eds). New York: Plenum Press; 1990. p. 209-215.
37. Miquel J, Blasco M. A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. *Exp Gerontol* 1978; 13: 389-396.
38. Miquel J, Economos AC, Johnson JE Jr. A systems analysis-thermodynamic view of cellular and organismic aging. En: Johnson JE Jr (Ed): *Aging and Cell Structure*, vol 2. Nueva York: Plenum Press; 1984. p. 247-380.
39. Viña JR, Sáez GT, Viña J. The physiological functions of glutathione. En: Miquel J, Quintanilha AT, Weber H (Eds): *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants*, vol. 2. Boca Raton, FL: CRC Press; 1989. p.121-132.
40. García de la Asunción J, Millán A, Pla R, Bruseghini I, Esteras A, Pallardó FV et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 1996; 10: 333-338.
41. Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Viña J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Rad Res* 2000; 32: 189-198.
42. Pallardó EV, Asensi MJ, García de la Asunción J et al. Late onset administration of oral antioxidants prevents age-related loss of motor coordination and brain mitochondrial DNA damage. *Free Rad Res* 1998; 29: 617-623.
43. Miquel J, Ferrandiz ML, De Juan E, Sevilla I, Martínez M. N-acetylcysteine protects against age-related decline of oxidative phosphorylation in liver mitochondria. *Eur J Pharmacol Env Toxicol*. 1995; 292: 333-335.
44. Harding JJ, Blakytyni R, Ganea E. Glutathione in disease. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 881-884.
45. Chen TS, Richie JP Jr, Nagasawa HT, Lang CA. Glutathione monoethyl ester protects against glutathione deficiencies due to aging and to acetaminophen in mice. *Mech Ageing Dev* 2000; 120: 127-139.
46. Nagasawa HT, Goon DJW, Muldoon WP, Zera RT. 2-Substituted thiazolidine-4(R)-carboxylic acids as prodrugs of L-cysteine. Protection of mice against acetaminophen hepatotoxicity. *J Med Chem* 1984; 27: 591-596.
47. Abizanda Soler P, Luengo Márquez C. Arteriosclerosis, dislipemias, aneurismas, patología vascular periférica. En: F Guillén Lera, I Ruipérez Cantera. *Manual de Geriátría*, 3ª Ed. Barcelona: Masson; 2002. p. 317-328.
48. Harman D. Atherosclerosis: oxidation of serum proteins and its relationship to pathogenesis. *Clin Res* 1960; 8: 108.

49. Kita T, Yokode M, Ishi K, Kume N, Nagano Y, Arai H et al. The role of oxidized lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992 ; 19(Suppl 20): 37-42.
50. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; 91(3A): 7A-11A.
51. Sakurai K, Sawamura T. Stress and vascular responses: endothelial dysfunction via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: close relationships with oxidative stress. *J Pharmacol Sci* 2003; 91: 182-186.
52. Upston JM, Kritharides L, Stocker R. The role of vitamin E in atherosclerosis. *Progr Lipid Res* 2003; 42:405-422.
53. Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Statins and oxidative stress during atherogenesis. *J Cardiovasc Dis* 2003; 10: 181-190.
54. Kouoh F, Gressier B, Dine T, Luyckx M, Brunet C, Ballester L, et al. Antioxidant effects and anti-elastase activity of the calcium antagonist nifedipine on activated human and rabbit neutrophils- a potential antiatherosclerotic property of calcium antagonists? *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16: 515-520.
55. Tamura K, Kato Y, Ishikawa A, Kato Y, Himori M, Yoshida M, et al. Design and synthesis of 4,6-Di-tert-butyl-2,3-dihydro-5-benzofuranols as a novel series of antiatherogenic antioxidants. *J Med Chem* 2003; 46: 3083-3093.
56. Meng CQ. BO-653. *Chugai. Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4: 342-346.
57. Glavind J, Hartmann S, Clemensen J, Jessen KE, Dam H. Studies on the role of lipid peroxide in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aortas. *Acta Pathol Microbio Scand* 1952; 30: 1-17.
58. Yagi K, Ohkawa H, Ohishi N, Yamashita M, Nakashima T. Lesions of aortic intima caused by intravenous administration of linoleic acid hydroperoxide. *J Appl Biochem* 1981; 3: 58-61.
59. Santos MT, Valles J, Aznar J. Plasma lipid peroxides in patients with vascular disease and in middle-aged normal subjects with a high risk of atherosclerosis. En: Miquel J, Quintanilha AT, Weber H (Eds). *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants*, vol 1. Boca Raton, FL; CRC Press ;1989. p. 237-254.
60. Miquel J, Ramírez-Boscá A, Soler A, Díez A, Carrión-Gutiérrez MA, Díaz-Alperi J, Quintanilla-Ripoll E, Bernd A, Quintanilla-Almagro E. Increase with age of serum lipid peroxides: implications for the prevention of atherosclerosis. *Mech Ageing Dev* 1998; 100: 17-24.
61. Jialal I, Devaraj S, Kaul N. The effect of alpha-tocopherol on monocyte proatherogenic activity. *Am J Clin Nutr* 2001; 131: 389S-394S.
62. O'Keefe JH, Lavie CJ, McCallister BD. Insights into the pathogenesis and prevention of coronary artery diseases. *Mayo Clin Proc* 1995; 70: 69-79.
63. Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS, Edward PA. The metabolism of native and malonaldehyde-altered low density by human monocyte-macrophages. *J Lip Res* 1981; 22: 63-67.
64. Nagase M, Ando K, Nagase T, Kaname S, Sawamura T, Fujita T. Redox-sensitive regulation of lox-1 gene expression in vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 720-725.
65. Yokoyama M, Inoue N, Kawashima S. Role of the vascular NADH/NADPH oxidase system in atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 2000; 902: 241-247.
66. Sorescu D, Szocs K, Griendling KK. NAD(P)H oxidases and their relevance to atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 124-131.
67. Offerman MK, Medford RM. Antioxidants and atherosclerosis, a molecular perspective. *Heart Dis Stroke* 1994; 3: 52-57.
68. Holvoet P, Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J* 1994; 8: 1279-1284.
69. Yagi K. Serum lipid peroxides in subjects having certain diseases and aging. En: Miquel J, Quintanilha AT, Weber H (Eds). *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants*, vol 1. Boca Raton, FL; CRC Press; 1989. p. 223-230.
70. Arteaga E, Rojas A, Villaseca P, Bianchi M, Arteaga A, Durán D. In vitro effect of estradiol, progesterone, testosterone, and of combined estradiol/progestins on low density lipoprotein (LDL) oxidation in postmenopausal women. *Menopause* 1998; 6: 16-23.
71. Signorelli SS, Neri S, Sciacchitano S, Di Pino L, Costa MP, Pennisi G, Ierna D, Caschetto S. Duration of menopause and behavior of malondialdehyde, lipids, lipoproteins and carotid wall artery intima-media thickness. *Maturitas* 2001; 39: 39-42.
72. Subbiah MT. Estrogen replacement therapy and cardioprotection: mechanisms and controversies. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35: 271-276.
73. Meydani D. Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction. *Mech Ageing Dev* 1999; 11: 123-132.
74. Jialal I, Vega GL, Grundig SM. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1990; 82: 185-191.
75. Goudev A, Kyurkchiev S, Gergova V, Karshelova E, Geeorgiev D, Atar D, Kehayov I, Nachev C. Reduced concentration of soluble adhesion molecules after antioxidants supplementation in postmenopausal women with high cardiovascular risk profiles-a randomised double blind study. *Cardiology* 2000; 94: 227-232.
76. Mesa MD, Ramírez-Tortosa MC, Aguilera CM, Ramírez-Boscá A, Gil A. Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los curcuminoides. *Ars Pharmaceutica* 2003; 41: 307-321.
77. Witting PK, Petterson K, Östlund-Lindqvist A-M. et al. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *FASEB J* 1999; 13: 667-675.
78. Meagher Treatment of atherosclerosis in the new millennium: is there a role for vitamin E? *Prev Cardiol* 2003; 6: 85-90.

79. Miquel J, Martínez, M. Díez, A, De Juan. E, Soler A, Ramírez, A, Laborda J, Carrión M. Effects of turmeric on blood and liver lipoperoxide levels of mice: lack of toxicity. *Age* 1995; 18: 171-174.
80. Ramírez-Boscá A, Carrión-Gutiérrez MA, Laborda Alvarez J, Quintanilla- Almagro E. Antioxidant curcuma extracts decrease the blood lipid peroxide levels of human subjects. *Age* 1995; 18: 167-169.
81. Ramírez-Boscá A, Carrión-Gutiérrez MA, Soler A, Puerta C, Díez A, Quintanilla E, Bernd A, Miquel J. Effects of the antioxidant turmeric on lipoprotein peroxides: implications for the prevention of atherosclerosis. *Age* 1997; 20: 165-168.
82. Ramírez-Tortosa MC, Mesa MD, Aguilera MC, Quiles L, Baro L, Ramírez- Tortosa CL, Martínez-Victoria C, Gil A. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999; 147: 371-378.
83. De la Fuente M, Victor VM. Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 49-54.
84. Suthantiran M, Anderson ME, Sharma UK, Meister A. Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via CD2 and CD3 antigens. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 1990; 87: 3343-3347.
85. Ito Y, Kajkenova O, Feuers RJ, Udupa KB, Desai VG, Epstein J, Hart RW, Lipschitz DA. Impaired glutathione peroxidase activity accounts for the age-related accumulation of hydrogen peroxides in activated human neutrophils. *J Gerontol* 1998; M169-M175.
86. Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Jirillo E, Antonaci S. Age-related effects of oxidative metabolism and cyclic AMP signaling on neutrophil apoptosis. *Mech Ageing Dev* 1999; 110: 195-205.
87. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 463-499.
88. De la Fuente M. Biología y envejecimiento: ¿dónde están los límites? En: J.M. Ribera Casado, P. Gil Gregorio (Eds). *Prevención en Geriatría: ¿Es Posible?*. Madrid: Edimsa; 2003. p. 23-42.
89. De la Fuente M. Papel de los antioxidantes en la nutrición del anciano. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2000; 35(S4): 63-71.
90. De la Fuente M, Ferrández MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A, Miquel J. Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76: 373-380.
91. Stohs J, El-Rashid FH, Lawson T, Kobashi RH, Wulf BJ, Potter JF. Changes in glutathione and glutathione metabolizing enzymes in human erythrocytes and lymphocytes as a function of donor. *Age* 1984; 7: 3-7.
92. De la Fuente M, Miquel J. Efecto protector de antioxidantes tiólicos en la inmunodepresión asociada al envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 1994; 29: 246-251.
93. Correa R, Blanco B, Del Río M, Victor V, Guayerbas N, Medina S. Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. *Biofactors* 1999; 10: 195-200.
94. Miquel J. Can antioxidant diet supplementation protect against age-related mitochondrial damage? *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 508-516.
95. Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, De la Fuente M. Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73: 797-804.
96. Yu BP. Approaches to anti-aging interventions: the promises and the uncertainties. *Mech. Ageing Dev* 1999; 111: 73-87.