

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II)**



**RESTRICCIÓN DE METIONINA Y DE DIETA EN  
RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN  
MAMIFEROS DE LABORATORIO.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Pilar Caro Martín**

Bajo la dirección del doctor

Gustavo Barja de Quiroga

**Madrid, 2010**

- ISBN: 978-84-693-1106-6

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE BIOLOGÍA



RESTRICCIÓN DE METIONINA Y DE DIETA  
EN RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO  
EN MAMÍFEROS DE LABORATORIO

Memoria presentada por Pilar Caro Martín  
para obtener el Grado de Doctora en Biología

Madrid 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE BIOLOGÍA



# RESTRICCIÓN DE METIONINA Y DE DIETA EN RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN MAMÍFEROS DE LABORATORIO

Vº Bº

El director

D. Gustavo Barja de Quiroga

Pilar Caro Martín

Memoria presentada por Pilar Caro Martín  
para obtener el Grado de Doctora en Biología

Madrid 2009

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. Gustavo Barja de Quiroga.

La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo con el apoyo económico prestado por los proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2005-02584), de la Generalitat de Catalunya (2005SGR00101), de la Red de Envejecimiento y Fragilidad (ISCIII), de la Fundación “La Caixa” y de los grupos CAM / UCM (910521), y con la concesión a Pilar Caro de una beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

*“Lo que sabemos es una  
gota de agua, lo que ignoramos  
es el océano”*

*Isaac Newton*

*Llego el momento de sentarme y pensar en todas aquellas personas que, de una forma u otra, han representado una parte importante a lo largo del desarrollo de esta tesis. Son muchos los que han colaborado en la realización de este trabajo y, por tanto, son muchos a los que quiero expresar mi más sincera gratitud.*

*A la primera persona a quien quiero expresar mi más sincera admiración y mi más profundo agradecimiento es al Profesor Gustavo Barja, fuente de motivación y al que considero mi maestro y ejemplo de dedicación. Además de ser un gran director de tesis, ha sido capaz de transmitirme su pasión por la ciencia. Debo agradecerle el haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo y participar en las actividades que dentro de él se desarrollan.*

*A Alberto le quiero agradecer los buenos momentos que pasamos en el laboratorio y lo mucho que me enseñó y ayudó. También me gustaría agradecerle a Jose toda su ayuda prestada y su compañerismo, y a Mónica por estar siempre allí tratando de resolver todas mis dudas.*

*No me puedo olvidar de dar las gracias al Profesor Reinald Pamplona y a todo su equipo, en especial a Alba, puesto que sin su excelente colaboración la realización de esta tesis doctoral no hubiera sido posible.*

*Bueno y que decir de la gente de la "18". Ana, simplemente eres genial, muchas gracias por tu ayuda siempre desinteresada, eres una gran amiga. Ricardo, te voy a echar muchísimo de menos de verdad. Lorena, Bea, Álvaro, "mis Lauras", Marcos, Elvira... es fantástico haber tenido como compañeros a algunos de mis mejores amigos. Y bueno no me puedo olvidar de Eva, Clara, Rosa, Inés, Elena y todos los demás, os agradezco los buenos momentos que hemos pasado juntos, sin los cuales la realización de esta tesis no habría sido lo mismo.*

*También me gustaría agradecer al Profesor Konstantin Khrapko la oportunidad que me ha dado, durante dos veranos consecutivos, acogiéndome en su laboratorio, gracias también a Genya por toda la paciencia y dedicación que demostró conmigo.*

*A Julio, Sonia, Paul, Renata y Brian, por haber hecho mis estancias inolvidables.*

*A Julia, Teresa y, con un cariño muy especial, a Fernando.*

*Por último, pero por supuesto no menos importante, a mi familia, por haberme apoyado en todo momento.*

## ABREVIATURAS

8-oxodG	8-oxo-7,8-dihidro-2´deoxiguanosina
AASA	Semialdehído aminoadípico
ACL	Longitud media de cadena
AIF	Factor inductor de la apoptosis
CEL	N <sup>ε</sup> -(carboxietil)-lisina
CML	N <sup>ε</sup> -(carboximetil)-lisina
DBI	Índice de dobles enlaces
dG	Deoxiguanosina
EOD	Ayuno en días alternos
GC / MS	Cromatografía de gases / espectrometría de masas
GSA	Semialdehído glutámico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MDAL	N <sup>ε</sup> -(malondialdehído)-lisina
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
NRF-2	Factor respiratorio nuclear 2
PGC-1 $\alpha$	Coactivador-1 $\alpha$ del receptor- $\gamma$ activado por proliferadores de peroxisomas
PI	Índice de peroxidizabilidad
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RCR	Índice de control respiratorio
RD	Restricción de dieta
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAH	S-Adenosilhomocisteína
SAM	S-Adenosilmetionina
SFA	Ácidos grasos saturados
SOD	Superóxido dismutasa
TTFA	Tenoiltrifluoroacetona
UCP	Proteína desacoplante
UFA	Ácidos grasos insaturados

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	10
1.- Envejecimiento: definición y características .....	13
2.- Teoría mitocondrial de envejecimiento por radicales libres .....	14
3.- Mitocondrias y producción de radicales libres .....	16
3.1.- Introducción a la mitocondria .....	16
3.2.- Biogénesis mitocondrial .....	17
3.3.- Radicales libres. Tipos principales .....	18
3.4.- Cadena de transporte de electrones mitocondrial .....	21
3.5.- Factores que determinan la respiración y producción de ROS mitocondriales .....	24
3.6.- Producción de radicales libres en la cadena respiratoria y su relación con el envejecimiento .....	26
4.- Componentes macromoleculares y longevidad .....	29
5.- Daño oxidativo a macromoléculas .....	30
5.1.- Lípidos .....	30
5.2.- Proteínas .....	31
5.3.- Hidratos de Carbono .....	32
5.4.- ADN .....	33
6.- Restricción de dieta y envejecimiento .....	36
6.1.- Restricción de dieta, producción mitocondrial de ROS y estrés oxidativo .....	37
6.2.- ¿Por qué el modelo EOD de restricción de dieta? .....	39
7.- Metionina y restricción de dieta .....	41
7.1.- Breve introducción al metabolismo de la metionina .....	41
7.2.- Restricción de metionina .....	43
OBJETIVOS .....	47
MATERIALES Y MÉTODOS .....	51
- DISEÑO EXPERIMENTAL .....	52
1.- Estudio de la restricción de metionina y aminoácidos sobre el estrés oxidativo mitocondrial en la rata Wistar .....	52
Modelo 1.1. Restricción de metionina al 40 y 80% en hígado .....	52
- Dietas .....	52
- Grupos experimentales .....	53
Modelo 1.2. Restricción de metionina al 40% en cerebro y riñón .....	53
- Dietas .....	53
- Grupos experimentales .....	54
Modelo 1.3. Restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto metionina en hígado .....	54
- Dietas .....	54
- Grupos experimentales .....	56
2.- Estudio del modelo de restricción de dieta EOD sobre el estrés oxidativo mitocondrial en hígado de ratón C57BL/6 .....	57
- MATERIALES .....	59

1. Equipo instrumental .....	59
2. Productos químicos .....	60
3. Animales de experimentación .....	61
- MÉTODOS ANALÍTICOS .....	63
1. Producción mitocondrial de ROS, consumo de oxígeno y fuga de radicales libres .....	63
1.1. Aislamiento de mitocondrias funcionales de:	
- Hígado y riñón .....	63
- Cerebro .....	63
1.2. Valoración de proteína mitocondrial.....	66
1.3. Consumo de oxígeno mitocondrial.....	67
1.4. Producción mitocondrial de ROS .....	69
1.5. Fuga de radicales libres .....	71
2. Daño oxidativo a proteínas.....	72
2.1. Preparación de las muestras.....	72
2.2. Síntesis de los estándares internos .....	72
2.3. Análisis de AASA, CEL, CML, MDAL y GSA .....	73
2.4. Cromatografía de gases / espectrometría de masas .....	74
3. Daño oxidativo al ADN mitocondrial .....	75
3.1. Aislamiento del ADN mitocondrial .....	75
3.2. Digestión del ADN mitocondrial.....	77
3.3. Condiciones cromatográficas .....	77
3.4. Cálculo de las concentraciones de dG y 8-oxodG .....	77
4. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales .....	79
4.1. Extracción de lípidos .....	79
4.2. Condiciones cromatográficas .....	79
4.3. Cálculo de los índices relacionados con la composición lipídica .....	80
5. Cantidad de los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria así como de AIF, SIRT1, NRF-2, PCG-1 $\alpha$ y UCP2, 4: análisis de western blot .....	82
6. Medida de S-Adenosilmetionina y S-Adenosilhomocisteína .....	83
7. Contenido en ATP, ADP y AMP .....	84
8. Métodos estadísticos.....	85
8.1. Características muestrales.....	85
8.2. Análisis estadísticos.....	85
RESULTADOS.....	86
1. Estudio de la restricción de metionina y aminoácidos sobre el estrés oxidativo mitocondrial en la rata Wistar .....	87
- Modelo 1.1. Restricción de metionina al 40 y 80% en hígado .....	87
1.1.1. Peso de animales y órganos .....	87
1.1.2. Consumo de oxígeno mitocondrial.....	89
1.1.3. Producción mitocondrial de radicales libres .....	90
1.1.4. Fuga de radicales libres .....	93
1.1.5. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial .....	94
1.1.6. Cantidad de AIF .....	95

1.1.7. Daño oxidativo a proteínas.....	95
1.1.8. Daño oxidativo al ADN mitocondrial.....	97
1.1.9. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales .....	98
- Modelo 1.2. Restricción de metionina al 40% en cerebro y riñón.....	101
1.2.1. Peso de animales y órganos .....	101
1.2.2. Consumo de oxígeno mitocondrial.....	102
1.2.3. Producción mitocondrial de radicales libres .....	104
1.2.4. Fuga de radicales libres .....	106
1.2.5. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial .....	108
1.2.6. Cantidad de AIF, PCG-1 $\alpha$ y UCP4.....	110
1.2.7. Daño oxidativo a proteínas.....	110
1.2.8. Daño oxidativo al ADN mitocondrial.....	112
1.2.9. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales .....	112
- Modelo 1.3. Restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto metionina en hígado .....	115
1.3.1. Peso de animales y órganos .....	115
1.3.2. Consumo de oxígeno mitocondrial.....	116
1.3.3. Producción mitocondrial de radicales libres .....	118
1.3.4. Fuga de radicales libres .....	120
1.3.5. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial .....	121
1.3.6. Cantidad de AIF, SIRT1, PGC-1 $\alpha$ y NRF-2 .....	122
1.3.7. Daño oxidativo a proteínas .....	123
1.3.8. Daño oxidativo al ADN mitocondrial .....	124
1.3.9. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales .....	124
1.3.10. Estudio de los metabolitos de la metionina .....	127
1.3.11. Contenido total de nucleótidos de adenina .....	127
2. Estudio del modelo de restricción de dieta EOD sobre el estrés oxidativo mitocondrial en hígado de ratón C57BL/6 .....	129
2.1. Ingesta media y peso de animales y órganos .....	129
2.2. Consumo de oxígeno mitocondrial .....	130
2.3. Producción mitocondrial de radicales libres .....	131
2.4. Fuga de radicales libres .....	134
2.5. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial .....	135
2.6. Cantidad de AIF, PGC-1 $\alpha$ y UCP2.....	136
2.7. Daño oxidativo a proteínas .....	137
2.8. Daño oxidativo al ADN mitocondrial .....	139
2.9. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales .....	139
DISCUSIÓN .....	142
CONCLUSIONES .....	162
BIBLIOGRAFÍA.....	165
ANEXO .....	190

# Introducción

La longevidad de los seres vivos ha sido ampliamente investigada por científicos a nivel mundial y, desde hace muchos siglos, los seres humanos han tenido entre sus inquietudes el cómo prolongar su vida, o vivir eternamente; historias como la fuente de la eterna juventud o la contracción espacio / tiempo basada en la Teoría de la Relatividad de Einstein son algunos ejemplos bastante representativos.

El cómo extender la vida humana en un tiempo muy superior al promedio general es una cuestión de gran interés desde muy diversos puntos de vista, que ha de plantearse desde el conocimiento de los mecanismos que subyacen al propio proceso de envejecimiento. ¿Cuáles son los componentes estructurales y los mecanismos fisiológicos determinantes del proceso de envejecimiento y la longevidad? ¿Cuál es el papel que juegan estos mecanismos en la aparición de las enfermedades asociadas con la edad como, por ejemplo, la diabetes, la aterosclerosis, o las enfermedades neurodegenerativas? ¿Cuánto más puede extenderse la expectativa de vida humana?<sup>1</sup>

Lo que se sabe al respecto es que la longevidad de cada especie con vida está contenida en su patrimonio genético: una mosca vive 3 días, un ratón, 3 años, una ballena azul, 80 años, una tortuga marina, 200 años, una persona al menos hasta 122 años, si nos atenemos a la experiencia de Jeanne Calment, la francesa que ostenta el récord de mayor longevidad humana demostrada.

Es importante tener en cuenta desde el primer momento la diferencia existente entre los términos longevidad media y longevidad máxima, pues se trata de dos conceptos que, aunque ligados, son distintos. La **longevidad media o esperanza de vida** se refiere a los años promedio que un individuo puede llegar a vivir por pertenecer a una población específica. Por ejemplo, en el caso de los seres humanos, no tiene la misma esperanza de vida, a priori, un individuo nacido en Europa que uno nacido en África. Por su parte, la **longevidad máxima** es la edad máxima alcanzable por los individuos pertenecientes a una especie concreta. Existe un acuerdo general de que la herencia de la esperanza de vida de los individuos es baja (cerca del 33% en humanos), mientras que la variabilidad restante se atribuye principalmente al ambiente. Por el contrario, la longevidad máxima de las diferentes especies animales se encuentra principalmente bajo el control del genoma.

En dos siglos y medio, la esperanza de vida al nacer ha pasado de menos de 30 años a los 80 años en los países desarrollados. Las proyecciones demográficas actuales dibujan un escenario para el 2025 en el estado español con más de 8 millones de personas de más de 65

---

<sup>1</sup> Esta pregunta fue cuestionada por la prestigiosa revista Science en su 125 aniversario, y representa una de las brechas todavía existentes en nuestro conocimiento científico para los próximos 25 años.

## Introducción

años y una expectativa de vida en el momento del nacimiento de 82 años. Este éxito de nuestra sociedad, debido muy especialmente a los avances de la medicina en muy diversos ámbitos plantea, a su vez, un gran número de retos sanitarios y socioeconómicos, ya que con la edad aumenta la frecuencia de enfermedades metabólicas y degenerativas. El principal problema radica en que se ha conseguido incrementar la esperanza de vida pero no la longevidad máxima, ya que lo que no se ha conseguido hasta la fecha es ralentizar el proceso endógeno del envejecimiento<sup>2</sup>.

Las enfermedades degenerativas que acompañan al envejecimiento son líneas preferentes de estudio en los campos de la Geriatria y la Gerontología, debido a que el envejecimiento saludable es la meta principal en estos campos.

---

<sup>2</sup> Este tipo de intervención alargaría la vida sin alterar la proporción de individuos viejos / jóvenes en la población.

## 1. ENVEJECIMIENTO: DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS

Existen múltiples propuestas para explicar el envejecimiento, principalmente debido a la gran variedad de procesos que se ven implicados en un fenómeno tan complejo. Una buena definición es la que propone que **el envejecimiento es la acumulación progresiva de cambios con el tiempo que reducen la capacidad del individuo para enfrentarse al estrés disminuyendo así sus posibilidades de supervivencia** (Harman, 1986).

Otra forma de definir el envejecimiento como proceso biológico la constituyen las cuatro reglas expuestas por el gerontólogo americano Bernard Strehler (Strehler, 1962) según las cuales, el envejecimiento es un fenómeno:

- 1) **Universal.** La universalidad del envejecimiento se refiere a la incidencia de dicho proceso en todos los individuos de una especie. Todos los individuos envejecen, y lo mismo puede decirse de todas las especies animales multicelulares, especialmente de aquellas que, como la humana, dejan de crecer al alcanzar el desarrollo adulto.
- 2) **Intrínseco.** El carácter endógeno se refiere a que las causas del proceso están determinadas mayoritariamente por factores internos (en última instancia por los genes) y no por el ambiente. Dos hechos confirman esto: 1. El envejecimiento continúa aunque se proteja al individuo de toda fuente de daño procedente del exterior y 2. La existencia de distintas longevidades máximas en diferentes especies que viven en el mismo ambiente.
- 3) **Progresivo.** Supone que las causas del proceso están presentes en los individuos a lo largo de toda su vida. De esta forma, los cambios que se observan con la edad, como el deterioro de las capacidades fisiológicas<sup>3</sup> (gasto cardiaco máximo, elasticidad muscular, capacidad vital...), se producen de forma progresiva.
- 4) **Deletéreo.** El envejecimiento tiene un marcado carácter perjudicial para el individuo. Los cambios asociados al envejecimiento se observan de manera más clara en células postmitóticas, como neuronas o cardiomiocitos (Miquel et al., 1980) que en las que se dividen continuamente, como los enterocitos intestinales.

---

<sup>3</sup> Especialmente en lo que a su capacidad máxima se refiere, no tanto a la basal.

## 2. TEORÍA MITOCONDRIAL DE ENVEJECIMIENTO POR RADICALES LIBRES

Existen numerosas teorías de envejecimiento, muchas de las cuales coexisten porque no se contradicen entre ellas, o porque tratan de explicar formas independientes y diferentes de senescencia (Medvedev, 1990). Hoy día, la teoría más popularmente usada para explicar el envejecimiento es la Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres.

Los orígenes de esta teoría se remontan a mediados del siglo XX, cuando se descubrió que los radicales libres del oxígeno, tradicionalmente considerados como demasiado reactivos para existir en los sistemas biológicos, se formaban *in situ* en respuesta a las radiaciones e intoxicación por oxígeno, y eran los responsables de las toxicidades asociadas (Gerschman et al., 1954a, b).

Denham Harman, pionero de los radicales libres en la biología, propuso en un principio la **Teoría de Envejecimiento por Radicales Libres**, en su artículo titulado “*Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*” (Harman, 1956). En este artículo, publicado hace más de 50 años, Harman propone que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de daño causado por los radicales libres que se generan durante el metabolismo normal de las células. El interés en esta teoría fue en un principio muy limitado, por la persistente duda acerca de la existencia de los radicales libres en los sistemas biológicos; sin embargo, esta situación cambió tras el descubrimiento de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) por McCord y Fridovich en 1969. Si las células cuentan con algún sistema para detoxificar radicales libres, entonces dichos radicales deben de producirse *in vivo* de forma continua dentro de las células. Sólo 4 años después del descubrimiento de la enzima SOD, el grupo de investigación de Britton Chance descubrió la producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas (Boveris and Chance, 1973). Con esto se demostró que incluso durante la respiración mitocondrial normal, el oxígeno es incompletamente reducido y ocasiona moléculas altamente reactivas e inestables llamadas “especies reactivas del oxígeno” (ROS)<sup>4</sup>. La producción de ROS oscila entre el 0,1% y el 4% del oxígeno consumido. Aunque hoy día está bien establecido que el complejo I (Barja and Herrero, 1998; Herrero and Barja, 1997,2000; Kushnareva et al., 2002) , el complejo III (Boveris et al., 1976), la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Miwa and Brand, 2005; Tretter et al., 2007), y el complejo enzimático  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (Tretter and Adam-Vinzi, 2005) producen radicales libres en las mitocondrias aisladas, fue en 1972 cuando Harman redefinió su teoría y propuso a la **mitocondria** como el **principal lugar donde se generan los radicales libres y**, al mismo tiempo, **la principal diana de acción de los mismos** (Harman, 1972), idea que fue mas tarde reforzada por Miquel y colaboradores (Miquel et al., 1980). Desde entonces, la teoría pasó a llamarse **Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres**.

---

<sup>4</sup> De las que se hablará extensamente en la sección 3.3 de la Introducción.

## Introducción

El punto central de la teoría es simple: las mitocondrias son la principal fuente de radicales libres del oxígeno en el cuerpo. Tales radicales libres son destructivos, y atacan a varios componentes de las células incluyendo, como veremos, el ADN, las proteínas, las membranas lipídicas y los carbohidratos. Parte de este daño podría ser reparado o reemplazado por el recambio usual de los componentes celulares, pero los puntos calientes de daño, las mitocondrias mismas, podrían ser más difíciles de proteger con el simple consumo de antioxidantes en la dieta. De este modo, según esta teoría, la tasa de envejecimiento y la aparición de enfermedades neurodegenerativas deberían de estar determinadas por la tasa de fuga de radicales libres en la mitocondria, en combinación con la capacidad innata de las células para protegerse de, o reparar, el daño.

Se han publicado numerosos trabajos apoyando esta teoría, la mayoría de los cuales verifican la idea de que el daño oxidativo incrementa durante el envejecimiento (revisado en Bokov et al., 2004). De acuerdo con la propuesta modificada de Harman, de que la mitocondria es central en el proceso de envejecimiento, se ha descubierto que el estrés oxidativo induce deleciones en el ADN mitocondrial y, más recientemente, también mutaciones puntuales en el mismo, y que dichas alteraciones se acumulan con el envejecimiento (de Grey, 2002; Golden and Melov, 2001; Kregel and Zhang, 2007; Yui et al., 2003).

En los últimos 50 años, la hipótesis de Harman se ha ido refinando para abarcar no solo los radicales libres, sino también otras formas del oxígeno activado. Muchas especies reactivas del oxígeno, tales como peróxidos y aldehídos (que técnicamente no son radicales libres) también juegan un importante papel en el daño oxidativo celular; esto condujo a una modificación de la teoría mitocondrial de radicales libres, conocida como "Teoría del envejecimiento por Estrés Oxidativo", basada en el hecho de que existe un estado crónico de estrés oxidativo en las células de los organismos aerobios, incluso bajo condiciones fisiológicas normales, debido a un desequilibrio entre los factores prooxidantes y los antioxidantes (Sohal and Weindruch, 1996). Este desequilibrio conduce a un acúmulo de daño oxidativo en varias macromoléculas, que se incrementa durante el envejecimiento, resultando en una progresiva pérdida de la eficiencia funcional de varios procesos celulares.

Beckman y Ames publicaron una importante revisión en la que analizan minuciosamente la teoría y plantean una división de la hipótesis en versiones "fuertes" y "débiles" de la misma (Beckman and Ames, 1998). La "versión fuerte" de la teoría plantea que el daño oxidativo determina la esperanza de vida, y que por tanto un mayor daño acortará la esperanza de vida, mientras que la "versión más débil" postula que el daño oxidativo está "asociado" con enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Por supuesto, existe un continuo entre estas dos hipótesis extremas. La versión débil de la teoría parece estar bien arraigada en los múltiples estudios que demuestran una asociación entre el elevado daño oxidativo con el envejecimiento y las enfermedades degenerativas.

### 3. MITOCONDRIAS Y PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES

La científica estadounidense Lynn Margulis, junto con otros científicos, recuperó en torno a los años 1970s una antigua hipótesis, reformulándola como Teoría Endosimbiótica (Margulis, 1970). Según esta versión actualizada, hace unos 1.500 millones de años una célula procariota capaz de obtener energía de los nutrientes orgánicos empleando el oxígeno molecular como oxidante<sup>5</sup> se fusionó, en un momento de la evolución, con otra célula procariota o eucariota primitiva (que había desarrollado núcleo, cromosomas lineales, y otros rasgos típicos de las células eucariotas), al ser fagocitada sin ser inmediatamente digerida, un fenómeno frecuentemente observado. De esta manera se produjo una simbiosis permanente entre ambos tipos de seres: la procariota fagocitada proporcionaba energía, especialmente en forma de ATP, mientras que la célula hospedadora ofrecía un medio estable y rico en nutrientes a la primera. Este mutuo beneficio hizo que la célula invasora llegara a formar parte del organismo mayor, acabando por convertirse en parte de ella: la mitocondria.

#### **3.1. Introducción a la mitocondria**

Las mitocondrias están rodeadas por dos membranas, que difieren entre sí en muchos aspectos. La membrana externa es permeable a iones, metabolitos y muchos polipéptidos, gracias a que contiene proteínas que forman poros, llamadas porinas, que permiten el paso de estas moléculas a su través; realiza relativamente pocas funciones enzimáticas o de transporte. La membrana interna, por su parte, carece de poros, por lo que es impermeable para la mayoría de las moléculas, especialmente las que tienen carga; contiene muchos sistemas de transporte transmembrana, que están implicados en la translocación de moléculas; además, su área de superficie es mucho mayor de lo necesario para contener el material dentro de la mitocondria, pero se encuentra intrincadamente plegada. En la membrana interna se encuentran abundantes proteínas, que son además exclusivas de este orgánulo; así pues, están los sistemas dedicados al transporte electrónico, y un conjunto de proteínas encargadas de acoplar la energía liberada de dicho transporte con la síntesis de ATP; también se encuentran una serie de proteínas transportadoras que permiten el paso de iones y moléculas a su través, como ácidos grasos, ácido pirúvico, ADP, ATP, oxígeno y agua.

El espacio rodeado por la membrana interna se llama matriz mitocondrial, y el espacio entre la membrana interna y la externa recibe el nombre de espacio intermembrana. En la matriz mitocondrial tienen lugar diversas rutas metabólicas clave para la vida, como el ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos; también se oxidan los aminoácidos y se localizan algunas reacciones de la síntesis de urea y grupos hemo. El espacio intermembrana contiene

---

<sup>5</sup> Las bacterias primitivas eran incapaces de usar el oxígeno y, de hecho, era altamente tóxico para ellas.

una alta concentración de protones como resultado del bombeo de los mismos por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria.

La principal función de las mitocondrias es la oxidación de metabolitos (ciclo de Krebs,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos) y la obtención de ATP mediante la fosforilación oxidativa, que es dependiente de la cadena transportadora de electrones; el ATP producido en la mitocondria supone un porcentaje muy alto del ATP sintetizado por la célula. También sirve de almacén de sustancias como iones, agua y algunas partículas como restos de virus y proteínas.

El número de mitocondrias por célula varía en función del tipo celular; los extremos son los eritrocitos, que carecen de mitocondrias, mientras que los óvulos contienen cerca de 100.000. La mayoría de las células humanas contienen entre unos pocos de cientos y unos pocos de miles de mitocondrias (de Grey, 1999).

### **3.2. Biogénesis mitocondrial**

La mayoría de los componentes celulares, incluyendo las mitocondrias, requieren un reciclaje continuo y regeneración a lo largo de la vida. Las mitocondrias, que son la principal maquinaria bioenergética y fuente de estrés oxidativo en las células, son particularmente susceptibles al daño a lo largo del tiempo. El control efectivo de la biogénesis y del recambio mitocondrial es, por tanto, crítico para el mantenimiento de la producción energética, la prevención del estrés oxidativo endógeno y la promoción del envejecimiento saludable.

Es lógico esperar que la regulación de la biogénesis mitocondrial esté influenciada por cambios en las condiciones energéticas y fisiológicas. Por tanto, no es sorprendente que factores tales como la disponibilidad de nutrientes, la presencia o ausencia de ciertas hormonas, la temperatura, el ejercicio, la hipoxia, el estrés y el envejecimiento influyan en el proceso de mitocondriogénesis (Lopez-Lluch et al., 2008).

La complejidad de la regulación de la biogénesis mitocondrial no puede subestimarse; implica cambios en la expresión de más de 1000 genes, la cooperación de 2 genomas, y altera el nivel de aproximadamente el 20% de las proteínas celulares.

A nivel molecular son varios los factores de transcripción y cofactores que están implicados en la activación y la regulación de la biogénesis mitocondrial. Estos factores pueden agruparse en 3 grupos principales: factores de transcripción ubicuos (SP1, YY1, CREB, MEF-2/E-box), factores respiratorios nucleares (NRF-1,-2, REBOX/OXBOX, MT-1 a -4) y coactivadores (PGC-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , PRC) (Goffart and Wiesner, 2003). Además, otro conjunto de factores de transcripción está implicado en la adaptación metabólica al ayuno, tales como la

familia de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR, del inglés *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) y el receptor X del hígado (LXR) que, junto con PGC-1 $\alpha$  incrementan la biogénesis mitocondrial y el catabolismo de los ácidos grasos.

Frente a la complejidad de las diferentes vías de señalización que convergen para regular la biogénesis mitocondrial, todas ellas parecen compartir el componente clave común de la familia PGC-1 de coactivadores. En particular, **PGC-1 $\alpha$**  parece actuar como el **regulador maestro** del metabolismo energético y de la **mitocondriogénesis** (Lopez-Lluch et al., 2008) integrando y coordinado la actividad de múltiples factores de transcripción, tales como NRF-1, -2, PPAR $\alpha$  y mtTFA (Puigserver et al., 1998).

Entre la plétora de fenómenos biológicos afectados por el envejecimiento, la disfunción y el descenso de la biogénesis de las mitocondrias podría ejercer algunos de los efectos más potentes en el organismo. Si la biogénesis está afectada, es razonable esperar que el recambio mitocondrial pueda ser más lento y que se incremente la acumulación de lípidos, proteínas y ADN modificados, agravando así la situación resultante de la deficiente actividad que presentan las mitocondrias envejecidas. La razón precisa del descenso en la tasa de biogénesis mitocondrial durante el envejecimiento todavía se desconoce.

Actualmente se están considerando varias estrategias para aliviar el déficit en la actividad y biogénesis mitocondriales durante el envejecimiento. Por ejemplo, se ha observado que varias condiciones que promueven la supervivencia, tales como suplementación de vitamina E, polifenoles y ejercicio físico moderado aminoran la disfunción mitocondrial durante el envejecimiento. En particular se ha visto que **la restricción de dieta**, el polifenol **resveratrol**<sup>6</sup> y el **ejercicio incrementan la actividad de PGC-1 $\alpha$  y la biogénesis mitocondrial**. SIRT1 es una deacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> que actúa deacetilando PGC-1 $\alpha$  y, por tanto, incrementando su actividad (Nisoli and Carruba, 2006). La activación de SIRT1 por resveratrol se ha implicado recientemente en la biogénesis mitocondrial inducida por este polifenol en hígado, músculo y cerebro (Baur et al., 2006; Dasgupta and Milbrandt, 2007; Lagouge et al., 2006).

### **3.3. Radicales libres. Tipos principales**

Un radical libre es un átomo, molécula o compuesto con uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Al ser altamente electrófilos, los radicales libres atacan sitios de alta densidad o inestabilidad electrónica, tales como átomos de nitrógeno en el ADN, ARN y proteínas, y los dobles enlaces en los ácidos grasos insaturados, alterando su estructura y, por tanto, sus funciones normales dentro de la célula. El apareamiento se define

---

<sup>6</sup> Mimético de la restricción de calorías.

en términos de interacciones físicas de los electrones de una molécula; los caprichos de la estructura atómica permiten a una molécula tener dos electrones desapareados al mismo tiempo (tales moléculas se llaman dirradicales). En la práctica, el único dirradical que nos incumbe es el oxígeno molecular ( $O_2$ ), y sus electrones están organizados de tal forma que, para fines de reactividad, se comportan como si estuvieran apareados.

Un término que se usa con frecuencia para referirse a los radicales libres es el de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), que engloba especies derivadas del oxígeno, incluyendo radicales libres como el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) o el perhidroxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ) y otras especies que no son propiamente radicales libres, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), pero que son muy propensos a reaccionar con radicales y reducir iones metálicos<sup>7</sup> (Figura 1).

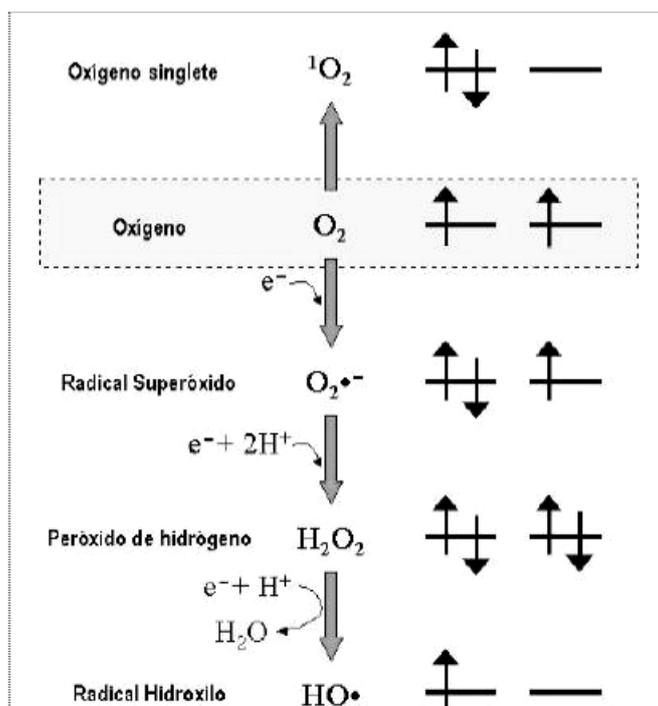


Figura 1. Formación de Especies Reactivas de Oxígeno.

Los ROS son generados de manera natural durante procesos metabólicos en todos los seres consumidores de oxígeno; los lugares donde se generan son numerosos, aunque cuatro de ellos han atraído especial atención: la cadena respiratoria mitocondrial, el metabolismo peroxisomal de los ácidos grasos, reacciones del citocromo P-450 y células fagocíticas. Además, existen otras muchas enzimas capaces de generar radicales libres bajo condiciones normales o fisiológicas con frecuencia de forma específica de tejido (Halliwell and Gutteridge,

<sup>7</sup> A lo largo de la presente tesis se emplearán indistintamente los términos ROS y radicales libres para hacer referencia a las especies reactivas del oxígeno.

1989). Tomando especial atención a la cadena respiratoria mitocondrial, las peculiaridades de las reacciones redox que ocurren en la misma hacen que los radicales libres se transfieran de uno en uno, siendo ésta la principal razón por la que se producen fugas en la cadena (Muller, 2000). Así, durante la reducción del oxígeno a agua en la cadena respiratoria se produce la formación de tres tipos diferentes de ROS:

♦ **Radical superóxido** ( $O_2^{\cdot-}$ ). Se forma cuando el oxígeno recibe un electrón. Carece de la reactividad necesaria para atacar directamente a otras moléculas, pero en presencia de los metales de transición cobre o hierro y de peróxido de hidrógeno, el radical  $O_2^{\cdot-}$  da lugar a la formación de radical hidroxilo en la reacción de Haber-Weiss.

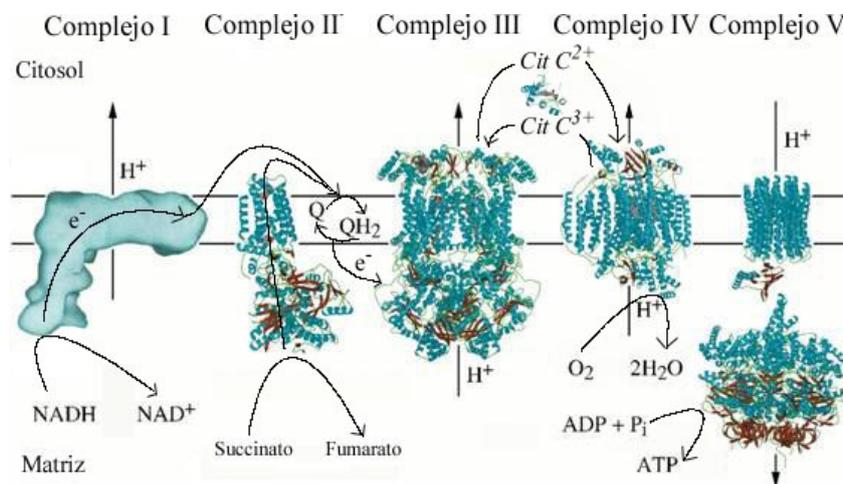
♦ **Peróxido de hidrógeno** ( $H_2O_2$ ). Se forma cuando el oxígeno se reduce de forma incompleta por adición de dos electrones. No es realmente un radical, pues carece de electrones desapareados; se trata de una molécula estable y poco reactiva que, sin embargo, puede inactivar enzimas directamente oxidando grupos tiólicos esenciales. La toxicidad del  $H_2O_2$  también está condicionada a la generación de otros radicales; así pues, en presencia de metales de transición se descompone mediante la reacción de Fenton, y produce radical hidroxilo.

♦ **Radical hidroxilo** ( $OH\cdot$ ). Las vías de aparición de este radical libre son, principalmente, las ya nombradas reacciones de Fenton y Haber-Weiss, partiendo del  $H_2O_2$ , y del  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  respectivamente. En ambos casos se requiere la presencia de metales de transición, lo que confirma la importancia del hierro y del cobre, los más abundantes en los sistemas biológicos, como moduladores del daño oxidativo. Su elevada reactividad limita su difusión, por lo que van a ser el  $O_2^{\cdot-}$  y sobretodo el  $H_2O_2$  los responsables de la propagación del daño oxidativo.

Aunque el óxido nítrico (NO) es un radical libre, su solo probable toxicidad surge de posibles reacciones con otros radicales libres. Así, el NO inhibe la transferencia de electrones en el complejo II e incrementa la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y de  $H_2O_2$  tanto en partículas submitocondriales como en mitocondrias cardíacas (Poderoso et al., 1996). Probablemente juegue un papel insignificante en la toxicidad de los radicales libres, mientras que, ciertamente, tiene muchas funciones vitales beneficiosas y desempeña un papel fundamental como factor de relajación endotelial y como neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico (Navarro and Boveris, 2007).

### 3.4. Cadena de transporte de electrones mitocondrial

El aislamiento de proteínas mitocondriales con propiedades específicas de transferencia de electrones, por Green y sus colaboradores, proporcionó el concepto de “complejos” de la cadena respiratoria (Green and Vande Zande, 1982). En los años 1950s, Chance y su equipo, usando técnicas espectrofotométricas, describieron los niveles de reducción-oxidación de los componentes de la cadena respiratoria en la transición que sigue la adición de ADP, e identificaron los sitios que son termodinámica y cinéticamente compatibles con la transducción energética (Chance and Williams, 1956).



**Figura 2.** Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Q= Ubiquinona; QH<sub>2</sub>= Ubiquinol; cit c<sup>2+</sup>= citocromo c reducido; cit c<sup>3+</sup>= citocromo c oxidado.

La cadena respiratoria consiste en una serie de transportadores electrónicos que funcionan como pares redox y que se localizan en la membrana mitocondrial interna. Así, está formada por cuatro complejos multiproteicos (complejos I-IV). La coenzima Q y el citocromo c también participan en el transporte de electrones entre los complejos. Bien formando parte de los complejos o bien fuera de ellos, las diferentes moléculas transportadoras de electrones son citocromos, centros hierro-sulfurados, quinonas y flavinas. La secuencia de transporte electrónico se inicia cuando los equivalentes metabólicos NADH y FADH<sub>2</sub>, generados en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, ceden electrones al complejo I y al complejo II, respectivamente (Figura 2).

♦ **Complejo I (NADH Deshidrogenasa).** De las 46 cadenas polipeptídicas que lo constituyen, 7 están codificadas por el ADN mitocondrial y el resto por el nuclear (Carroll et al., 2005). Los transportadores de electrones en este complejo son flavinas, centros hierro-sulfurados y ubiquinonas. En conjunto, este complejo es el componente más grande de la

cadena respiratoria, con cerca de 800-900 KDa; tiene forma de L, con el brazo largo como una proteína de membrana integral hidrofóbica, donde se encuentra la maquinaria de bombeo de protones, y el brazo corto constituido por un dominio globular hidrofílico situado en la matriz mitocondrial, que contiene la subunidad de unión al NADH y el centro activo de la enzima, constituido por una flavina y 9 centros hierro-sulfurados (Sazanov and Hinchliffe, 2006). Este complejo cataliza la transferencia de dos electrones desde el NADH hasta el dominio de membrana donde se encuentran las quinonas. Así, la flavina acepta dos electrones simultáneamente del NADH y los transfiere, uno a uno, a los centros hierro-sulfurados. Estos, a su vez, reducen la quinona, embebida en la membrana, a quinol, en dos pasos sucesivos de un solo electrón (Sazanov and Hinchliffe, 2006). Esta transferencia electrónica está acoplada al bombeo de cerca de cuatro protones a través de la membrana, ayudando a proporcionar la fuerza protón-motriz requerida para la síntesis de ATP (Yagi and Matsuno-Yagi, 2003). Este proceso supone cerca del 40% del gradiente de protones transmembrana generado en la oxidación del NADH por la cadena respiratoria mitocondrial (Hinchliffe and Sazanov, 2005). Existen varios inhibidores que pueden bloquear el flujo de electrones a través de los diferentes transportadores del complejo (Herrero and Barja, 2000); de todos ellos cabe destacar la rotenona<sup>8</sup>, que actúa bloqueando la transferencia de equivalentes de reducción desde los centros hierro-sulfurados hasta la ubiquinona, posiblemente actuando como análogo de la misma.

♦ **Complejo II (Succinato Deshidrogenasa; Succinato-Ubiquinona Reductasa).** Es el único complejo codificado íntegramente en el ADN nuclear. Dos de las cuatro subunidades proteicas que lo componen conforman la enzima succinato deshidrogenasa, componente clave en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, mientras que las otras dos se encargan del anclaje de dicha enzima a la membrana. En su participación en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos interviene en la transferencia de electrones desde el succinato hasta el FAD, formando FADH<sub>2</sub>, mientras que en su papel dentro de la cadena de transporte electrónico transfiere los electrones del FADH<sub>2</sub> a la ubiquinona (Cecchini et al., 2003). Carece de sitio de acoplamiento energético. A diferencia del NAD<sup>+</sup> que difunde libre en la matriz mitocondrial, el FAD no existe libre en disolución; por ello el complejo II contiene una molécula de FAD. La tenoiltrifluoroacetona (TTFA) bloquea la transferencia de electrones a través del complejo II posiblemente mediante interacciones débiles con el hierro del último componente del complejo, un centro hierro-sulfurado (Tyler, 1992). También a través de los equivalentes de reducción entrantes vía complejo II, se produce un flujo reverso de electrones hacia el complejo I.

♦ **Coenzima Q.** Es una benzoquinona soluble en lípidos con una larga cadena lateral isoprenoide que difunde lateralmente en la membrana mitocondrial interna y que está

---

<sup>8</sup> Potente insecticida extraído de las raíces de la planta *Derris*.

adaptada al transporte electrónico entre las proteínas de membrana (Hinchliffe and Sazanov, 2005). Existen tres isoformas diferentes de esta quinona: ubiquinona o coenzima Q, semiquinona o coenzima Q<sup>•</sup> y ubiquinol o coenzima QH<sub>2</sub>. La semiquinona es uno de los componentes de la cadena de transporte electrónica más propensos a ceder su electrón desapareado al oxígeno generando así radicales superóxido, y está presente de forma transitoria cuando se encuentra formando parte de los complejos I y III (Mitchell, 1975), especialmente en este último durante el ciclo Q (Brandt, 1997). En la membrana mitocondrial interna se presenta constituyendo un pool ubiquinona-ubiquinol que actúa como lanzadera de electrones desde los complejos I y II al complejo III.

♦ **Complejo III (Ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa).** Se trata de una estructura dimérica donde cada monómero está constituido por diez subunidades proteicas diferentes insertadas en, o unidas a la membrana mitocondrial interna. Tres de estas subunidades, un centro hierro-sulfurado (centro Rieske) y los citocromos c<sub>1</sub> y b, contienen centros redox y participan en la transferencia de electrones. Todos los elementos del complejo III están codificados por el ADN nuclear excepto el citocromo b, que lo está por el mitocondrial (Zara et al., 2009). Además, dentro del complejo III se ha propuesto un ciclo de transporte de electrones, denominado ciclo Q, donde coexisten distintas formas de la ubiquinona. Los detalles del proceso de transporte electrónico son complejos: el ubiquinol cede dos electrones, uno al centro Rieske que lo cede a su vez a un citocromo c para actuar como transportador hacia el complejo IV, mientras que el otro es reciclado a través del ciclo Q vía citocromos b<sub>566</sub> y b<sub>560</sub> y de semiquinonas (Trumpower, 1990). Este ciclo permite el bombeo de protones al citosol. El flujo de electrones en el complejo III puede ser bloqueado, entre otros, por los inhibidores antimicina A, ilicicolina H y funiculosina, que actúan en el sitio de reducción de la quinona (Rotsaert et al., 2008).

♦ **Complejo IV (Citocromo c oxidasa).** En este complejo, último en la cadena de transporte electrónico, se produce la reducción tetravalente del oxígeno molecular a agua. Al igual que ocurre en los complejos I y III, la citocromo c oxidasa genera un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana asociado al transporte electrónico. Esta enzima, la citocromo c oxidasa, está ampliamente distribuida en la naturaleza; se cree que es la responsable del consumo de más del 90% del oxígeno en los animales aerobios. Presenta gran afinidad por el oxígeno, por lo que se piensa que está adaptada a condiciones de escasez del mismo. Las unidades catalíticas del complejo están codificadas por el ADN mitocondrial, mientras que las estructurales lo están por el nuclear (Tyler, 1992).

Los transportadores electrónicos y los complejos están organizados en “ensamblajes” con interacciones específicas proteína-proteína, que son efectivas para la transferencia rápida

de electrones gracias a la limitación de las distancias intermoleculares entre ellas (Chance and Williams, 1956). Una mitocondria individual de hígado contiene cerca de 10.000 ensamblajes de complejos respiratorios, mientras que una de corazón presenta cerca del doble (Navarro and Boveris, 2007). Los complejos I, III y IV interaccionan para formar supercomplejos con una composición estequiométrica definida en mitocondrias de levaduras, plantas superiores y mamíferos. En mitocondrias de corazón bovino se han observado supercomplejos  $I_1III_2$  y  $I_1III_2IV_1$  (Schafer et al., 2006).

### **3.5. Factores que determinan la respiración y producción de ROS mitocondriales**

La fosforilación oxidativa mitocondrial está regulada por 3 metabolitos: ADP, oxígeno y NO. La tasa de respiración y la síntesis de ATP vienen determinadas por las necesidades energéticas celulares, que están expresadas como concentración citosólica de ADP o como potencial de fosforilación ( $[ATP] / [ADP] [Pi]$ ). Cuando incrementan las demandas energéticas celulares disminuye el potencial de fosforilación; por otra parte, cuando hay más ADP disponible, incrementa la tasa de respiración, regenerando de esta forma el ATP (Navarro and Boveris, 2007). Normalmente el potencial de fosforilación está finamente regulado y sólo fluctúa de forma ligera en la mayoría de los tejidos. Chance y Williams, en 1956, definieron los conceptos operacionales de los estados metabólicos mitocondriales y control respiratorio: **Estado 4**, con disponibilidad de sustrato respiratorio pero no con ADP, se describió como “*respiración controlada o en reposo*”, y **Estado 3**, con abundante sustrato respiratorio y disponibilidad de ADP, se definió como “*respiración activa*”, es decir, la tasa fisiológica máxima de producción de ATP y consumo de oxígeno. Las tasas de respiración de mitocondrias aisladas son de 5 a 8 veces más rápidas en estado 3 que en estado 4 (es decir, los controles respiratorios son de 5 a 8). Considerando las tasas de consumo de oxígeno mitocondrial en ambos estados, 4 y 3, y el consumo de oxígeno de órganos perfundidos, se estimó que las mitocondrias de mamíferos bajo condiciones fisiológicas se encuentran, normalmente (60-70%), en estado 4, mientras que el resto (30-40%) están en estado 3 (Boveris et al., 1999). Esto significa que en estado fisiológico solo se utiliza un 30-40% de la capacidad para producir ATP. El NO es un regulador fisiológico de la respiración mitocondrial. En las arteriolas, el NO produce vasodilatación e incrementa el flujo sanguíneo y el reparto de oxígeno a los tejidos (Clementi et al., 1999); sin embargo, en la mitocondria NO inhibe la respiración mediante una rápida, potente y selectiva inhibición reversible del complejo IV (revisado en Navarro and Boveris, 2007). Esta inhibición ocurre en competencia con el oxígeno; así, en las mitocondrias, sinaptosomas y membranas mitocondriales la inhibición de la respiración ocurre cuando el cociente oxígeno / NO es elevado, en el rango de 400-500 (Antunes et al., 2004). Macrófagos, astrocitos y células endoteliales, en condiciones inflamatorias y con la expresión de iNOS

incrementada, producen suficiente NO para inhibir su propia respiración así como la toma de oxígeno de las células vecinas (Mander et al., 2005).

**La producción de ROS de origen mitocondrial**, por su parte, **depende** en gran medida **del grado de reducción electrónica de el/los generadores de ROS así como de la  $pO_2$**  (presión parcial del oxígeno) **local** de su ambiente (revisado en Barja, 2007).

Si la tasa de flujo electrónico es baja, los electrones tienden a acumularse en la cadena respiratoria, y los complejos respiratorios tienden a reducirse más, es decir, se llenan más de electrones, en estado de reposo. Incrementando su grado de reducción se incrementa en gran medida su capacidad para producir ROS (Kushnareva et al., 2002). Así, manteniendo otras condiciones iguales, la generación mitocondrial de ROS será alta durante el estado 4, porque en este estado la tasa de consumo de oxígeno es baja. Sin embargo, cuando se añade ADP a la mitocondria, la tasa de flujo electrónico incrementa fuertemente, los electrones fluyen rápidamente a lo largo de la cadena respiratoria reduciendo el oxígeno a agua en la citocromo oxidasa, y el grado de reducción electrónica de la cadena, y de sus generadores de ROS, desciende abruptamente (Loschen et al., 1971). Como resultado, cuando la mitocondria incrementa fuertemente el consumo de oxígeno y produce ATP en estado 3, su tasa de generación de ROS no sólo no se eleva sino que se reduce de forma considerable hasta valores apenas detectables.

Hay un segundo y quizás más importante mecanismo que ayuda a descender la producción de ROS cuando incrementa la respiración mitocondrial: el descenso en la  $pO_2$  local debido al incremento en el consumo de oxígeno mitocondrial. La  $K_m$  para el oxígeno de los generadores de ROS, a diferencia de la de la citocromo oxidasa, que es muy baja para asegurar la fosforilación oxidativa continua a baja  $pO_2$ , es comparativamente mucho mayor, y está situada dentro del rango fisiológico de la  $pO_2$  celular en los tejidos *in vivo*<sup>9</sup>. De hecho, la generación mitocondrial de ROS es  $pO_2$  dependiente a la  $pO_2$  fisiológica tisular (Hoffman et al., 2007). Así, el descenso en la  $pO_2$  local mitocondrial limita fuertemente la generación de ROS debido a la ausencia de uno de sus sustratos: el oxígeno. Cuando el consumo de oxígeno aumenta abruptamente, por ejemplo, hasta 10 veces durante el ejercicio en humanos, y hasta 30-50 veces en caballos (Weibel, 2002), el fuerte incremento en la respiración mitocondrial (estado 3) hace que descienda el oxígeno de los tejidos de alrededor, generando un descenso local en la  $pO_2$  cerca de la mitocondria o incluso en el tejido en general (este último cambio es también adaptativo porque incrementa la extracción del oxígeno desde la hemoglobina en los capilares tisulares en el momento en el que es urgentemente necesitado). A esa baja  $pO_2$ , la alta  $K_m$  (baja afinidad) para el oxígeno de los generadores de ROS limita fuertemente su capacidad para reducir el oxígeno de forma univalente, y desciende fuertemente la producción mitocondrial de ROS. De hecho, Saborido y sus colaboradores encontraron que las

---

<sup>9</sup> Esto es por lo que la producción mitocondrial de ROS aumenta en hiperoxia (Turrens et al., 1982).

mitocondrias conservan su capacidad de generar  $H_2O_2$  en estado 3, pero que dicha capacidad sólo se expresa cuando las medidas se llevan a cabo en un medio hiperóxico (Saborido et al., 2005); en esta condición la producción de ROS no está limitada por la ausencia de sustratos porque, cuando el oxígeno es tan abundante, el consumo de oxígeno mitocondrial en estado 3 no es suficientemente alto para hacer descender la  $pO_2$  local cerca de los generadores mitocondriales de ROS.

El fuerte descenso en la producción mitocondrial de ROS durante la transición energética del estado 4 al estado 3 de la cadena respiratoria mitocondrial permite a los animales desarrollar un alto metabolismo aeróbico y alta actividad sin incurrir en un indeseable alto daño oxidativo.

Junto con la transición energética del estado 4 al 3, existen otras situaciones en las que pueden ocurrir variaciones independientes del consumo de oxígeno y de la producción de ROS mitocondriales, como puede ocurrir, por ejemplo, durante incrementos crónicos en la tasa metabólica (durante el ejercicio y el hipertiroidismo) y bajo la restricción de dieta (revisado en Barja, 2007).

### **3.6. Producción de radicales libres en la cadena respiratoria mitocondrial y su relación con el envejecimiento**

La producción de ROS ocurre de forma continua a lo largo de la vida de los organismos a una tasa específica de cada especie, independientemente de la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial pero relacionada con su longevidad (Lopez-Torres and Barja, 2008). Así, hay datos disponibles de distintos estudios comparativos que muestran cómo la producción mitocondrial de ROS es menor en especies animales longevas que en las de vida corta (Barja et al., 1994; Lambert et al., 2007; Robert et al., 2007).

La generación mitocondrial de ROS es consecuencia de la fosforilación oxidativa, proceso que, como se ha comentado, usa la oxidación controlada del NADH o del FADH para generar una energía potencial de protones a lo largo de la membrana mitocondrial interna. Esta energía potencial es usada para fosforilar el ADP vía  $F_1-F_0$  ATPasa. En muchos sitios de la cadena respiratoria mitocondrial, los electrones derivados del NADH o FADH pueden reaccionar directamente con el oxígeno y generar radicales libres (Balaban et al., 2005)

Para que tenga lugar la generación de radical superóxido por reducción del oxígeno molecular son necesarios una serie de requerimientos termodinámicos, de forma que el donante de electrones ha de tener un potencial redox ( $E_m$ ) menor que la pareja  $O_{2(g)} / O_2^{\cdot-}$ ; que se sitúa en torno a  $-0,14$  V; valores más negativos indican una tendencia reductora, mientras

que valores más altos son indicativos de una tendencia oxidante (Muller, 2000). Así, en función de sus potenciales redox, los complejos II y IV quedan descartados como generadores de superóxido, ya que ambos presentan valores de Em mayores que los de la pareja  $O_{2(g)} / O_2^{\cdot-}$ ; además, diferentes estudios en mitocondrias funcionales también han demostrado la ausencia de producción de radicales libres en ambos complejos (Barja and Herrero, 1998; Chance et al., 1979).

Por su parte, y teniendo en cuenta los potenciales redox así como diversos estudios donde se ha investigado la generación de ROS en mitocondrias, se ha sugerido que son los **complejos I y III** los principales contribuidores a la producción mitocondrial de radicales libres (Boveris et al., 1976; Herrero and Barja, 2000; Kudin et al., 2005; Kushnareva et al., 2002; Muller et al., 2008). La inhibición química de los complejos I y III causa un incremento muy marcado en la formación de radicales libres indicando, por tanto, que cualquier alteración en la función de la cadena respiratoria podría ser realmente dañina para la célula (Dufour and Larsson, 2004). Sin embargo, existen estudios que demuestran de forma consistente que el complejo I produce la mayoría de los ROS generados en mitocondrias intactas de mamíferos *in vitro*, y que la importancia fisiológica de la generación de ROS por parte del complejo III es limitada (Hirst et al., 2008). **En relación con el envejecimiento**, tema central de la presente tesis doctoral, es el **complejo I el generador más determinante de ROS** en las mitocondrias de células sanas y parece ser que, dentro de este, los sitio de unión para el NADH y para la quinona son los principales lugares de producción de radicales (Hirst et al., 2008). Otros estudios que sustentan esta idea son los comparados (Barja, 1999a; Barja and Herrero, 1998), donde la anteriormente comentada menor producción mitocondrial de radicales libres que se observa en especies de vida larga (paloma) frente a aquellas de corta longevidad ocurre principalmente a nivel del complejo I y no del III<sup>10</sup>. De igual forma, en experimentos de restricción de dieta (que incrementan la longevidad) se ha visto una reducción en la producción de ROS por las mitocondrias de corazón e hígado exclusivamente en el complejo I pero no en el III (Gredilla et al., 2001b; Lopez-Torres et al., 2002).

Asimismo se ha propuesto que la producción de radicales libres en el complejo I está dirigida hacia la matriz mitocondrial por la disposición general del complejo en la membrana mitocondrial interna y la localización de su región hidrofílica (que contiene todos los centros hierro-sulfurados) hacia la matriz (Kudin et al., 2005; St-Pierre et al., 2002), mientras que no existe un acuerdo sobre la direccionalidad de la producción del complejo III, habiendo estudios que hablan de que toda la producción se dirige al espacio intermembrana (Kudin et al., 2005; St-Pierre et al., 2002) y otros que hablan de que la mitad se dirige al espacio intermembrana y la otra mitad hacia la matriz (Muller et al., 2004). La importancia de la direccionalidad de la generación de radicales libres residiría en que la tasa de daño oxidativo a moléculas claves

---

<sup>10</sup> Pues la diferencia en la producción de radicales libres observada entre estas especies usando succinato como sustrato desaparece tras la adición de rotenona.

## Introducción

como el ADN mitocondrial vendría determinada también en mayor medida por el complejo I que por el III, con las consecuencias que para el envejecimiento conllevaría y la posibilidad de que una modulación en la producción de ROS por parte del complejo I modulase asimismo el daño oxidativo al ADN mitocondrial (Barja, 2004).

#### 4. COMPONENTES MACROMOLECULARES Y LONGEVIDAD

Clásicamente, la protección celular frente al daño oxidativo incluye sistemas de eliminación de radicales libres así como de reparación / recambio<sup>11</sup>. Estudios recientes, sin embargo, apoyan la idea de otra línea de defensa basada en la **susceptibilidad inherente de las macromoléculas al daño oxidativo**. Esta susceptibilidad, definida como la facilidad a sufrir daño oxidativo, está intrínsecamente asociada con la composición química específica de las proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos. En el contexto del estrés oxidativo, es especialmente relevante enfatizar que: a) los residuos de **metionina** de las proteínas son de los aminoácidos **más susceptibles a la oxidación por radicales libres** (Stadtman et al., 2005); b) de las 4 nucleobases, **la guanina** tiene el menor potencial de oxidación por lo que, generalmente, **se oxida con más facilidad** (Bjelland and Seeberg, 2003); c) los **ácidos grasos altamente insaturados** de las membranas celulares son las macromoléculas **más susceptibles al daño oxidativo** en las células, sensibilidad que se incrementa en función del número de dobles enlaces (Hulbert et al., 2007). Finalmente, d) la reactividad de los carbohidratos, centrándonos especialmente en los monosacáridos de interés biológico, depende de su existencia en la estructura abierta (carbonilo) o en anillo (hemiacetal o hemiquetal). La glucosa es el monosacárido más estable y menos reactivo (Bunn and Higgins, 1981).

Con estas premisas, los datos disponibles muestran que en vertebrados homeotermos longevos (mamíferos y aves): a) las proteínas celulares tienen un menor porcentaje de metionina (Portero-Otin et al., 2004; Ruiz et al., 2005); b) la guanina es el nucleótido menos abundante en el ADN mitocondrial (Samuels, 2005); c) los ácidos grasos altamente insaturados (con más de dos dobles enlaces) son menos abundantes en las membranas biológicas (Hulbert et al., 2007; Pamplona and Barja, 2003) y d) la glucosa se revela como el combustible metabólico universal y es el monosacárido más abundante (Bunn and Higgins, 1981).

Como norma, las reacciones químicas en las células vivas se encuentran bajo un estricto control enzimático, de acuerdo con un programa metabólico estrechamente regulado. Un importante factor implícito a la evolución biomolecular es la minimización de reacciones laterales no deseadas. No obstante ocurren reacciones incontroladas y potencialmente deletéreas, incluso bajo condiciones fisiológicas. Así pues, a partir de los datos disponibles se puede inferir que, a lo largo de la evolución, las especies animales aerobias de vida larga fueron disminuyendo la abundancia relativa de los componentes estructurales más sensibles al daño oxidativo, obteniendo de esta manera una mayor estabilidad estructural y una menor susceptibilidad al estrés oxidativo (Pamplona and Barja, 2007).

---

<sup>11</sup> Considerados como la primera y la segunda línea de defensa, respectivamente.

## 5. DAÑO OXIDATIVO A MACROMOLÉCULAS

¿Cuáles son las dianas de los radicales libres endógenos? Las principales clases de macromoléculas biológicas: lípidos, ácidos nucleicos, proteínas e hidratos de carbono son susceptibles al ataque oxidativo. Aunque la oxidación de todas estas macromoléculas es una de las consecuencias naturales de la vida aeróbica, su modificación oxidativa suele alterar la función que desempeñan en la célula poniendo en riesgo la homeostasis celular y pudiendo, con ello, provocar la muerte del individuo. La importancia del ataque oxidativo a cada una de estas moléculas dependerá, en principio, de la intensidad de producción de radicales libres y de la mayor o menor dificultad de reparación del mismo.

### **5.1. Lípidos**

Las primeras investigaciones sobre la destrucción de moléculas biológicas por los radicales libres se centraron en los lípidos (Gutteridge and Halliwell, 1990).

El radical hidroxilo, el oxígeno singlete, radicales halogenados o el radical perhidroxilo son capaces de iniciar la peroxidación lipídica. El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, aunque carecen de la reactividad necesaria para atacar a los lípidos, en presencia de metales de transición podrían generar un daño importante en las membranas, siempre a través de la formación de radicales hidroxilo.

La peroxidación lipídica altera las membranas biológicas en las que tiene lugar provocando un aumento del orden y viscosidad, así como descensos en su resistencia eléctrica. También facilita el intercambio de fosfolípidos entre las dos monocapas e incrementa los entrecruzamientos con proteínas, lo que disminuye la movilidad lateral y rotacional de las mismas (Richter, 1987). Además, junto al daño directo a lípidos, la peroxidación lipídica conlleva una serie de reacciones paralelas, que determinan la formación de compuestos cíclicos, endoperóxidos que, al descomponerse, forman productos como el malondialdehído (MDA), que es el marcador más ampliamente utilizado, el 4-hidroxinonenal (4-HNE), 4-hidroxihexenal (4-HEE) o alcanos que aparecen en el aire espirado<sup>12</sup>. Todos estos productos son muy reactivos, y tienen la capacidad de reaccionar con otras moléculas como proteínas y ADN. Tanto el 4-HNE como el 4-HEE inducen disfunción endotelial y muerte celular por apoptosis, pues ambos generan interrupciones en la membrana mitocondrial haciendo que ésta libere citocromo c al citosol, donde interactúa con las caspasas, lo que conduce a la muerte celular programada (Vargas et al, 2007).

---

<sup>12</sup> Base del único método de medida no invasivo.

La composición de los ácidos grasos de las membranas celulares juega un papel muy importante en la peroxidación lipídica y, como se ha señalado en el apartado anterior, puede intervenir en la determinación de la longevidad máxima. Así, un menor grado de insaturación de los ácidos grasos en las membranas, particularmente en la membrana mitocondrial interna, podría ser ventajoso y resultar en una disminución en su sensibilidad a la peroxidación lipídica (Pamplona and Barja, 2007). De acuerdo con esto, se ha visto que los animales longevos, (aves y mamíferos) tienen un menor grado de insaturación de los ácidos grasos (menor índice de dobles enlaces, DBI, e índice de peroxidizabilidad, PI)<sup>13</sup> que los de vida corta (Hulbert, 2005; Hulbert et al., 2007; Pamplona and Barja, 2003; Pamplona et al., 2002a; Sanz et al., 2006d). También se ha visto que las aves, que son mucho más longevas que los mamíferos, también tienen un menor DBI que los mamíferos de igual tamaño corporal y tasa metabólica (Pamplona et al., 1999a,b); al estudiar la intensidad de la peroxidación lipídica en estas especies se observó que el bajo DBI de distintos órganos de los animales longevos actúa protegiendo a sus tejidos frente a la peroxidación lipídica de forma constitutiva, tanto si sus tasas metabólicas son bajas (en el caso de los mamíferos de gran tamaño corporal) o altas (en el caso de las aves) (revisado en Pamplona and Barja, 2007).

### **5.2. Proteínas**

Hasta hace poco tiempo, la oxidación proteica ha recibido menos interés que el daño oxidativo a los lípidos y al ADN, posiblemente debido a que los productos de este proceso se acumulan en menor proporción. No obstante, el incremento en el daño oxidativo a las proteínas asociado al envejecimiento tiene relevancia fisiológica para el organismo, pues estas macromoléculas constituyen los principales componentes de los sistemas biológicos y juegan un importante papel en gran variedad de funciones celulares, como por ejemplo la transducción de señales, mitosis o sistemas de transporte celulares.

El daño oxidativo a proteínas se puede producir a través de distintos procesos, como por ejemplo la formación de grupos carbonilo, reacciones con aldehídos, nitración de residuos de aminoácidos aromáticos, oxidación de grupos sulfidrido, entrecruzamientos proteína-proteína o proteína-ADN, fragmentaciones proteicas y conversiones de unos aminoácidos en otros (como ocurre con la transformación de histidina en asparagina) (Vargas et al., 2007).

Casi todos los aminoácidos presentes en las proteínas son dianas potenciales para la oxidación por parte de los radicales libres, pero difieren marcadamente en la facilidad con que se oxidan sus cadenas laterales (Hoshi and Heinemann, 2001)<sup>14</sup>. De todos los aminoácidos, la metionina y la cisteína son extremadamente sensibles al daño oxidativo y, a diferencia de lo

---

<sup>13</sup> DBI, del inglés *Double Bound Index*, y PI, del inglés *Peroxidizability Index*.

<sup>14</sup> Siendo el radical hidroxilo, al igual que en lípidos, el principal iniciador de este ataque.

que ocurre con otros aminoácidos, su oxidación es reversible (Stadtman et al., 2005); así, la metionina es oxidada a metionina-sulfóxido, y la cisteína a varios productos, como disulfuros, productos S-nitrosilados, ácido sulfinico y ácidos sulfónico. Además, la fenilalanina y el triptófano son oxidados a derivados hidroxilo, la tirosina a nitrotirosina, y la histidina a 8-oxohistidina (Bokov et al., 2004).

Entre los procesos de daño a proteínas destaca la oxidación catalizada por metales. En hígado de rata, la mayoría de los carbonilos proteicos generados mediante la oxidación catalizada por metales de la poliarginina y poliprolina y de la polilisina los constituyen los semialdehídos glutámico (GSA) y aminoalifático (AASA) (Requena et al., 2001). Aunque la extensión general de la oxidación proteica frecuentemente se estima midiendo el contenido en carbonilos, la fidelidad de las técnicas empleadas se ha puesto en duda y los estudios sobre variaciones en los niveles de carbonilos proteicos con la edad son contradictorios; además, los compuestos carbonilo representan tan sólo una fracción de los aminoácidos que son dañados oxidativamente, por lo que en realidad representan una subestimación de la extensión del daño oxidativo (Requena et al., 2001).

Los aldehídos que surgen de la oxidación de lípidos y carbohidratos (como MDA y 4-HNE) también pueden modificar oxidativamente a las proteínas, causando daños en las mismas por reacciones con residuos nucleofílicos de distintos aminoácidos, como los grupos amino de las lisinas, los sulfidrilos de las cisteínas o los grupos imidazol de las histidinas (Pamplona and Barja, 2007), y también por la interacción con radicales alcoxilo y peroxilo (Refsgaard et al., 2000). La modificación de los aminoácidos en las proteínas por productos de la peroxidación lipídica resulta en la formación química no enzimática de una variedad de aductos colectivamente llamados ALEs (del inglés *Advanced Lipoxidation Endproducts*) (Thorpe and Baynes, 2003). Estos ALEs incluyen, entre otros, el aducto N $\epsilon$ -(malondialdehído)-lisina (MDAL) generado por la reacción con el MDA derivado de los procesos de peroxidación lipídica (Pamplona et al., 1998), y pueden servir como indicadores del estrés proteico lipooxidativo *in vivo*. En este contexto, y de acuerdo con la teoría mitocondrial de envejecimiento por radicales libres, se ha demostrado que en especies animales longevas, un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos, tanto total como mitocondrial, va acompañado de una baja concentración de aductos derivados de la lipooxidación en varios tejidos y proteínas mitocondriales (Hulbert et al., 2007; Pamplona et al., 2002a).

### **5.3. Hidratos de Carbono**

Reacciones oxidativas y, por inferencia, el estrés oxidativo y los ROS, catalizan la modificación química que los azúcares reductores ejercen sobre los residuos de aminoácidos en las proteínas (principalmente cisteína, histidina, y lisina) a través de la reacción de Maillard

(glicosilación proteica no enzimática). Los carbonilos formados durante la oxidación de los carbohidratos se han identificado como los intermediarios en la formación irreversible de AGEs (del inglés **Advanced Glycoxidation End-products**) en las proteínas (Thorpe and Baynes, 2003). Algunos de los compuestos más caracterizados derivados de estas reacciones y que sirven de indicadores específicos de daño glicooxidativo a proteínas *in vivo* son Nε-(carboximetil)-lisina (CML)<sup>15</sup> y Nε-(carboxietil)-lisina (CEL).

Durante la reacción de Maillard, los azúcares reaccionan de forma no enzimática con proteínas intra y extracelulares para formar aductos proteicos y entrecruzamientos, que pueden contribuir al deterioro de la estructura y función proteica y, por tanto, al proceso de envejecimiento (Pamplona and Barja, 2007). Numerosos estudios avalan esta idea, y muestran cómo la tolerancia a la glucosa disminuye progresivamente con la edad mientras que los AGEs aumentan con la edad tanto en la matriz celular como en el compartimento intracelular. Por su parte, la restricción de dieta, que se sabe que incrementa la longevidad, mejora la tolerancia a la glucosa en ratas y monos, y desciende la glicooxidación en roedores, mientras que dietas ricas en azúcares incrementan la glicooxidación y disminuyen la longevidad en ratas (Murtagh-Mark et al., 1995). El deterioro en la tolerancia a la glucosa asociado al envejecimiento podría ser un proceso que determine la longevidad; esto se ha comprobado en *Caenorhabditis elegans* donde se observó como modelos mutantes de elevada longevidad presentaban tasas bajas de acumulación de AGEs (Gerstbrein et al., 2005).

Además, los AGEs también pueden interactuar con los ácidos nucleicos y formar aductos con el ADN. Estas modificaciones son incluso más graves que las que sufren las proteínas pues pueden llevar a la producción de mutaciones. Numerosos estudios han demostrado que la estructura y la función del ADN se ven afectadas tras interactuar con azúcares reductores como la glucosa y la fructosa, entre otros (Levi and Werman, 2001).

### **5.4. ADN**

El daño oxidativo al material genético es el más importante para el envejecimiento y, al mismo tiempo, el más difícil de subsanar. Cuando todas las copias de un gen resultan dañadas, la información codificada en el mismo se pierde de manera definitiva para la célula. Por otro lado, la alteración oxidativa sobre el resto de las moléculas biológicas (proteínas, lípidos y carbohidratos) puede subsanarse partiendo de la información escrita en los genes (Barja et al., 2005). Aunque esta sección se centra en los ácidos nucleicos que constituyen el ADN, cabe mencionar que el ARN es más susceptible al estrés oxidativo, tanto *in vivo* como *in vitro* (Hofer et al., 2006).

---

<sup>15</sup> Este aducto también deriva de procesos lipoperoxidativos.

Como se ha mencionado anteriormente, los metales de transición juegan un papel muy importante en el daño oxidativo. Aunque ni el radical superóxido ni el peróxido de hidrógeno pueden atacar al ADN, en presencia de dichos metales dan lugar al radical hidroxilo, que si tiene la reactividad suficiente para atacarlo.

El daño oxidativo a los ácidos nucleicos incluye aductos de bases y grupos azucarados, roturas simples y dobles de cadenas y entrecruzamientos con otras moléculas; en total se han descrito más de 20 tipos distintos de daño oxidativo (Cooke et al., 2003). La base modificada más estudiada es la guanina. La oxidación de esta base en el carbono 8 da lugar a la formación de la base modificada 8-hidroxiguanina; su nucleósido, la **8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG)** es el biomarcador más utilizado para cuantificar el daño oxidativo al ADN, y se estima que constituye cerca del 5% del total de daño oxidativo al ADN (Dizdaroglu, 1992). Se trata de una base altamente mutagénica, que inhibe la metilación y tiene el potencial de aparearse con adenosina en lugar de citosina durante la replicación del ADN, dando lugar a transversiones G:C→A:T, el tipo más frecuente de mutación espontánea (Moriya, 1993).

Aunque el ADN mitocondrial tan solo comprende cerca del 1% del ADN total presente en la célula, numerosos datos sugieren que su contribución a la fisiología celular podría ser bastante mayor que la que sugiere su cantidad o tamaño. Así, el **ADN mitocondrial** presenta importantes diferencias con el nuclear, que explican el **ataque oxidativo más intenso** al que se ve sometido y su **mayor importancia en el envejecimiento** (Barja and Herrero, 2000; Hamilton, 2001). Por un lado, su localización junto a la principal fuente de ROS, la cadena respiratoria (Stuart et al., 2005), probablemente impida la actuación de los antioxidantes y, dado que la membrana mitocondrial interna es muy rica en ácidos grasos insaturados, su oxidación puede dar lugar a compuestos que incrementen el daño al ADN mitocondrial (Pamplona et al., 2004). Además, el ADN mitocondrial carece de histonas que lo protejan, tiene una mayor densidad de información y se transcribe completamente, por la ausencia de intrones, a diferencia del ADN nuclear que posee intrones y exones, por lo que una mutación siempre afectará a la información que codifica para proteínas o ARNs funcionales.

El nexo de unión más probable entre la producción de radicales libres y el envejecimiento es el daño oxidativo al ADN mitocondrial. Así, se ha observado una **correlación negativa entre la longevidad máxima y los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial** de corazón y cerebro de animales homeotermos (mamíferos y aves), cosa que no ocurre en el nuclear (Barja and Herrero, 2000). Dicha correlación negativa tiene una mayor importancia que los posibles aumentos de la 8-oxodG con la edad, ya que este marcador de daño oxidativo no se acumula en gran medida, pues se repara tanto en el núcleo como en la mitocondria, quizás de forma más intensa en esta última (Bohr, 2002); así, los radicales libres también podría provocar, junto con la 8-oxodG, otros tipos de daño al ADN, algunos de los cuales podrían no ser reparados eficientemente y acumularse durante el envejecimiento (Barja et al., 2005). Estos

cambios irreversibles, mutaciones somáticas, se incrementan a lo largo de la vida en células con escaso potencial proliferativo y alta demanda energética. La relativamente alta tasa de producción mitocondrial de ROS en animales de vida corta podría ser una causa de su mayor carga mutacional durante el envejecimiento, que aparece a los 70-100 años en humanos mientras que en roedores solo a partir de los 2-3 años de vida (Wang et al., 1997). Además, puesto que la presencia de la 8-oxodG en el ADN es mutagénica (Kim et al., 2004), la concentración más alta de 8-oxodG que presentan los animales de vida corta en relación con los longevos podría contribuir de forma adicional a su mayor tasa de acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial. Esta acumulación de mutaciones tiene como resultado un compromiso en la función mitocondrial, que se hace progresivamente mayor a lo largo de la vida lo que supone, entre otros cambios, deficiencias en la cadena respiratoria mitocondrial y, finalmente, una limitación en la producción máxima de ATP para su utilización en el metabolismo celular (Short et al., 2005). Además, las enzimas responsables de importar las proteínas reparadoras del ADN a la mitocondria se deterioran con la edad, probablemente debido al daño oxidativo (Szczesny et al., 2003).

Para evitar la acumulación gradual de lesiones oxidativas, el daño al ADN es reparado a través de distintos mecanismos. En general, las bases oxidadas del ADN son eliminadas mediante mecanismos de reparación por escisión de bases y, aunque estos mecanismos correctores muestran alta fidelidad, las lesiones del ADN todavía pueden acumularse con la edad. Las enzimas ADN polimerasas tienen una capacidad correctora de errores y, al estudiar modelos de ratón mutante para la subunidad reparadora de la polimerasa y mitocondrial se observó un incremento de 3 a 5 veces en las mutaciones mitocondriales, así como un descenso en la longevidad de los ratones (Kujoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2004). Estos cambios no fueron acompañados de un aumento en el estrés oxidativo, sino que este no se alteró, pero sí se observaron fenómenos apoptóticos (Kujoth et al., 2005).

La apoptosis (suicidio celular) es la defensa más efectiva frente al daño al ADN y mutaciones cuando las enzimas de reparación del ADN no pueden reparar el daño. Pero la inducción de p53 tras la irradiación UV desciende con la edad, al igual que descienden las proteínas reparadoras del ADN (Goukassian et al., 2000). El resultante descenso en la reparación del ADN asociado con un descenso en la apoptosis para el ADN dañado podría contribuir al cáncer y, probablemente, al envejecimiento.

## 6. RESTRICCIÓN DE DIETA Y ENVEJECIMIENTO

A lo largo de la historia de la humanidad muchas sociedades han reconocido los efectos beneficiosos que la limitación en el consumo de alimento, bien por cuestiones religiosas o bien por escasez de comida, ejerce sobre la salud y el bienestar general.

Los estudios desarrollados durante las 7 últimas décadas indican que la **restricción de dieta (RD)**, sin llegar a la malnutrición, es la manipulación experimental mejor conocida capaz de **descender la tasa de envejecimiento** y de **incrementar la longevidad media y máxima de los animales**. Ya en 1935, McCay y sus colaboradores demostraron cómo la RD a largo plazo sin malnutrición en ratas de laboratorio, comenzando temprano tras el destete, extendía su longevidad máxima (McCay et al., 1935). Numerosos investigadores confirmaron posteriormente este resultado, y demostraron que la RD extiende la longevidad en un amplio rango de organismos, incluyendo levaduras, rotíferos, arañas, nematodos, peces, roedores de laboratorio y, probablemente, primates, incluyendo los humanos (Mattison et al., 2007; Roth et al., 2004).

Las personas más longevas son los habitantes de las islas japonesas de Okinawa, que consumen un 40% menos de calorías que los norteamericanos y viven 4 años más, lo que representa tan sólo un 5% de incremento en la esperanza de vida (Willcox et al., 2000); dicho incremento es mucho menor que el encontrado en ratas de laboratorio sometidas a un 40% de RD, cuya esperanza de vida se extiende en casi un 25% (Everitt et al., 2005). Sin embargo, los okiwanenses difieren de los norteamericanos en la genética, dieta y estilo de vida, y por tanto cualquier comparación directa de las causas de las diferencias en la esperanza de vida es compleja.

Junto con el efecto que ejerce la RD en la longevidad, esta intervención nutricional también atenúa la incidencia y progresión de muchas patologías asociadas al envejecimiento como cardiomiopatías, nefropatías, diabetes, enfermedades relacionadas con la hipertensión, enfermedades autoinmunes, neoplasias y varias alteraciones neurodegenerativas como Parkinson o Alzheimer (Martin et al., 2006; Mattson et al., 2002).

Los cambios metabólicos subyacentes a la RD han sido exhaustivamente estudiados en mamíferos. Durante la fase inicial adaptativa el metabolismo, estimado como consumo de oxígeno, disminuye<sup>16</sup>. Como respuesta inmediata a los bajos niveles de glucosa, los animales restringidos degradan rápidamente los almacenes de glucógeno y, cuando dichos almacenes se reducen, las grasas empiezan a romperse para compensar la ausencia de glucosa en sangre (Bertrand et al., 1980). Así, junto con la pérdida de masa grasa, otros de los muchos cambios fisiológicos inducidos por la RD incluyen descensos en el tamaño y la temperatura

---

<sup>16</sup> Aunque tal descenso no se observa cuando la RD se aplica a largo plazo (McCarter et al., 1985).

corporal, y en los niveles de la hormona del crecimiento, IGF-1, hormona estimulante del tiroides y gonadotropinas. En cambio, los niveles de glucocorticoides, catecolaminas y glucagón se incrementan (Mobbs et al., 2001). Los animales restringidos presentan menores niveles de glucosa e insulina en plasma, junto con una mayor sensibilidad a la insulina que los alimentados *ad libitum*. También, como consecuencia de los descensos en los niveles de gonadotropinas, se han observado retrasos en la maduración sexual y en la fertilidad. La modificación de la vía de señalización insulina / IGF-1 en animales sometidos a RD tiene particular interés, ya que se trata de un sistema altamente conservado a lo largo de la evolución que ha sido propuesto como un regulador de la longevidad en una amplia variedad de animales, desde nematodos hasta mamíferos (Gems and Partridge, 2001).

La imposición de un régimen de RD como agente gerontoterapéutico en organismos superiores como el hombre no es tan sencilla como en otras especies animales. La excesiva pérdida de grasa corporal y el concomitante declive de los niveles de los esteroides sexuales asociados a la RD pueden conducir a irregularidades menstruales, amenorrea, adelgazamiento de huesos y al desarrollo de osteoporosis en mujeres. Tampoco hay que despreciar los efectos psicológicos que supondría esta manipulación dietética si se implantara en la sociedad, pues poseemos una extraordinaria conexión emocional con el consumo de alimentos que no poseen otras especies animales.

### **6.1. Restricción de dieta, producción mitocondrial de ROS y estrés oxidativo**

Aunque los efectos de la RD sobre la tasa de envejecimiento y el incremento en la longevidad máxima están bien documentados en diversas especies (revisado en Lopez-Torres and Barja, 2008), todavía no se han esclarecidos los mecanismos moleculares subyacentes. De acuerdo con la teoría mitocondrial de envejecimiento por radicales libres, numerosos investigadores han visto que la **RD** trabaja, al menos en parte, **disminuyendo el estrés oxidativo mitocondrial** (Lopez-Torres and Barja, 2008). Los efectos de la RD sobre la producción de ROS por parte de las mitocondrias fueron primero investigados en ratones (Sohal et al., 1994), y más recientemente se han estudiado en detalle en distintos tejidos de rata; estas investigaciones, habitualmente aplicando un 40% de RD, demuestran de forma consistente que la RD a largo plazo disminuye significativamente la generación mitocondrial de ROS en tejidos de rata incluyendo músculo esquelético, riñón, hígado, corazón y cerebro (Gredilla et al., 2001b; Lopez-Torres et al., 2002; Sanz et al., 2005a). Sin embargo, cuando la RD se aplica a corto plazo (de unas pocas semanas a 4 meses), los descensos se detectan o no en función del tejido estudiado. Por ejemplo, en hígado de rata 6-7 semanas de RD son suficientes para descender la tasa mitocondrial de ROS y el daño oxidativo al ADN mitocondrial (Gredilla et al., 2001a).

## Introducción

Como se ha comentado en la sección 3.6, las mitocondrias producen radicales libres en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial; sin embargo, la RD desciende significativamente la producción de ROS específicamente en el complejo I en cada órgano estudiado hasta la fecha; dicho descenso se da junto a un descenso de la fuga de radicales libres (%FRL, del inglés **Free Radical Leak**), indicando que la eficacia de la cadena respiratoria mitocondrial para evitar la producción de ROS aumenta en los animales sometidos a RD (revisado en Lopez-Torres and Barja, 2008).

Es interesante destacar que el descenso en la generación mitocondrial de ROS observado en ratas restringidas está acompañado de descensos significativos en los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial únicamente, o en el mitocondrial y nuclear, en función del tejido estudiado (revisado en Gredilla and Barja, 2005), así como por disminuciones en el grado de lesión proteica de tipo oxidativo, glicooxidativo y lipooxidativo en proteínas mitocondriales de corazón (Pamplona et al., 2002b, c); aunque en algunos casos (por ejemplo, en hígado de rata) sólo se observaron pequeños cambios en los marcadores proteicos (Lambert et al., 2004).

Los cambios observados en la tasa de producción de ROS así como en los de 8-oxodG en el ADN mitocondrial son sorprendentemente similares a los obtenidos comparando animales con diferentes longevidades, sugiriendo que puede existir un mecanismo altamente conservado de extensión de la longevidad que es el mismo tanto entre especies como dentro de una misma especie, y parecen sugerir que la disminución en la tasa de producción de ROS es un mecanismo común utilizado tanto por animales longevos como por animales sometidos a RD con el objeto de disminuir el estado basal de lesión oxidativa a carbohidratos, lípidos, proteínas y especialmente al ADN mitocondrial y, por tanto, de las mutaciones del ADN mitocondrial y de la tasa de envejecimiento (Pamplona and Barja, 2006).

Por su parte, resultados obtenidos a partir de diversos estudios no apoyan la idea de que ocurra una inducción de la capacidad antioxidante durante la RD (Sohal et al., 1994), y también han encontrado que la reparación de 8-oxodG en el ADN mitocondrial vía reparación de escisión de bases está regulada negativamente en mitocondrias de riñón y cerebro, mientras que no se han visto cambios en las mitocondrias de hígado de animales RD (Stuart et al., 2004). De hecho, la generación de ROS, los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial, y la reparación de 8-oxodG mitocondrial a través de una reparación de escisión de bases descienden de forma similar durante la RD al 40%, cerca de un 30-50% de descenso. Estos resultados sugieren que, de forma similar a lo que ocurre con los niveles de antioxidantes en animales longevos, la reparación de la 8-oxodG mitocondrial es menor en roedores RD, probablemente debido a que su tasa de producción mitocondrial de ROS también es menor que en los alimentados *ad libitum*. Ambos, los sistemas antioxidantes y los sistemas de reparación del ADN mitocondrial pueden inducirse temporalmente cuando se necesitan, descendiendo así los costes energéticos totales. De esta forma, en los animales longevos y

restringidos, que presentan una tasa de generación mitocondrial de ROS disminuida, el daño oxidativo al ADN mitocondrial es menor. Esto representa una estrategia menos costosa y más eficiente y simple que mantener continuamente altos niveles de antioxidantes y sistemas de reparación (Lopez-Torres and Barja, 2008).

## **6.2. ¿Por qué el modelo EOD de restricción de dieta?**

Ya en el año 1956, Eduardo Arias Vallejo publicó en la Revista Clínica Española un estudio de RD en humanos en el cual los sujetos consumían, en días alternos, bien 900 o bien 2300 calorías (una media de 1600). Aunque no se observaron cambios en el peso corporal durante los 3 años que duró el estudio, sí que se apreciaron cambios substanciales en lo que se refiere a la salud de los individuos (Vallejo, 1956). Estudios más recientes también promueven este régimen dietético; se ha visto que en el hombre una pauta de alimentación alterna, donde el consumo está limitado a un 20-50% de los requerimientos diarios estimados un día seguido de alimentación *ad libitum* al siguiente, parece tener efectos promotores de la salud sin pérdida de peso (Johnson et al., 2006).

Una variante de la RD clásica es el método de “alimentación en días alternos” o “alimentación intermitente” (EOD, del inglés *Every Other Day*). Los animales sujetos a este régimen dietético no tienen acceso a comida durante 24 horas, y alimento *ad libitum* durante las 24 horas siguientes. Hay cierta incertidumbre acerca de si la alimentación EOD se debería considerar fundamentalmente una forma leve de RD o como repetidos periodos de ayuno, con la ansiedad que el hambre genera y el estrés contribuyendo a los efectos de este régimen (Piper and Bartke, 2008). La alimentación en días alternos, al igual que la RD clásica, protege a los roedores de laboratorio de las patologías y del declive funcional asociados al envejecimiento, y extiende su longevidad (Goodrick et al., 1990; Ingram and Reynolds, 1987).

Entre los posibles mecanismos responsables del incremento en la longevidad máxima que se observa durante la RD, numerosos datos señalan al estrés oxidativo mitocondrial y a la vía de la insulina como las principales causas de dicho incremento. Es bien conocido que ambos, la producción mitocondrial de ROS (Lopez-Torres and Barja, 2008) y la vía de señalización de la insulina (Masoro et al., 1992), descienden durante la RD, pero los papeles relativos de estos dos factores en la extensión de la longevidad todavía no se han esclarecido. Algunos estudios sugieren la existencia de una relación mecanística entre ellos (Lambert and Merry, 2004) pero no otros (Sanz et al., 2005b). En ratones mutantes enanos *Ames*, que se caracterizan por una mutación en el gen *Prop-1* y, como consecuencia, presentan menores niveles de GH e IGF-1 y viven aproximadamente un 50% más que los ratones no mutantes (Brown-Borg et al., 1996), la RD extiende más allá su longevidad (Bartke et al., 2001). Esto

sugiere que algunos mecanismos responsables de la extensión de la longevidad durante la RD podrían operar independientemente de la vía de la insulina.

Así pues, se necesitan modelos animales capaces de disociar el descenso en el estrés oxidativo de los descensos en la vía de señalización de la insulina durante la RD. Esto se puede obtener usando el modelo de **alimentación EOD en ratones C57BL/6**. Cuando estos ratones se mantienen en un régimen EOD, muestran **incrementos en la longevidad máxima** (Goodrick et al., 1990), y mejoras en la resistencia neuronal al daño, al igual que ocurre en RD, pero sus **niveles plasmáticos de IGF-1** no descienden si no que **pueden incluso incrementarse** (Anson et al., 2003). Esto ofrece un modelo animal único donde se disocian el incremento en la longevidad máxima del descenso en IGF-1 observado en RD clásica. Sin embargo, hasta la fecha no se sabe si la producción mitocondrial de ROS y el estrés oxidativo descienden en este modelo; si descendieran, entonces se podría concluir que el descenso en el estrés oxidativo mitocondrial inducido por la RD puede trabajar de manera independiente de los descensos en IGF-1.

Por otro lado, en modelos clásicos de RD tanto el consumo de calorías como la producción mitocondrial de ROS descienden. Por tanto, no se sabe en qué medida cada uno de estos cambios está asociado con el efecto de extensión de la longevidad de la RD independientemente del otro. El modelo de alimentación EOD en ratones C57BL/6 comentado anteriormente también suministra un modelo capaz de desacoplar las calorías en sí mismas de los estudios de RD, ya que en la cepa de ratón C57BL/6, sometida a EOD, a diferencia de lo que es usual en otras cepas de ratas y ratones, el día que los animales reciben pienso tras el día de ayuno lo compensan comiendo aproximadamente el doble. El resultado es que estos animales **no están sometidos a restricción de calorías. Sin embargo, siguen mostrando un aumento de longevidad máxima** como consecuencia del tratamiento. Es decir, el retraso en el envejecimiento en este modelo no se debe a las calorías en sí mismas (Anson et al., 2003). Este modelo parece ser capaz de desacoplar la restricción de calorías del aumento de longevidad máxima, y nos suministra otra forma de poner a prueba si el descenso de producción de ROS y el descenso del estrés oxidativo mitocondrial subsiguiente están o no ligados al consumo de calorías. Si no lo están, seguirán apareciendo en los ratones C57BL/6 alimentados en días alternos, de acuerdo con su menor velocidad de envejecimiento.

## 7. METIONINA Y RESTRICCIÓN DE DIETA

### **7.1. Breve introducción al metabolismo de la metionina**

Las exhaustivas investigaciones llevadas a cabo durante la pasada década centradas en el metabolismo de la metionina resultaron en importantes aportaciones<sup>17</sup>; gran parte del interés en este campo estuvo motivado por tratar de esclarecer el posible papel de la homocisteína en distintas enfermedades como las cardiovasculares y neurológicas, entre otras.

La metionina es un aminoácido esencial, neutro, que contiene un átomo de azufre. La fuente más importante de metionina son las proteínas de origen animal. Independientemente de su función como precursor en la síntesis proteica, la metionina participa en un amplio número de reacciones bioquímicas entre las que se incluyen la formación de S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH) y homocisteína, incrementando su concentración (Regina et al., 1993). La SAM en si misma sirve de dador de grupos metilo para procesos enzimáticos de metilación, y esta implicada en la síntesis de creatina, epinefrina, melatonina, etc.

La homocisteína tiene un grupo tiol libre que se oxida fácilmente generando puentes disulfuro dentro de las proteínas o entre proteínas distintas. También el grupo metilo de la SAM puede ser atacado por grupos nucleófilos siendo fuertemente reactivo. Estas alteraciones comprometen seriamente el funcionamiento proteico.

La vía de transulfuración es básicamente la única vía del catabolismo de la metionina bajo condiciones fisiológicas. La transulfuración resulta en la transferencia del sulfuro de la metionina a la serina para formar cisteína (Rao et al., 1990). De esta forma, el sulfuro procedente bien de la metionina o de la cisteína acaba siendo oxidado a través de las vías catabólicas de la cisteína a los productos finales sulfato y taurina, que son excretados en la orina.

Las concentraciones tisulares de homocisteína y cisteína se mantienen a bajos niveles gracias a la producción regulada y eficiente eliminación de estos tioles. Así, la suplementación de la dieta con ácido fólico (vitamina B-11) y, en menor medida, con cobalamina (vitamina B-12), es muy efectiva para reducir la concentración de homocisteína, efecto que está mediado por la remetilación de la homocisteína a metionina a partir del N<sup>5</sup>-metil-tetrahidrofolato (Metil-THF) (Melse-Boonstra et al., 2005). Por otra parte, la betaína también puede descender la concentración plasmática de homocisteína. La betaína deriva tanto de fuentes endógenas

---

<sup>17</sup> Una excelente y minuciosa revisión sobre el metabolismo de los aminoácidos sulfurados se puede encontrar en Stipanuk (2004).

(oxidación de colina) como exógenas (de la dieta) (Zeisel et al., 2003); sirve como donador de grupos metilo en la reacción catalizada por la enzima betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT) que convierte la homocisteína a metionina y la betaína a dimetilglicina (Figura 3). La metilación a través de la vía BHMT está confinada al hígado y riñón (Garrow, 2001), mientras que la metilación de la homocisteína catalizada por la metionina sintasa ocurre en todas las células.

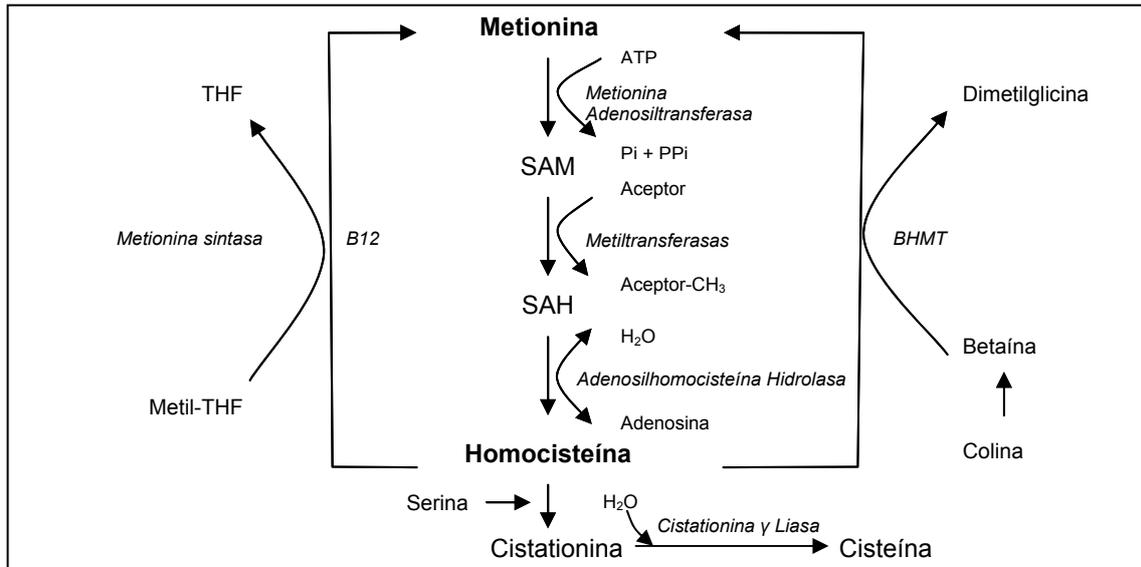


Figura 3. Diagrama simplificado del metabolismo de la metionina.

Así pues, no es extraño que los residuos de metionina de las proteínas sean los aminoácidos más sensibles a la oxidación por acción de los radicales libres; de hecho, y al igual que ocurría con los ácidos grasos de los lípidos, la sensibilidad de las proteínas a la oxidación se incrementa a medida que lo hace el número de residuos de metionina que poseen (Stadtman et al., 2005). La formación de residuos metionina-sulfóxido en las proteínas, como consecuencia de la oxidación, impide que estos residuos ejerzan como donadores de grupos metilo, y puede provocar la pérdida de su actividad biológica (Carp et al., 1982; Ciorba et al., 1997). Esta modificación es reparada por la enzima metionina-sulfóxido reductasa en una reacción dependiente de tiorredoxina; este mecanismo de reparación es muy importante, de manera que los ratones knockout para la metionina-sulfóxido reductasa ven incrementados sus niveles de estrés oxidativo y reducida su longevidad (Moskovitz et al., 2001). Además, la manipulación contraria, es decir, la sobreexpresión de la metionina-sulfóxido reductasa, incrementa la longevidad en *Drosophila melanogaster* (Ruan et al., 2002). Por su parte, la sobreexpresión de la tiorredoxina reductasa, la enzima que se encarga de reducir a la tiorredoxina oxidada, incrementa la longevidad en ratones (Mitsui et al., 2002; Nakamura et al., 2002).

## **7.2. Restricción de metionina**

Numerosos estudios han documentado el descenso en la producción mitocondrial de ROS y lesión oxidativa a macromoléculas durante la RD, pero el factor nutricional que genera dichos efectos es desconocido. La clarificación del factor responsable de la disminución en la producción mitocondrial de ROS y el estrés oxidativo, y del incremento de la longevidad media y máxima durante la RD es una forma de desvelar algunos de los mecanismos fundamentales del proceso de envejecimiento.

En la transición entre los años ochenta y noventa se alcanzó en consenso de que el efecto antienvjecimiento de la RD se debía a la reducción en la ingesta de calorías en sí mismas más que a una disminución de componentes específicos de la dieta. Sin embargo, trabajos recientes cuestionan este clásico consenso, pues parece ser que cambios en los principales componentes de la dieta también modulan la longevidad en roedores (Archer, 2003) e insectos (Mair et al., 2005). Los estudios disponibles no parecen apoyar la posibilidad de que bien la restricción de carbohidratos o la de lípidos, a largo plazo, incrementen la longevidad en roedores de laboratorio. En ratas Fisher 344, la longevidad no se alteró tras la restricción de lípidos (Iwasaki et al., 1988; Shimokawa et al., 1996), mientras que estudios de restricción o suplementación de carbohidratos condujeron a cambios menores y contradictorios en lo que se refiere a la longevidad de las ratas (Khorakova et al., 1990; Ross, 1976).

No obstante, en roedores existen varios estudios que demuestran que la restricción de proteínas incrementa la longevidad máxima. Diez de los once estudios de restricción de proteínas en ratas o ratones (dieciséis de dieciocho experimentos de supervivencia diferentes) observaron incrementos en la longevidad máxima (revisado en Pamplona and Barja, 2006) aunque la magnitud de dicho incremento (alrededor de un 20% de aumento) era menor que la habitualmente descrita para RD (cerca del 40%). Estas investigaciones sugieren, pues, que la restricción proteica podría ser responsable de cerca de la mitad (un 50%) de los efectos de prolongación de la longevidad de la RD, y podría estar de acuerdo con el hecho de que la **restricción de metionina** isocalórica también **incrementa la longevidad máxima** en ratas y ratones (Miller et al., 2005; Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994; Zimmerman et al., 2003). Trabajos recientes llevados a cabo en *Drosophila melanogaster* también avalan la idea de que la restricción de caseína (Min and Tartar, 2006) o de metionina (Troen et al., 2007) incrementan la longevidad independientemente de la cantidad de calorías ingeridas.

Una extensión de la longevidad menor (pero significativa) en la restricción proteica y de metionina que en la RD también concuerda con la noción ampliamente aceptada de que **el envejecimiento es un proceso plurifactorial**, indicando que existe, al menos, una doble vía por la cual la RD actúa sobre la longevidad. De esta forma, la RD podría disminuir la tasa de envejecimiento a través de la disminución en la producción mitocondrial de ROS y el estrés

## Introducción

oxidativo inducido por la restricción proteica y la de metionina, así como a través de otros mecanismos desconocidos posiblemente inducidos por las calorías en sí mismas o por otros componentes de la dieta. Recientemente se ha observado que 6-7 semanas de restricción proteica al 40% disminuye la producción mitocondrial de ROS específicamente en el complejo I, la fuga de radicales libres y la lesión oxidativa al ADN mitocondrial, lípidos y proteínas en mitocondrias de hígado de rata (Sanz et al., 2004), de forma análoga a lo que acontece en mitocondrias de hígado de rata tras 6-7 semanas de un 40% de restricción de calorías (Gredilla et al., 2001a; Ramsey et al., 2004). Es llamativo el hecho de que la magnitud, tipo de cambios, mecanismos y sitios de acción de las disminuciones son similares tanto en restricción de proteínas como de calorías, mientras que la restricción de lípidos y carbohidratos sin restringir el contenido calórico no origina tales descensos (Sanz et al., 2006b, c). Estos resultados sugieren que la restricción de la ingesta de proteínas puede ser la responsable de las disminuciones en la producción mitocondrial de ROS y estrés oxidativo observados durante la RD y, por consiguiente, de parte del aumento de la longevidad máxima que ocurre durante la RD. Por otra parte, usando el mismo protocolo dietético de restricción de metionina con el que se demostró un incremento en la longevidad máxima en roedores (80% de restricción isocalórica de metionina y sustituyendo la metionina por ácido glutámico en la dieta), se encontró que la restricción de metionina también disminuía la producción mitocondrial de ROS, principalmente en el complejo I, la fuga de radicales libres, los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial y de oxidación proteica, el contenido del complejo I y la insaturación de los ácidos grasos en mitocondrias de hígado y corazón de rata (Sanz et al., 2006a). Estos hallazgos sugieren de forma bastante clara que la restricción de la ingesta de metionina podría ser la responsable de la disminución de ROS y estrés oxidativo que tiene lugar en la RD, y de parte del aumento de la longevidad máxima inducido por dicha intervención nutricional (Tabla 1). En cualquier caso, existe una clara necesidad de realizar trabajos adicionales para estudiar: 1. Si los efectos observados son debidos bien a la restricción de la metionina o bien al incremento de glutamato en las dietas experimentales, 2. Si el descenso en el estrés oxidativo mitocondrial también ocurre cuando la restricción de metionina se implanta al 40%, pues es el nivel de restricción generalmente aplicado en los distintos regímenes dietéticos, y 3. Si se puede descartar el posible papel de los demás aminoácidos, vitaminas y minerales de la dieta como los responsables de los efectos de la RD; esto último es posible teóricamente y, además, hay un trabajo que lo sugiere (Segall, 1977), pues se observó que la restricción de triptófano aumentaba la longevidad máxima en ratas, aunque el aumento fue mucho menor que en el caso de la restricción de metionina.

**Tabla 1.** Resumen de los efectos de la restricción de calorías, proteínas, metionina, lípidos y carbohidratos sobre el estrés oxidativo y la longevidad máxima en el hígado (revisado en Lopez-Torres and Barja, 2008).

Parámetro	Restricción calorías (40%)	Restricción proteínas (40%)	Restricción metionina (80%)	Restricción lípidos (40%)	Restricción carbohidratos (40%)
Consumo de oxígeno	=	=	↑	↑	=
Producción de ROS	↓	↓	↓	=	=
Fuga de radicales libres	↓	↓	↓	=	=
Daño al ADN mitocondrial	↓	↓	↓	=	=
Longevidad máxima	↑↑	↑	↑	=	= <sup>a</sup>
Número de estudios	Muchos	16 de 18 <sup>b</sup>	3 de 3 <sup>b</sup>	2 de 2 <sup>b</sup>	2

a= No hay evidencia consistente de cambio.

b= Número de estudios que indican el cambio indicado en la longevidad del total de estudios.

Otras líneas de investigación también avalan la idea de que la metionina puede jugar un papel clave en el envejecimiento y la longevidad (ver apartado 4). Así, recientemente se ha visto que el contenido en metionina de las proteínas tisulares correlaciona consistentemente y de forma inversa con la longevidad máxima en mamíferos (Ruiz et al., 2005). El contenido en metionina en las proteínas también es menor en tejidos de aves longevas que en el de mamíferos de similar tamaño corporal pero de vida más corta (Pamplona and Barja, 2006). Por lo tanto, cuanto mayor sea la longevidad de una especie, menor será su contenido en metionina.

Recientes estudios han visto cómo la restricción de metionina, junto con el incremento en la longevidad de los roedores, también disminuye la incidencia de enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento; así, la restricción de metionina retrasa el desarrollo de cataratas, minimiza los cambios asociados con la edad en las células T, disminuye los niveles séricos de glucosa, insulina, IGF-1 y hormonas, e incrementa la resistencia al daño oxidativo en las células hepáticas en ratones (Miller et al., 2005). La restricción de metionina también disminuye la grasa visceral, en un 40%, y evita los incrementos sanguíneos de triglicéridos y colesterol en ratas (Malloy et al., 2006), frena la división de células cancerígenas (Pavillard et al., 2006) e inhibe la carcinogénesis de colon (Komninou et al., 2006). El fuerte descenso en la grasa visceral señala la posibilidad de que tal cambio, característico de los animales RD, podría no estar necesariamente relacionado con un menor consumo de calorías.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que un exceso de metionina en la dieta daña los órganos vitales e incrementa el estrés oxidativo tisular (Mori and Hirayama, 2000; Stefanello et al., 2005), con similares efectos negativos a los observados en ratas

alimentadas con dietas ricas en proteínas (revisado en Pamplona and Barja, 2006). Recientes investigaciones del grupo de investigación dirigido por el Profesor Barja también indican que un exceso de metionina incrementa la producción mitocondrial de ROS en hígado de rata (datos no publicados). La suplementación crónica de metionina incrementa los niveles de hierro en hígado, la peroxidación lipídica, los dienos conjugados y el colesterol, es hepatotóxica, altera los niveles hepáticos de enzimas antioxidantes y glutatión, y disminuye los niveles de vitamina E en hígado y corazón. También eleva los niveles de homocisteína en plasma de roedores y humanos (Velez-Carrasco et al., 2008; Verhoef et al., 2005), y la hiperhomocisteinemia altera la capacidad de metilación de los tejidos y daña la función endotelial de los microvasos cerebrales (Devlin et al., 2004).

La capacidad de la restricción de metionina de reducir la generación de ROS y la lesión molecular, así como de incidir de forma beneficiosa en la aparición o evolución de muchas enfermedades, y aumentar la longevidad, es muy interesante puesto que estas intervenciones son mucho más fáciles de llevar a cabo que la restricción de calorías. Las poblaciones humanas de los países industrializados habitualmente consumen unos niveles de proteínas del orden de 3-4 veces superior a los valores recomendados (0,5-0,75 g / Kg de peso corporal y día). Por consiguiente, existe un amplio rango de maniobra para conseguir disminuir la cantidad de proteína ingerida. El disminuir únicamente la ingesta de proteínas, o incluso sólo de la metionina, haciendo énfasis en la ingesta de alimentos con un bajo contenido en metionina, y sin necesidad de reducir la ingesta total de calorías ni la cantidad global de alimento, podría constituir una intervención nutricional mucho más fácil de llevar a la práctica que la restricción de calorías, y que también podría disminuir la obesidad y muchas enfermedades degenerativas (Malloy et al., 2006; Miller et al., 2005) así como la tasa de envejecimiento (Richie et al., 1994).

# Objetivos

## Objetivos

La restricción de dieta (RD) disminuye la producción de ROS y el estrés oxidativo mitocondrial, y retrasa la velocidad del envejecimiento; esto parece deberse a la restricción de proteínas, no a la de hidratos de carbono o de grasas, y estudios preliminares en hígado y corazón de rata sugieren que, en particular, es la restricción de metionina la responsable de dichos descensos. Por otra parte, se sabe que tanto la restricción proteica como la de metionina también aumentan la longevidad máxima. En la presente tesis se plantea la hipótesis de que el descenso en la producción mitocondrial de ROS y en el estrés oxidativo, y parte del incremento en la longevidad máxima, que se observan durante la RD se deben a la disminución de la ingesta de una única sustancia: la metionina.

Los estudios preliminares en los que se estudiaron los efectos de la restricción de metionina sobre el estrés oxidativo mitocondrial emplearon un modelo de restricción isocalórica de metionina al 80%, sustituyendo dicho aminoácido por glutamato; este protocolo dietético es el que se sabe que incrementa la longevidad máxima en roedores de laboratorio; en cualquier caso es necesario realizar trabajos adicionales para corroborar esta hipótesis y descartar el posible papel de otros aminoácidos como responsables de los efectos de la RD.

Por ello, el **primer objetivo** fue confirmar que ocurre un descenso en la producción mitocondrial de ROS y en el estrés oxidativo durante la restricción de metionina, para lo cual se diseñaron distintos experimentos. Se estudió el efecto de la **restricción del aminoácido metionina** sin compensarlo con glutamato para así corroborar que los cambios observados no se debían al incremento en los niveles de glutamato sino a la restricción de metionina. Los primeros estudios se llevaron a cabo al 40 y 80% de restricción y, a la vista de los resultados obtenidos en este primer estudio en hígado, se planteó el estudio de la restricción de metionina al 40% en otros órganos: riñón y cerebro. El nivel de restricción del 80% se eligió porque es el que se empleó en estudios previos de restricción de metionina, mientras que el de 40% es el nivel de restricción que se aplica generalmente en la RD. Cada uno de los órganos elegidos para el estudio tiene unas propiedades que les confieren especial interés: el hígado es el órgano más sensible a cambios metabólicos y nutricionales, por lo que este protocolo dietético probablemente tendrá un efecto más marcado en él que en otros tejidos; el cerebro se eligió por su papel capital en el envejecimiento y por ser rico en células postmitóticas, que son las más afectadas por el envejecimiento; por último, la elección del riñón como órgano de estudio se debió a que, por una parte, nunca se ha estudiado a ningún nivel de restricción de metionina y, además, es importante porque los fallos en el riñón son la principal causa de muerte en la rata y se sabe que el exceso de proteína en la dieta ataca específicamente al riñón, aunque el mecanismo a través del cual actúa es desconocido.

Se estudió la tasa de producción de radicales libres y su localización en la cadena de transporte electrónico mediante el uso de distintos sustratos e inhibidores específicos de

## Objetivos

distintos segmentos de la cadena respiratoria, el consumo de oxígeno y el porcentaje de escape de radicales libres en mitocondrias funcionales.

Asimismo, se estimó el efecto de la restricción de metionina sobre la abundancia relativa de los cuatro complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, del regulador maestro de la biogénesis mitocondrial PGC-1 $\alpha$ , de la flavoproteína mitocondrial AIF, por su probable implicación en el ensamblaje / mantenimiento de los complejos respiratorios, específicamente del complejo I, y de la proteína desacoplante UCP4.

El daño oxidativo a proteínas parece jugar un papel determinante en el mantenimiento de la homeostasis celular debido a la influencia sobre la funcionalidad de las enzimas celulares. En base a esto, nos planteamos estudiar también el efecto de la restricción de metionina sobre el daño oxidativo a proteínas mitocondriales mediante el análisis de marcadores específicos de daño oxidativo, lipooxidativo y glicooxidativo. Además, se propuso el estudio del daño oxidativo al ADN mitocondrial, mediante la cuantificación de los niveles de 8-oxodG, dado el relevante papel que parece jugar en los procesos de envejecimiento.

El grado de insaturación de los ácidos grasos, tanto a nivel tisular como mitocondrial, correlaciona el estrés oxidativo con la longevidad máxima; así pues, se analizó la composición lipídica de los distintos tejidos para establecer si la restricción de metionina era capaz de modular la susceptibilidad al estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos en el primer objetivo, junto con otros previos, sugieren que la restricción de metionina disminuye el estrés oxidativo mitocondrial, pero para aclarar si todo el efecto de la RD y de la restricción de proteínas sobre dicho estrés oxidativo se debe al descenso en la ingesta de metionina únicamente, o si también colabora el descenso en la ingestión de algún otro aminoácido, se propuso como **segundo objetivo** el estudio de la **restricción al 40% de todos los aminoácidos de la dieta excepto la metionina** sobre la producción mitocondrial de ROS, la fuga de radicales libres y respiración en mitocondrias funcionales bien acopladas, los niveles de daño oxidativo en el ADN mitocondrial (8-oxodG) y en las proteínas mitocondriales (glico-, lipo-, y oxidación proteica), composición completa en ácidos grasos, los niveles de los complejos respiratorios, así como de los factores que inducen la biogénesis mitocondrial PGC-1 $\alpha$  y NRF-2 en hígado de rata, aspectos que nunca se han estudiado hasta la fecha. Además, este experimento se usó también para clarificar si los cambios en las proteínas AIF y SIRT1 están relacionados, o no, con la restricción de otros aminoácidos diferentes de la metionina. Para comprobar la constancia del metabolismo de la metionina en los dos grupos experimentales, también se midieron dos metabolitos principales del ciclo de la metionina: SAM y SAH. Los nucleótidos de adenina también se analizaron para comprobar los efectos bioenergéticos de este tratamiento dietético a nivel tisular.

## Objetivos

Por otro lado, como se ha comentado en la sección 6.2 de la introducción, los ratones de la cepa C57BL/6 sometidos a un régimen de RD siguiendo el método de alimentación en días alternos EOD ofrecen un modelo animal único que permite disociar la restricción de calorías del aumento de longevidad observado en la RD clásica, así como disociar también los descensos de insulina e IGF-1, típicos de la RD, de dicho aumento de longevidad y su relación con la producción de ROS y el estrés oxidativo mitocondrial. Por esto, como **tercer** y último **objetivo** se planteó estudiar el efecto de la RD mediante el método **EOD en hígado de ratón C57BL/6 sobre la producción mitocondrial de ROS** y los parámetros relacionados con el **estrés oxidativo** que se han comentado para el objetivo 1, excepto los niveles de UCP4; en su lugar, se analizaron los niveles de UCP2 para comprobar la posibilidad de que los cambios en la generación mitocondrial de ROS se deban a un leve desacoplamiento mitocondrial.

Los objetivos que se exponen en la presente tesis doctoral contribuirán a esclarecer las vías a través de las cuales actúa la RD en la modulación de la velocidad de envejecimiento de los mamíferos, y a posibilitar aumentos futuros de la longevidad máxima humana (con calidad de vida y reduciendo la incidencia de las enfermedades degenerativas) gracias a la aplicación de distintos protocolos dietéticos, y mediante la modificación (isocalórica) de proteínas o incluso de una única molécula en la dieta: la metionina.

# Materiales y Métodos

## Diseño experimental

### 1. ESTUDIO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA Y AMINOÁCIDOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL EN LA RATA WISTAR

#### - Modelo 1.1. Restricción de metionina al 40 y 80% en hígado

##### ▪ Dietas

Las dietas fueron preparadas en el Instituto de Nutrición de la Universidad de Granada, por el equipo de investigación supervisado por el Dr. Quiles. Estas dietas semisintéticas e isoenergéticas fueron preparadas de acuerdo con el criterio AIN 93 pero con modificaciones relacionadas con la composición de aminoácidos. La composición detallada de los 3 tipos de dieta empleados en este estudio se muestra en la Tabla 2.

La dieta del grupo control tenía la composición de la dieta AIN 93G (de crecimiento). Las dietas restringidas en metionina diferían de la dieta control en el contenido en metionina: 0,17% en el grupo restringido en metionina al 80% (grupo 80% RMet) o 0,516% en el grupo restringido al 40% (grupo 40% RMet) en lugar del 0,86% de metionina en el grupo control. Estos descensos en el contenido en metionina se compensaron con incrementos en todos los demás componentes de la dieta en proporción directa a su abundancia en la dieta control (Tabla 2). Con este procedimiento, las cantidades ingeridas por día de todos los componentes de la dieta, excepto de metionina, fueron casi idénticas en los tres grupos experimentales.

**Tabla 2.** Composición detallada de los 3 tipos de dieta usadas en este estudio.

Componente	Control (g / 100g)	40% RMet (g / 100g)	80% RMet (g / 100g)
L-Arginina	1,12	1,124	1,128
L-Lisina	1,44	1,445	1,450
L-Histidina	0,33	0,331	0,332
L-Leucina	1,11	1,114	1,118
L-Isoleucina	0,82	0,823	0,826
L-Valina	0,82	0,823	0,826
L-Treonina	0,82	0,823	0,826
L-Triptófano	0,18	0,181	0,181
L-Metionina	<b>0,86</b>	<b>0,516</b>	<b>0,172</b>
Acido L- glutámico	2,70	2,709	2,719
L-Fenilalanina	1,16	1,164	1,168
L-Glicina	2,33	2,338	2,346
Dextrina	5,00	5,017	5,035
Almidón de maíz	43,61	43,762	43,911
Sacarosa	20,0	20,069	20,139
Celulosa	5,0	5,017	5,035
Bitartrato de colina	0,2	0,201	0,201
Mezcla de vitaminas (AIN)	1,0	1,003	1,007
Mezcla de minerales (AIN)	3,5	3,512	3,524
Aceite de maíz	8,0	8,028	8,056
Total	100	100	100

- **Grupos experimentales**

30 ratas Wistar macho de 7 semanas de edad se dividieron en 3 grupos: control, restringido en metionina al 40% (40% RMet) y restringido en metionina al 80% (80% RMet).

El tratamiento dietético duró 7 semanas y, durante ese período, se midió diariamente la ingesta media de todos los animales y, semanalmente, su peso corporal. Los animales controles y 40% RMet recibieron la misma cantidad de alimento por día que los animales del grupo 80% RMet habían comido como media la semana anterior (pair feeding). De este modo se evitó confundir los efectos de la restricción de metionina con los de la restricción de calorías.

### **- Modelo 1.2. Restricción de metionina al 40% en cerebro y riñón**

- **Dietas**

Para este estudio se utilizaron dietas semipurificadas preparadas por MP Biochemicals (Irving, CA, USA), e importadas por MP Biolink (Barcelona), que incluían una mezcla de aminoácidos en lugar de proteína y cuya composición exacta se muestra en la Tabla 3.

En la dieta restringida en metionina, el contenido de este aminoácido se redujo en un 40% respecto al de la dieta control (0,86% en metionina). El descenso de metionina de la dieta del grupo restringido (0,34% en términos absolutos) se compensó con un aumento conjunto de un 0,34% en todos los demás componentes de la dieta, distribuido en proporción a su presencia porcentual en dicha dieta. Con este procedimiento el contenido en todos los componentes de la dieta, exceptuando la metionina, fue prácticamente idéntico en las dos dietas experimentales.

**Tabla 3.** Dietas control y restringida en metionina al 40% (RMet).

Componente	Control (g / 100g)	RMet (g / 100g)
L-Arginina	1,12	1,124
L-Lisina	1,44	1,445
L-Histidina	0,33	0,331
L-Leucina	1,11	1,114
L-Isoleucina	0,82	0,823
L-Valina	0,82	0,823
L-Treonina	0,82	0,823
L-Triptófano	0,18	0,181
<b>L-Metionina</b>	<b>0,86</b>	<b>0,516</b>
Acido L-glutámico	2,70	2,709
L-Fenilalanina	1,16	1,164
L-Glicina	2,33	2,338
Dextrina	5,00	5,017
Almidón de maíz	31,80	31,93
Sacarosa	31,80	31,93
Celulosa no nutritiva	5,0	5,017
Bitartrato de colina	0,2	0,201
Mezcla de vitaminas AIN 93G	1,0	1,003
Mezcla de minerales AIN 93G	3,5	3,512
Aceite de maíz	8,0	8,028
Total	100	100

- **Grupos experimentales**

Cada uno de los dos grupos experimentales: control y restringido en metionina al 40% (RMet) lo conformaron 8 animales, ratas Wistar macho de 7 semanas de edad al inicio del experimento.

El tiempo de restricción fue de 7 semanas; la restricción de metionina se realizó con pesada diaria del alimento, suministrándole a los animales controles la misma cantidad de dieta que los animales del grupo RMet habían ingerido como media la semana anterior (pair feeding), para evitar de esta manera la confusión entre los efectos de la restricción de calorías y los de la de metionina.

### **Modelo 1.3. Restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto metionina en hígado**

- **Dietas**

## Materiales y Métodos

La restricción dietética se realizó mediante dietas semipurificadas preparadas por MP Biochemicals (Irving, CA, USA), importadas por MP Biolink (Barcelona). Las dietas contenían una mezcla de aminoácidos en lugar de proteína. Su composición detallada se muestra en la Tabla 4.

La dieta de los animales controles fue una dieta AIN 93G del Instituto de Nutrición de los Estados Unidos (American Institute of Nutrition, AIN), en la que estaban presentes todos los aminoácidos principales que forman las proteínas animales. La dieta del grupo experimental (RAAS) fue la misma pero con un 40% menos de todos los aminoácidos exceptuando la metionina, que se mantuvo al mismo nivel en las dos dietas.

El descenso porcentual en aminoácidos de la dieta experimental se compensó aumentando el porcentaje de carbohidratos (almidón de maíz), ya que por estudios previos sabemos que este componente no afecta a los parámetros a estudiar ni a la longevidad (Sanz et al., 2006c). Todos los demás componentes de la dieta, aceite de maíz, sacarosa, dextrina, bitartrato de colina, y mezclas de vitaminas y minerales, se mantuvieron exactamente al mismo nivel en ambas dietas.

**Tabla 4.** Dietas control y restringida en aminoácidos excepto metionina (RAAS).

Componente	Control (g / 100g)	RAAS (g / 100g)
L-Arginina	1,12	0,672
L-Lisina	1,44	0,864
L-Histidina	0,33	0,198
L-Leucina	1,11	0,666
L-Isoleucina	0,82	0,492
L-Valina	0,82	0,492
L-Treonina	0,82	0,492
L-Triptófano	0,18	0,108
<b>L-Metionina</b>	<b>0,86</b>	<b>0,86</b>
Acido L-glutámico	2,70	1,620
L-Fenilalanina	1,16	0,696
L-Glicina	2,33	1,398
L-Cistina	0,34	0,204
L-Prolina	0,24	0,204
L-Tirosina	0,34	0,204
Acido L-Aspártico	0,34	0,204
L-Alanina	0,34	0,204
L-Serina	0,34	0,204
L-Asparagina	0,60	0,360
Dextrina	5	5
Almidón de maíz	<b>40,97</b>	<b>47,158</b>
Sacarosa	20	20
Celulosa no nutritiva	5	5
Bitartrato de colina	0,2	0,2
Mezcla de vitaminas AIN 93G	1	1
Mezcla de minerales AIN 93G	3,5	3,5
Aceite de maíz	8	8
Total	100	100

▪ **Grupos experimentales**

Cada grupo estuvo formado por 8 ratas Wistar macho de 7-8 semanas de edad al inicio del periodo experimental.

La exposición a las dos dietas isocalóricas se mantuvo durante 7 semanas. Durante dicho periodo los animales controles recibieron diariamente la misma cantidad de alimento que los restringidos en aminoácidos habían ingerido como media la semana anterior (pair feeding), para evitar la confusión entre los efectos de la restricción de calorías y la de aminoácidos.

**Tabla 5.** Diseño experimental (Objetivo 1).

	<b>ESTUDIO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA AL 40 Y 80% EN HÍGADO</b>			<b>ESTUDIO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA AL 40% EN CEREBRO Y RIÑÓN</b>		<b>ESTUDIO DE LA RESTRICCIÓN DE AMINOÁCIDOS (EXCEPTO METIONINA) AL 40% EN HÍGADO</b>	
<i>Grupo experimental</i>	Control	40% RMet	80% RMet	Control	RMet	Control	RAAS
<i>n ( )</i>	(10)	(10)	(10)	(8)	(8)	(8)	(8)
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<i>Tratamiento</i>	Alimentación <i>ad libitum</i>	Restricción de metionina al 40%	Restricción de metionina al 80%	Alimentación <i>ad libitum</i>	Restricción de metionina al 40%	Alimentación <i>ad libitum</i>	Restricción de aminoácidos (excepto metionina) al 40%
<i>Tejido</i>	Hígado			Cerebro, Riñón		Hígado	
<i>Período</i>	7 semanas			7 semanas		7 semanas	

## 2. ESTUDIO DEL MODELO DE RESTRICCIÓN DE DIETA EOD SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL EN HÍGADO DE RATÓN C57BL/6

En este estudio la manipulación dietética se llevó a cabo mediante alimentación *ad libitum* (grupo control) o ayuno en días alternos en el grupo experimental (grupo EOD). Los animales controles recibieron *ad libitum* todos los días una dieta estándar de crecimiento para rata / ratón, mientras que los animales pertenecientes al grupo EOD recibieron la misma dieta *ad libitum* seguida de ayuno el día siguiente, repitiéndose este patrón durante todo el experimento. Los **ratones** empleados pertenecían a la cepa **C57BL/6**, ya que este modelo animal único permite disociar la restricción de calorías del aumento de longevidad en la restricción dietética EOD, así como disociar también los descensos de insulina e IGF-1, típicos de la RD, del mencionado aumento en la longevidad y su relación con la producción de ROS y el estrés oxidativo mitocondrial.

Cada grupo (control y EOD) estuvo compuesto por 14 ratones (grupos duplicados para tener cantidad suficiente de muestra para todas las determinaciones que se llevaron a cabo).

**Tabla 6.** Diseño experimental (Objetivo 2).

		<b>MODELO DE RESTRICCIÓN DE DIETA MEDIANTE AYUNO EN DÍAS ALTERNOS</b>	
<i>Grupo experimental</i> <i>n ( )</i>	Control (14)	EOD (14)	
	↓	↓	
<i>Tratamiento</i>	Alimentación <i>ad libitum</i>	Ayuno en días alternos (Every Other Day feeding)	
<i>Tejido</i>		Hígado	
<i>Periodo experimental</i>		7 semanas	

En la siguiente tabla se indican, de modo muy general, los parámetros que se estudiaron en la presente tesis doctoral, y que se describen con detalle en la sección de métodos.

**Tabla 7.** Resumen de la metodología.

<b>Respiración y biogénesis mitocondrial</b>	<b>Producción de ROS y factores prooxidantes</b>	<b>Marcadores de daño oxidativo a macromoléculas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respiración en Estado 4</li> <li>- Respiración en estado 3</li> <li>- Índice de control respiratorio (RCR)</li> <li>- Cantidad relativa de los complejos I, II, III y IV</li> <li>- PGC-1<math>\alpha</math>, AIF, UCP-2,4, NRF-2, SIRT1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Producción mitocondrial de ROS</li> <li>- Fuga de Radicales Libres (%FRL)</li> <li>- Análisis de la composición de ácidos grasos e índices relacionados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 8-oxodG en el ADN mitocondrial</li> <li>- CML y CEL en proteínas</li> <li>- GSA y AASA en proteínas</li> <li>- MDAL en proteínas</li> </ul>

## Materiales

### 1. EQUIPO INSTRUMENTAL

- Agitador magnético P SELECTA Agimatic E 7002431
- Agitador REAX TOP Heidolph
- Agitador Vortex P SELECTA Heidolph reax 2000
- Balanza de precisión METTLER TOLEDO AB54
- Balanza electrónica AND EW-600A
- Bomba para HPLC GILSON 305 con módulo nanométrico 805
- Campana de extracción
- Centrífuga 32R HETTICH ZENTRIFUGEN
- Centrífuga modelo 5702R, Eppendorff
- Centrífuga HERAUS MULTIFUGE 1S-R Thermo
- Centrífuga refrigerada SORBALL INSTRUMENTS RC5C GIRAL
- Centrífuga SPD121P Thermo Electron Corporation
- Columna analítica C18 4,60 mm (25 cm) (Phenomenex-komasil)
- Columna de HPLC Mediterranea Sea<sub>18</sub> 5  $\mu\text{m}$   $\times$  0,46 cm  $\times$  25 cm TEKNOKROMA
- Columna de HPLC Ultraesphere ODS 5  $\mu\text{m}$   $\times$  4,6 mm  $\times$  25 cm BECKAMN
- Columna Capilar SP2330 30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,20  $\mu\text{m}$
- Columna Capilar 30m HP-5MS 30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$
- Columna de extracción en fase sólida C-18 de 1 ml SUPELCO
- Columna de intercambio iónico DOWEX-50W
- Congelador de  $-80^\circ\text{C}$  FORMA SCIENTIFIC 823
- Cromatógrafo de gases 7890A Agilent Technologies
- Cromatógrafo de gases HEWLETT-PACKARD 6890 Serie II
- Destilador de agua BIBBY MERIT
- Detector electroquímico Coulochem II ESA
- Detector selectivo de masas HEWLETT-PACKARD 5973A
- Detector UV para HPLC BIO-RAD UV-1806
- Electrodo y medidor de oxígeno ESD modelo 600 HANSATECH
- Eppendorfs Whatman 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro MILLIPORE
- Equipo de análisis de imágenes ChemiDoc Bio-Rad
- Espectrofotómetro de masas HEWLETT-PACKARD 5973A
- Espectrofotómetro GENEQUANT Amersham Biosciences
- Espectrofotómetro MILTON ROY Spectronic 601-C
- Espectrofotómetro UV-visible UV-160A SHIMADZU
- Evaporador N-evap Model 111 Organomation Assoc
- Filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro MILLIPORE
- Fluorímetro PERKIN ELMER LS 50B
- HPLC Agilent Technologies Serie 1200
- Homogeneizador mecánico WHEATON INSTRUMENTS
- Homogeneizadores vidrio-teflón de 5 y 2 ml POBEL
- Homogeneizador vidrio-vidrio de 60 ml ALAMO
- Jeringa de cristal de 20 ml con aguja de 10 cm RUTHE
- Membrana de diálisis Servapor (25 amnstrongs) de 29 mm de diámetro SERVA
- Membrana de transferencia Immobilion-P IPVH00010, MILLIPORE
- Microcentrífuga BIOFUGE 13 HERAEUS
- Mili Q Gradient A10 Milipak 40, MILLIPORE
- Multiagitador magnético con placa térmica SBS A-08
- Papel para electrotransferencia de gel 10426996 WHATMAN
- pH / mV-metro CRISON BASIC 20
- Pipetas automáticas GILSON
- Placa Térmica P SELECTA S INVESTER
- Programa de integración GILSON
- Programa Statgraphics Plus 4.0
- Sistema de electroforesis de minigeles Mini-Protean Tetra Cell BIO-RAD
- Sistema de transferencia en submarino BIO-RAD

## Materiales y Métodos

- Sistema de vacío universal UVS400A Thermo Electron Corporation
- Termostatizador con agitación MEMMERT
- Termostatizador P SELECTA tectron 3000543
- Termostato de bloque metálico Tembloc SELECTA
- Vibrador de brazo oscilante Vibromatic-384

## 2. PRODUCTOS QUÍMICOS

- Acetato potásico (Sigma, P-5708)
- Acetato sódico (Merck, TA564567 929)
- Acetil cloruro (Fluka, 00990)
- Acetonitrilo (Panreac, 221881)
- Ácido acético glacial (Panreac, 141008)
- Ácido clorhídrico (Merck, K20520017 403)
- Ácido clorhídrico 37% (Sigma, 25814-8)
- Ácido fosfórico (Merck, K29868563 146)
- Ácido glutámico (Sigma, G-1251)
- Ácido heptanosulfónico (Sigma, H2766)
- Ácido homovalínico (Sigma, H-1252)
- Ácido málico (Sigma, M-9138)
- Ácido ortofosfórico (Fluka, 79607)
- Ácido pirúvico (Sigma, P-8574)
- Ácido tricloroacético (Sigma, T9159)
- Ácido trifluoroacético (Sigma, T8258)
- Acrilamida / Bisacrilamida, 30% (37,5:1) (Bio-Rad)
- Adenosina difosfato (Sigma, A-2754)
- Ácido tricloroacético (Sigma, T9159)
- Agua HPLC (Scharlau, AG-0001)
- Albúmina sérica bovina (Sigma, A-7034)
- Alcohol isoamilo (Merck, K22601379 604)
- Alcohol metílico para HPLC (CARLO EBRA, 412722)
- Anticuerpo anti- $\beta$ actina (A5441, Sigma)
- Anticuerpo anti-AIF (Sigma, A7549)
- Anticuerpo anti-Complejo I, subunidad 39KDa NDUFA9 (Invitrogen, A21344)
- Anticuerpo anti-Complejo I subunidad 30KDa NDUF3 (Invitrogen, A21343)
- Anticuerpo anti-Complejo II subunidad 70KDa (Invitrogen, A11142)
- Anticuerpo anti-Complejo III subunidad Core II (Invitrogen, A11143)
- Anticuerpo anti-Complejo III subunidad FeS (Invitrogen, A21346)
- Anticuerpo anti-Complejo IV subunidad COX I (Invitrogen, A6403)
- Anticuerpo anti-Complejo IV subunidad COX IV (Invitrogen, A21347)
- Anticuerpo anti-NRF2 (H-300) (Santa Cruz Biotechnology, SC13032)
- Anticuerpo anti-Porina mitocondrial (Invitrogen, A31855).
- Anticuerpo anti-PGC-1 (Cayman Chemical, 101707)
- Anticuerpo anti-PGC-1 (Santa Cruz Biotechnology, SC13067)
- Anticuerpo anti-SIRT1 (Abcam, AB28170,)
- Anticuerpo anti-UCP2 (Abcam, AB32592)
- Anticuerpo anti-UCP4 (Santa Cruz Biotechnology, SC17582)
- Antimicina A (Sigma, A-8674)
- Borhidruro de sodio (Sigma, S-9125)
- Buffer TRIS / Glicina / SDS 10x (Bio-Rad, 161-0772)
- Cloroformo (Panreac, 141252 1612)
- Cloruro de magnesio (Sigma M-0250)
- Cloruro de sodio (Panreac, 121659)
- Cloruro de zinc (Merck, B286816 909)
- Cloruro potásico (Sigma, P-4504)
- Colato sódico (Sigma, C-6445)
- 2'-Deoxiguanosina (Sigma, D-7145)
- Diclorometano (Sigma, D-6156-3)
- Dihidrogenofosfato de potasio (Sigma, P-0662)
- Dihidrogenofosfato de sodio (Panreac, 121677)

## Materiales y Métodos

- Disulfuro de carbono (Sigma, 27066-0)
- Dodecilsulfato sódico (Sigma, L-4509)
- EDTA-Na<sub>2</sub> (Sigma, E-1644)
- EGTA (Sigma, E-4378)
- Etanol, grado HPLC (Panreac, 361086)
- Ficoll (Sigma, F-4375) (cerebro)
- Fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Sigma, P-5521)
- Fosfato dipotásico (Panreac, 141512)
- Fosfato monopotásico (Panreac, 141509)
- Glicerina (Panreac, 142329)
- Glicina (Merk, 1.04201.0100)
- Glicina ultrapura, grado MB (USB Corporation, 16407)
- Glucosa (Sigma, G-8270)
- Glucosa oxidasa (Sigma, G-0543)
- Hepes (Sigma, H-3375)
- 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (Sigma, H-5653)
- Hidróxido de potasio (Fluka, 60369)
- Hidróxido de sodio (Panreac, 141687)
- Helio (Carburos metálicos)
- 1-Hexanol (Fluka, 52830)
- Isopropanol (Scharlau, AL0315)
- Kit de ensayo de Bioluminiscencia de ATP (Sigma, FL-AA)
- Lauril sulfato (Sigma, L-5750)
- Manitol (Sigma, M-4125)
- Metanol (Panreac, 361091)
- Nitrógeno (Air liquid)
- Nucleasa P1 de *Penicillium citrinum* (Sigma, N8630)
- Pentano 98% (Sigma, 15894-1)
- Perclorato sódico (Merck, A170664 934)
- Peroxidasa de rábano (Roche, 10342063)
- RNAsa de páncreas bovino (Roche, 10 109 126 001)
- Rotenona (Sigma, R-8875)
- Sacarosa (Sigma, S-9378)
- S-adenosilhomocisteína (Sigma, A9384)
- S-adenosilmetionina (Sigma, A2408)
- Sal disódica d'adenosina 5'-trifosfato (Sigma, A-3377)
- Sal sódica de adenosina 5'-difosfato (Sigma, A-5638)
- Sal sódica de adenosina 5'-monofosfato (Sigma, A-1752)
- Sulfato de cobre (Probus)
- Superóxido dismutasa (Sigma, S-8160)
- Sustrato quimioluminiscente de la HRP (Millipore)
- Tetraborato de sodio (Sigma, B-0127)
- Tris (Sigma, T-6791)
- Tris(hidroximetil)aminometano ultrapuro grado MB (USB Corporation, 75825)
- TTFA (Sigma, T-9888)

### 3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para todos los experimentos del **estudio 1** se utilizaron ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) suministradas por el animalario de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid que contaban con 7-8 semanas al inicio de la experimentación.

Para el **estudio 2** se emplearon ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6 de 7 semanas de edad al inicio del experimento, procedentes de los Laboratorios Charles River. En esta cepa concreta, y no en otras de ratas y ratones, el animal come casi el doble el día posterior a cada día de ayuno; debido a esto, no sufre una disminución importante en la ingesta

## Materiales y Métodos

calórica, no reduce su peso ni su tasa de crecimiento, y no descienden los niveles de insulina e IGF-1 en plasma en comparación con los controles (cambios todos ellos típicos de la RD clásica y en otros roedores sometidos a restricción de dieta con el método EOD) (Anson et al., 2003). A pesar de ello, esta cepa de ratones también experimenta un aumento de longevidad máxima parecido al de los roedores sometidos a RD clásica (reducción del 40% de la ingesta de alimento y por tanto de las calorías ingeridas) (Goodrick et al., 1990).

Todos los animales fueron enjaulados individualmente, y se mantuvieron en condiciones SPF bien en el animalario de la Facultad de Biología (**Estudio 1**) o bien en el de la Facultad de Medicina (**Estudio 2**), bajo condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), humedad relativa ( $50\% \pm 10\%$ ) y ciclo invertido luz:oscuridad (12:12 horas).

Todos los animales se pesaron a su llegada al animalario y semanalmente durante el periodo experimental. El agua de bebida fue suministrada *ad libitum* y la comida fue administrada diariamente 1 hora antes de comenzar la fase oscura.

En todos los casos se usaron animales macho para evitar interferencias de los ciclos de las hormonas sexuales en las hembras.

Para evitar los efectos depresores de los anestésicos sobre el grado de acoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial, todos los animales se sacrificaron sin emplear para ello ningún tipo de anestesia, por decapitación en el caso de las ratas, y por dislocación cervical en el de los ratones.

El tiempo de experimentación se mantuvo durante 7 semanas en todos los estudios, ya que sabemos por estudios anteriores que la restricción de calorías (clásica al 40%), de proteínas al 40%, y de metionina al 80% disminuyen la producción de ROS y el daño oxidativo a macromoléculas, incluyendo el ADN mitocondrial, a las 7 semanas de experimentación en ratas Wistar de 250-350 gramos (Gredilla et al., 2001a, Sanz et al., 2004, 2006a).

Concluido el tiempo de experimentación, los roedores fueron sacrificados (2 por día, de diferentes grupos experimentales, durante días consecutivos) y los tejidos elegidos para el estudio (hígado para los **estudios 1.1, 1.3 y 2**, y cerebro y riñón para el **estudio 1.2**) fueron procesados de inmediato para medir la respiración mitocondrial y la producción mitocondrial de ROS, congelándose una proporción de los mismos en nitrógeno líquido y manteniéndolos a  $-80^\circ \text{C}$  para el ensayo de los restantes parámetros bioquímicos.

## Métodos analíticos

### 1. PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE ROS, CONSUMO DE OXÍGENO Y FUGA DE RADICALES LIBRES

#### **1.1. Aislamiento de mitocondrias funcionales de:**

##### **- Hígado y riñón**

Para aislar mitocondrias funcionales a partir de hígado de rata (Estudios 1.1 y 2), dicho órgano se procesó de inmediato tras el sacrificio del animal según el método de Gredilla et al. (2001a; Figura 4a).

De este modo, el hígado se extrajo y se depositó en medio de aislamiento con EDTA (manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, Hepes 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,35) congelado, donde se aclaró bien para quitar la grasa de alrededor y se troceó.

Posteriormente se homogeneizó en 60 ml del mismo medio de aislamiento y se repartió en dos tubos para ser centrifugado a 1000g durante 10 minutos y eliminar, de esta forma, los núcleos y restos celulares junto con el pellet. A continuación se filtraron los sobrenadantes a otros tubos y se centrifugaron de nuevo a 10000g otros 10 minutos. Se eliminaron tanto el sobrenadante como la grasa que quedó en las paredes de los tubos, y los pellets se resuspendieron en 40 ml del mismo medio de aislamiento pero sin EDTA. Se llevó a cabo otra centrifugación de 10 minutos de duración a 1000g, el sobrenadante se pasó a otro tubo y se centrifugó otros 10 minutos a 10000g. Finalmente, el pellet mitocondrial obtenido se resuspendió en 1 ml de medio de aislamiento (sin EDTA).

Cuando las mitocondrias se aislaron a partir de riñón de rata (Estudio 1.2) y de hígado de ratón (Estudio 2) el protocolo a seguir fue el mismo, pero añadiendo la mitad del volumen de los medios de aislamiento en todos los pasos (los volúmenes se muestran entre paréntesis en la Figura 4a).

##### **- Cerebro**

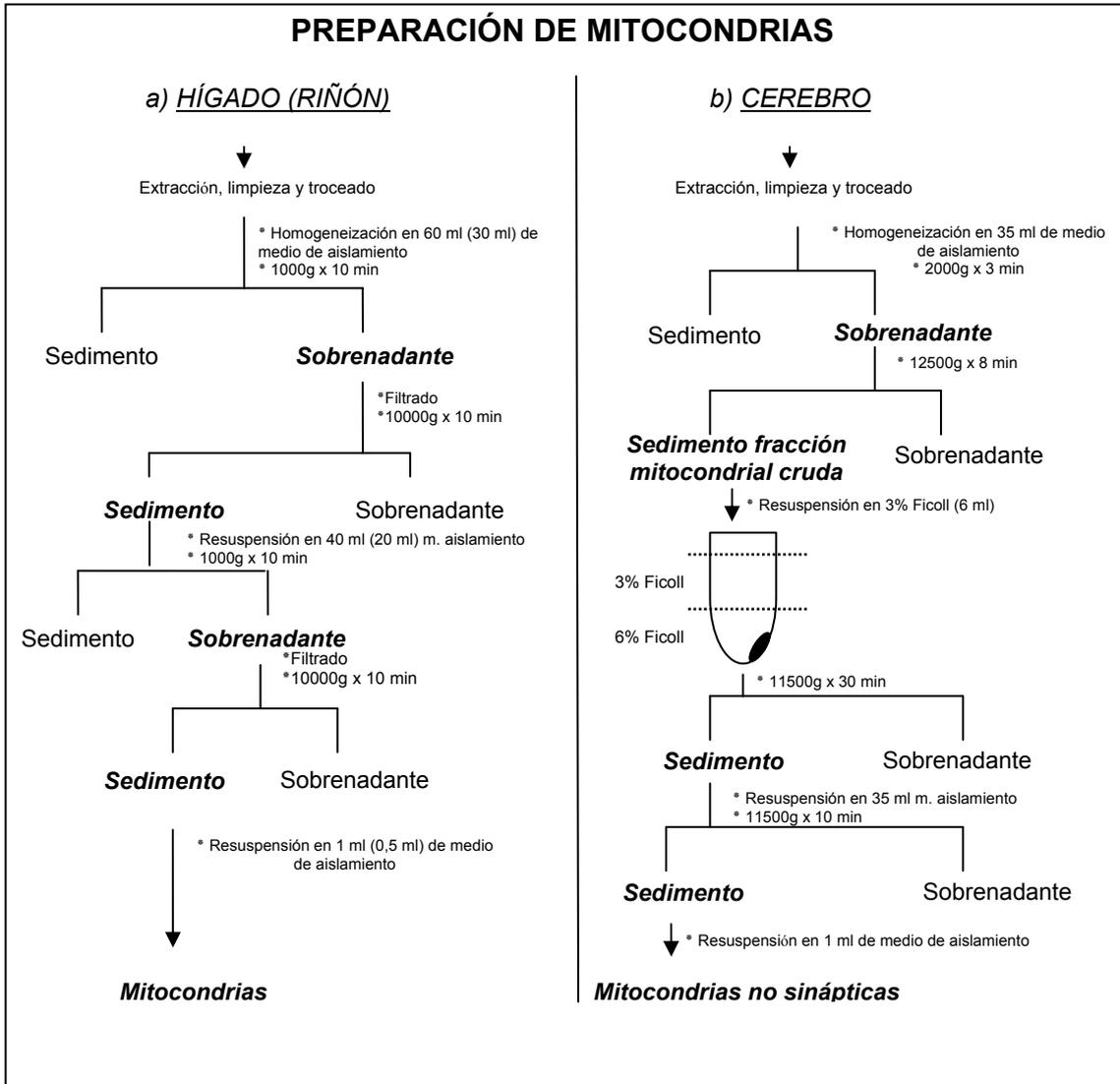
El aislamiento de mitocondrias de cerebro se llevó a cabo por el método de Lai y Clark (1979), extrayendo una población de mitocondrias libres no sinápticas por centrifugación en gradiente discontinuo de Ficoll (Figura 4b).

## Materiales y Métodos

Una vez decapitado el animal, el cerebro se extrajo con rapidez, se lavó bien y se troceó. Se homogeneizó con 35 ml de medio de aislamiento (sacarosa 0,25 M, EDTA 0,5 mM, Tris 10 mM, pH 7,4 y 4° C) con émbolo ajustado vidrio-vidrio. Se centrifugó a 2000g durante 3 minutos y se tomó el sobrenadante sobre el que se repitió la centrifugación. El nuevo sobrenadante se centrifugó a 12500g durante 8 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento resultante (fracción mitocondrial cruda) se resuspendió en 6 ml de Ficoll al 3%. Mediante carga inferior, se depositaron 25 ml de Ficoll al 6% teniendo especial cuidado de no mezclar las distintas fases. Se centrifugó a 11500g durante 30 minutos y el sobrenadante se eliminó bruscamente para eliminar con él la parte superior blanquecina y blanda del sedimento. Éste se resuspendió en 5 ml de medio de aislamiento y se centrifugó a 11500g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió en 1 ml de medio de aislamiento.

El Ficoll 450 fue dializado en una membrana de diálisis Servador, de 29 mm de diámetro y un tamaño de poro de 25 amstrongs. Se preparó Ficoll al 30% en agua destilada y se dializó frente a agua destilada durante 24 horas a 5° C, realizando el cambio de agua cada 12 horas. El Ficoll, una vez dializado, se diluyó al 6% y se mantuvo a 5° C para su posterior utilización.

El medio de Ficoll al 6% contenía 6% (p/v) de Ficoll, manitol 0,24 M, sacarosa 60 mM, K<sup>+</sup>-EDTA 50 µM y Tris-HCl 10 mM, a pH 7,4. El medio de Ficoll al 3% era medio de Ficoll al 6% diluido 1:1 con agua destilada y el pH ajustado a 7,4.



**Figura 4.** Aislamiento de mitocondrias a partir de: a) Hígado y riñón de roedor (Gredilla et al., 2001a); b) cerebro de rata (Lai y Clark, 1979).

Todos los procedimientos descritos se llevaron a cabo en frío (4° C).

Tras esto se estimó la concentración de proteína mitocondrial conseguida a partir de las muestras de hígado o cerebro mediante el método del Biuret. Una vez calculada dicha concentración, las suspensiones mitocondriales, mantenidas en hielo en todo momento, se utilizaron en no más de dos horas para medir el consumo de oxígeno y la producción mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 1.2. Valoración de proteína mitocondrial

La valoración de proteínas se realizó por el método del Biuret (Gornall et al., 1949), técnica colorimétrica donde la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de proteína.

El color lo proporciona el sulfato cúprico, que se une específicamente a los enlaces peptídicos de las proteínas expuestas tras la desnaturalización que genera el colato sódico. Para la formación de los complejos proteína-Cu es necesario un medio con pH alcalino, proporcionado por el NaOH que se añade a la reacción.

Para el ensayo se dispuso de un blanco con 500 µl de agua destilada y tres estándares con 450, 400 y 300 µl de agua destilada y 50, 100 y 200 µl de albúmina sérica bovina (de una solución 10 mg / ml guardada a -20° C) respectivamente. Los tubos con muestra contenían 40 µl de suspensión mitocondrial y 460 µl de agua destilada<sup>18</sup>. A cada tubo se le añadieron: 200 µl de Na-colato al 4%, 2 ml de NaOH al 10% y 300 µl de CuSO<sub>4</sub> al 1%. Tras ser agitados se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro respecto a los blancos.

Para el cálculo de las concentraciones proteicas se utilizó la siguiente recta de regresión, construida a partir de los datos de los estándares:

$$\boxed{[\text{Proteína}] \text{ (mg)} = \frac{DO - a}{b}}$$

donde:

DO = absorbancia de la muestra

a = punto de intersección con el eje de las X

b = pendiente de la recta de regresión

Se realizó una curva patrón de medida cada día; se comprobó que el coeficiente de regresión fuera cercano a 0,9999, y se calculó la concentración de proteína mitocondrial haciéndose la media de los tubos con mitocondrias de la misma fracción aislada.

---

<sup>18</sup> Todos los tubos se ensayaron por duplicado.

### **1.3. Consumo de oxígeno mitocondrial**

Las medidas de consumo de oxígeno mitocondrial se realizaron a 37° C mediante un electrodo de oxígeno tipo Clark controlado por ordenador. Este electrodo consiste en un cátodo de platino que se mantiene a un potencial de -0,7 mV con respecto a un electrodo de Ag-AgCl, empleado de referencia. El electrodo está recubierto por una fina membrana de polietileno permeable al oxígeno. Durante el ensayo, el oxígeno presente en la mezcla de reacción adyacente a la superficie del cátodo se reduce a agua, dando lugar a un gradiente de difusión entre el electrodo y la mezcla de reacción. Sin embargo, sólo una pequeña proporción del oxígeno presente en el medio de reacción es consumido por el cátodo, siendo la mayor parte de éste utilizado por las mitocondrias. La membrana no permite el paso de las sustancias del medio de reacción (a excepción del oxígeno) ya que pueden dañar el electrodo alterando su naturaleza electroquímica. Para evitar la formación de gradientes de oxígeno disuelto y el depósito de sustancias disueltas en la mezcla de reacción sobre la membrana, pudiendo interferir en la medida, se usó un agitador magnético. Regularmente el electrodo se calibró con nitrógeno.

Estos ensayos se llevaron a cabo a partir de la suspensión mitocondrial obtenida tras calcular, mediante el método del Biuret, la cantidad de proteína mitocondrial presente en dicha suspensión; conocida dicha concentración, se añadió a la mezcla de reacción el volumen necesario para tener la concentración óptima de mitocondrias en cubeta, que para el hígado y el cerebro es de 3-4 mg / ml.

Se valoraron el estado 4 (consumo de oxígeno en estado no fosforilante) y el estado 3 (consumo de oxígeno en estado fosforilante) con la adición de ADP 500 µM. Posteriormente se calculó el índice de control respiratorio (RCR) como medida de acoplamiento mitocondrial. Este parámetro indica si las mitocondrias están o no en buen estado funcional. Un RCR alto indica la presencia de mitocondrias bien acopladas y poco dañadas en el proceso de aislamiento (Barja, 1999b).

El aparato se calibró cada vez que fue necesario cambiar la membrana de polietileno. Para esto se dejó la cámara de medida abierta con 1 ml de agua destilada. Cuando se estabilizó la medida se ajustó el 0 de oxígeno desplazándolo con nitrógeno. Asimismo, cada día se realizó una deriva (índice del consumo de oxígeno por el electrodo en ausencia de mitocondrias) antes de realizar las pruebas, para restarla después a las mismas.

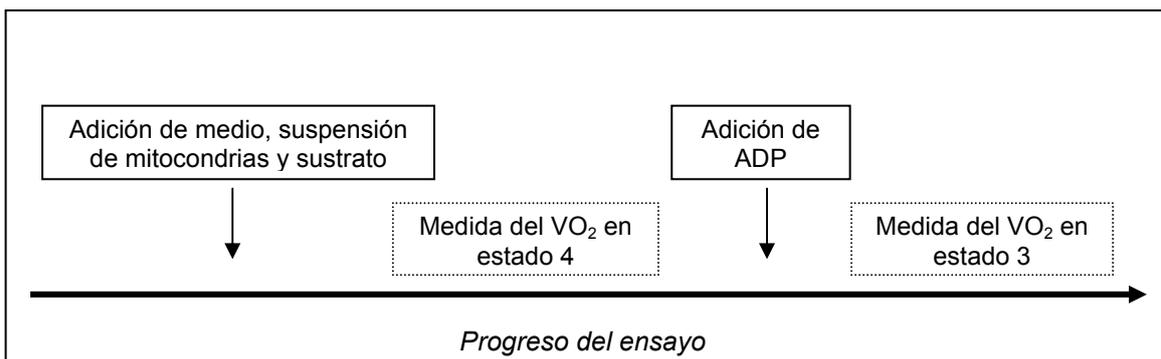
Cada prueba se realizó con un volumen total de 0,5 ml de los cuales:

- "x" volumen de suspensión mitocondrial (en función de la concentración de proteína obtenida).

## Materiales y Métodos

- 10 µl de sustrato. Los sustratos empleados se añadieron a partir de concentraciones iniciales de piruvato-malato (125 mM cada uno), glutamato-malato (125 mM cada uno), glutamato-succinato (125 mM y 250 mM, respectivamente) y succinato (250 mM).
- 10 µl de ADP 25 mM (inicial).
- 10 µl del inhibidor rotenona (100 µM inicial), cuando se empleó succinato como sustrato.
- Hasta 0,5 ml se completó con medio de incubación con albúmina, formado por KCl 145 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 5 mM, HEPES 30 mM, EGTA 0,1 mM y albúmina de suero bovino al 0,1%, a pH 7,4 y 37° C (Barja, 1999b).

Se realizaron medidas en estado 4 para cada uno de los sustratos y, una vez obtenida una pendiente suficiente en estado no fosforilante (estado 4), se añadió ADP para determinar el consumo en estado 3, tal como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Progresión de un ensayo para la medición del consumo de oxígeno.

Para realizar los cálculos se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{nmoles O}_2 / \text{min} \times \text{mg proteína} = \frac{A - B}{2 \times C}$$

donde:

A = pendiente de la prueba (mmoles O<sub>2</sub> / min × ml).

B = pendiente de la deriva (mmoles O<sub>2</sub> / min × ml).

C = concentración de proteína en cubeta.

Así se obtuvieron los nmoles de O<sub>2</sub> por minuto y mg de proteína en estado 4 y 3. El RCR se calculó como el consumo mitocondrial de oxígeno en estado 3 dividido por el consumo en estado 4:

$$\text{RCR} = \frac{\text{VO}_2 \text{ en estado 3}}{\text{VO}_2 \text{ en estado 4}}$$

#### **1.4. Producción mitocondrial de ROS**

La producción mitocondrial de radicales libres se estimó mediante una técnica fluorimétrica de determinación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Ruch et al., 1983) adaptada a mitocondrias (Barja, 2002).

La técnica está basada en la oxidación del ácido homovalínico por reacción con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de peroxidasa de rábano, dando lugar a la formación de un dímero fluorescente; la fluorescencia emitida por dicho dímero es lo que detecta este método.

Las medidas de fluorescencia (excitación: 312 nm, slit 5 nm; emisión: 420 nm, slit 10 nm) se realizaron en punto final y en un volumen total de 1,5 ml. Se empleó el mismo medio de incubación usado para medir el consumo de oxígeno mitocondrial (KCl 145 mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 5 mM, HEPES 30 mM, EGTA 0,1 mM y albúmina de suero bovino al 0,1%, a pH 7,4 y 37° C), en presencia de 0,25 mg de proteína mitocondrial por ml, 38 µl de ácido homovalínico 4 mM, 123 µl de peroxidada de rábano (70 U / ml), 12 µl de superóxido dismutasa (SOD) (que corresponden, en el tubo de ensayo, a 50 U / ml de SOD), y 30 µl de inhibidor (rotenona 100 µM, TTFA 0,56 mM, o antimicina A 100 µM) en los ensayos en los que proceda; finalmente se añadieron 30 µl de sustrato (piruvato-malato 125 mM, glutamato-malato 125 mM, glutamato (125 mM)-succinato (250 mM) o succinato 250 mM según correspondiera) solapando los tubos (por ejemplo cada 20 segundos).

En presencia de SOD, el ensayo estima la producción mitocondrial de ROS (O<sub>2</sub><sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ya que esta enzima añadida en exceso convierte los radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) producidos por las mitocondrias en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Barja, 2002).

Tras añadir los sustratos todos los tubos se incubaron durante 15 minutos a 37° C y, una vez transcurrido dicho tiempo, se detuvo la reacción introduciendo cada tubo en un baño

## Materiales y Métodos

de hielo y añadiéndole al mismo tiempo 0,5 ml de glicina 2 M (glicina 2 M, EDTA 50 mM, NaOH 2,2 mM) también solapando. Todos los ensayos se realizaron por duplicado con sus blancos correspondientes<sup>19</sup> (a los que se añadió todo lo que llevaba su muestra excepto el sustrato en cuestión).

Como estándar se usó el sistema glucosa-glucosa oxidasa. En presencia de glucosa en exceso, la enzima genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una tasa dependiente de la cantidad de glucosa oxidasa (GO) añadida. El estándar se ensayó paralelamente, en las mismas condiciones que las muestras anteriores, en el mismo volumen final (1,5 ml) y utilizando su propio blanco (igual pero en lugar de 150 µl de glucosa se añadieron 150 µl de medio). Así pues, a cada tubo estándar se le añadieron: 1175 µl de medio de incubación, 123 µl de peroxidasa de rábano (70 U / ml), 38 µl de ácido homovalínico, 15 µl de GO y 150 µl de glucosa (140 mM). La cantidad de GO que se añadió fue la necesaria para generar un nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min.

Con todo esto se estimó la producción mitocondrial final de ROS a través de los siguientes cálculos:

$$\text{nmol H}_2\text{O}_2 / \text{min} \times \text{mg prot} = \frac{UFM \times F}{P \times S} \times 1,4$$

donde:

- *UFM* (unidades de fluorescencia por minuto) = (fluorescencia muestra – fluorescencia blanco muestra) / 15 minutos.
- *F* = 2000 µl / Vol mit (µl) (factor de dilución).
- *P* = mg prot / ml en la suspensión mitocondrial.
- *S* = fluorescencia del estándar de glucosa que corresponde a 1 nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min ml.
- 1,4 = Factor de corrección debido a que el pH y la temperatura de referencia de las unidades de GO descritas por el fabricante son diferentes (pH 5,1 y 35° C) de aquellos en los que se realiza la incubación (pH 7,4 y 37° C).

---

<sup>19</sup> Las muestras de antimicina A llevaron sus propios blancos (con antimicina A y sin sustrato), ya que este inhibidor emite fluorescencia propia.

### **1.5. Fuga de radicales libres**

Las medidas de consumo de oxígeno y de producción de radicales libres mitocondriales se realizaron en las mismas muestras y bajo las mismas condiciones (medio de incubación, concentraciones de sustrato e inhibidores, temperatura y pH). Esto permitió relacionarlas entre sí para calcular el escape o la fuga de radicales libres (%).

Este índice representa la fracción de electrones de la cadena respiratoria que reducen incompletamente el oxígeno a ROS en vez de formar agua en el Complejo IV. Como se necesitan 4 electrones para reducir  $O_2$  a  $H_2O$  y sólo 2 para reducirlo a  $H_2O_2$ , la fuga de radicales libres se calculó como la producción de  $H_2O_2$  dividida por dos veces el consumo de oxígeno en las mismas condiciones experimentales, y multiplicando el resultado por 100<sup>20</sup>:

$$\text{Fuga de radicales libres (\%)} = 100 \times \frac{\text{Producción de } H_2O_2}{2 \times VO_2}$$

---

<sup>20</sup> Por ejemplo, un resultado de un 4% viene a decir que el 4% de los electrones que fluyen por la cadena respiratoria reducen el oxígeno a especies reactivas.

## 2. DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS

### 2.1. Preparación de las muestras

Las muestras del tejido se homogeneizaron en tampón Hepes 10 mM, pH 1,4, suplementado con BHT 1  $\mu$ M, DETAPAC 1 mM y ácido fítico 1 mM, como antioxidantes. Así mismo, se añadieron inhibidores de la proteólisis tales como leupeptina (0,5  $\mu$ g/ml), aprotinina (0,5  $\mu$ g/ml), pepstatina (0,7  $\mu$ g/ml), PMSF (40  $\mu$ g/ml) y EDTA (1,1 mM). A continuación se procedió a la extracción con cloroformo:metanol en una proporción 2:1 (v/v) según Folch et al. (1957). Una vez eliminada la fase clorofórmica, se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 10 % (concentración en la mezcla de precipitación), acelerando la precipitación mediante centrifugación. A continuación se redujeron las muestras incubándolas toda la noche con 1 ml de NaBH<sub>4</sub> (500 mM) disuelto en un tampón de ácido bórico (0,2 M, pH 9,2). A esta disolución se le añadió una gota de hexanol como agente antiespumante. Las proteínas se precipitaron de nuevo añadiendo 1 ml de ácido tricloroacético al 10% para, seguidamente, centrifugarlas otra vez. Este último paso se repitió dos veces.

### 2.2. Síntesis de los estándares internos

Para la síntesis de los diferentes estándares internos (deuterados y no deuterados) se utilizaron procedimientos descritos previamente. Así la N<sup>ε</sup>-(carboxietil)-lisina (CML) y la [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-CML se sintetizaron a partir de la reacción del ácido glioxídico con N<sup>ε</sup>-acetil[<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-lisina respectivamente, en presencia de cianoborohidruro sódico. La CML se aisló mediante cromatografía de intercambio iónico, comprobándose su estructura y homogeneidad por GC/MS y por análisis de aminoácidos (Knecht et al., 1991). La N<sup>ε</sup>-(carboximetil)-lisina (CEL) y la [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-CEL se sintetizaron mediante la reacción de piruvato con formil-lisina y [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-lisina, respectivamente, en presencia de cianoborohidruro sódico (relación molar 1:1:3) en tampón fosfato 0,2 M a pH 7,4 y 37° C durante 3 días (Ahmed et al., 1997).

Para la síntesis de N<sup>ε</sup>-(malondialdehído)-lisina (MDAL) y [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-MDAL fue necesario obtener previamente malondialdehído (MDA). Este se produjo inmediatamente de su uso por hidrólisis de su forma dimetilacetal añadiéndole HCl (1M) durante 30 minutos a 37° C. A continuación se cuantificó midiendo la absorbancia a 245 nm, y utilizando su coeficiente de extinción molar (137.000 M<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>). Para obtener MDAL o [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-MDAL, se incubó lisina o [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-lisina con una cantidad equimolecular de MDA en presencia de cianoborohidruro sódico en exceso (8 veces la cantidad de lisina o [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-lisina) en tampón fosfato (0,2 M, pH 7,4 y 37° C) durante toda la noche (Requena et al., 1997).

Los carbonilos proteicos específicos semiadehído glutámico (GSA) y semialdehído aminoalifático (AASA) se obtuvieron mediante el método descrito por Requena et al. (2001). El ácido 5-hidroxi-2-aminovalérico (HAVA), producto de la reducción del GSA, se obtuvo de la purificación del éster del ácido 5-metilglutámico en una columna de intercambio iónico Dowex-50W seguido de precipitación con metanol. Para la preparación de d5-HAVA se utilizaron 100 mg de ácido d5-2,3,3,4,4-L-glutámico 98%, que se convirtió en el correspondiente éster metílico mediante el tratamiento con ácido metanólico-HCl. Tras la evaporación, el producto se trató como se describe para la preparación del HAVA. El ácido 6-hidroxi-2-aminocaproico (HACA), producto de la reducción del AASA, se precipitó con metanol. El d4-AASA se preparó partiendo de 250 mg de D-L-lisina-4,4,5,5-d4·2HCl 98% que se convirtieron a N- $\alpha$ -formil-d4-lisina. El producto se evaporó y se disolvió en 20 ml de agua. Tras ajustar el pH a 9,5 con NH<sub>4</sub>OH se añadieron 320 mg de nitroprusiato sódico durante 20 minutos, mientras se calentaba a 60° C y se ajustaba el pH cuando era necesario. La solución resultante se calentó durante 4 horas más, ajustando nuevamente el pH. El producto de la reacción se filtró e hidrolizó con HCl (6 M) durante 1 hora a 100° C. Después de la evaporación, el producto se disolvió en ácido fórmico (pH 2) y se filtró en una columna de intercambio iónico Dowex-50W. El producto final se precipitó con un pequeño volumen de metanol caliente. Las preparaciones de HAVA, d5-HAVA, AASA y d4-GSA se disolvieron en agua desionizada y se calibraron con una mezcla de aminoácidos.

Las muestras y los estándares se analizaron por HPLC en un sistema Hewlett-Packard Serie 110, después de su derivación automática con orto-phthaladehído. El área media de Ser, His, Gly, Thr, Arg, Ala, Tyr, Met y Val se utilizó para calcular la concentración de HAVA, d5-HAVA, HACA o d4-HACA en cada preparación. Los análisis se realizaron por triplicado para cada solución, y se congelaron alícuotas a -70° C para su posterior utilización (Requena et al., 2001).

### **2.3. Análisis de AASA, CEL, CML, MDAL y GSA**

Las concentraciones de GSA, AASA, CML y CEL se determinaron por cromatografía de gases / espectrometría de masas (GC/MS) según Pamplona et al. (1999a, 2000). A las muestras reducidas se les añadieron los estándares internos deuterados marcados isotópicamente: d8-lisina (120 nmoles), d4-CML (474 pmoles), d4-CEL (432 pmoles), d8-MDAL (216 pmoles), d5-GSA (648 pmoles) y d4-AASA (140 pmoles). Las muestras se sometieron a hidrólisis añadiendo 1ml de HCl (6N) e incubando a 155° C durante 30 minutos. Los hidrolizados obtenidos se rehidrataron en 1ml de ácido trifluoroacético al 1% y se aplicaron a columnas de extracción en fase sólida C-18 de 1ml (Supelco), equilibradas previamente con el mismo solvente. Se recogió el primer ml eluido y los 2 ml adicionales de ácido trifluoroacético al 1%, para, posteriormente, secarse al vacío.

Los derivados N,O-trifluoroacetil de los ésteres metílicos del hidrolizado de proteínas se obtuvieron de la siguiente manera: primero se incubó la muestra en 1 ml de metanol:HCl al 5% durante 30 minutos a 65° C seguida de evaporación bajo flujo de nitrógeno para obtener los ésteres metílicos; seguidamente se incubaron los ésteres metílicos del hidrolizado con 1 ml de ácido trifluoroacético anhidro durante 60 minutos a temperatura ambiente para obtener los derivados trifluoroacetil. A continuación el agente derivatizador se evaporó bajo flujo de nitrógeno para, por último, redissolver las muestras en 100 µl de cloruro de metileno y se centrifugaron a 800g durante 5 minutos para eliminar los posibles precipitados. Los sobrenadantes se traspasaron a viales y se inyectaron alícuotas de 2 µl en el sistema de GC/MS para su análisis y cuantificación.

### **2.4. Cromatografía de gases / espectrometría de masas**

Los análisis GC/MS se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 6890 equipado con una columna capilar de 30 m HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5973a en modo de impacto iónico. El puerto de inyección se mantuvo a 275° C y el programa de temperaturas fue el siguiente: 5 minutos a 110° C, luego 2° C/minuto hasta 150° C, 5° C/minuto hasta 240° C, 25° C/minuto hasta 300° C y al final se mantuvo la temperatura a 300° C durante 5 minutos. Para la cuantificación se utilizaron curvas patrón construidas a partir de la mezcla de estándares deuterados y no deuterados.

Los análisis se realizaron mediante monitorización de iones específicos seleccionados previamente (SIM). Los analitos se detectaron por SIM - GC/MS. Los iones usados fueron lisina (con una m/z de 180) y d8-lisina (con una m/z de 187); GSA (con una m/z de 280) y d5-GSA (con una m/z de 285); AASA (con una m/z de 294) y d4-ASSA (con una m/z de 298); CML (con una m/z de 392) y d4-CML (con una m/z de 396); CEL (con una m/z de 379) y d4-CEL (con una m/z de 383); y MDAL (con una m/z de 474) y d8-MDAL (con una m/z de 482). Las concentraciones finales se expresaron en µmoles de GSA, AASA, CML, CEL o MDA-lisina / mol lisina.

### 3. DAÑO OXIDATIVO AL ADN MITOCONDRIAL

El daño oxidativo al ADN mitocondrial se llevó a cabo mediante la valoración de los niveles del deoxinucleótido oxidado 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), en relación con su base no modificada deoxiguanosina (dG). Dicha valoración se realizó mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección culométrica en el caso de la 8-oxodG, y ultravioleta, en el de la dG.

Para el aislamiento y precipitación del ADN mitocondrial se siguió el método de Latorre et al. (1986) adaptado a mamíferos (de la Asunción et al., 1996; Barja y Herrero, 2000).

#### 3.1. Aislamiento del ADN mitocondrial

Las muestras de tejido se conservaron congeladas a  $-80^{\circ}$  C desde el sacrificio de los animales.

Se pesaron entre 400 y 500 mg de muestra en el caso del hígado y entre 150 y 200 mg en el de cerebro y riñón, y se homogeneizaron, a  $4^{\circ}$  C, a razón de 1,5 ml de tampón de homogeneización (TRIS 10 mM, NaCl 60 mM, sacarosa al 5% y EDTA- $\text{Na}_2$  10 mM, pH 7,8) por gramo de tejido. Posteriormente se mezclaron:

- 300  $\mu$ l de dicho homogenado.
- 300  $\mu$ l de tampón TRIS 300 mM con SDS al 1,25%, sacarosa al 5% y EDTA-  $\text{Na}_2$  10 mM, pH 9.
- 400  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamilo (49:1, v/v) para separar los lípidos.

Se centrifugó 10 minutos a  $500g^{21}$ . Se recogió la fase superior y se incubó durante 30 minutos a  $65^{\circ}$  C. De este modo, conseguimos romper las membranas y liberar el contenido celular, a la vez que se desnaturalizan las proteínas con el SDS.

Tras esto se añadieron 0,12 ml de acetato potásico 3M, pH 4,8 a las muestras y se incubaron 10 minutos a  $-20^{\circ}$  C. El descenso de pH junto con la alta concentración de sales provoca la precipitación del ADN de alto peso molecular, principalmente ADN nuclear. Además el potasio forma complejos con el SDS-proteína, facilitando su precipitación.

---

<sup>21</sup> Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo a  $4^{\circ}$  C.

## Materiales y Métodos

Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10000g y se recogió el sobrenadante (el sedimento contiene restos celulares, complejos SDS-proteína y ADN nuclear).

Se tomaron 700 µl de muestra en un tubo Eppendorff y se añadió idéntico volumen de isopropanol; en esta fase ya se puede apreciar el ADN.

A continuación se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10000g 10 minutos. En el sedimento queda ADN mitocondrial parcialmente purificado, por lo que se eliminó el sobrenadante y se añadieron 0,5 ml de etanol al 70% frío (mantenido a -20° C).

Las muestras se volvieron a centrifugar a 10000g durante 10 minutos. Se decantó el etanol y el remanente se eliminó con nitrógeno. Se añadieron entonces 150 µl (para cerebro y riñón) y 300 µl (para hígado) de tampón TE (TRIS-HCl 10 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM, pH 8), se resuspendieron las muestras y se añadieron 10 µl de RNAsa.

Tras 6 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 0,3 ml de SDS a 0,1%, pH 12,5. Se incubaron a 65° C otros 6 minutos, se añadieron 230 µl de acetato sódico 3 M, pH 4,8 y se volvieron a incubar a -20° C durante 20 minutos.

Cuando las muestras se descongelaron, se centrifugaron a 10000g 5 minutos, se recogió el sobrenadante y se añadió igual volumen de isopropanol. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente.

Seguidamente se centrifugó a 10000g 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se añadieron 0,5 ml de etanol al 70% frío, volviéndose a centrifugar durante 5 minutos. Se decantó el etanol y las muestras se secaron con nitrógeno<sup>22</sup>, resuspendiéndose entonces en 35 µl (cerebro y riñón) o 50 µl (hígado) de tampón TE, pH 8.

Las muestras se mantuvieron en frío (4° C) durante aproximadamente 30 minutos (o toda la noche) para permitir su completa disolución.

Una vez bien disuelto el ADN en el tampón TE, pH 8, y medida la concentración por espectrofotometría (Genequant, Biochrom), se añadieron a las muestras 40 µl de acetato sódico 3 M, pH 4,8, y 800 µl de etanol al 70% frío; se centrifugaron a 10000g 10 minutos y, al término de la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se añadió de nuevo 1 ml de etanol al 70% frío, y se volvió a centrifugar. Se eliminó el etanol de las muestras y se secaron con nitrógeno. El ADN se resuspendió en 100 µl de acetato sódico 20 mM, pH 4,8 y, por último, se incubaron las muestras a 50° C durante 1 hora.

---

<sup>22</sup> Es importante evitar un secado excesivo del ADN ya que, en ese caso, podría producirse la oxidación artificial de la dG y sobrevalorar así la cantidad de 8-oxodG de la muestra.

### **3.2. Digestión del ADN mitocondrial**

Tras la hora de incubación a 50° C, se añadieron a las muestras 20 µl de nucleasa P1 (5 U / muestra) disuelta en acetato sódico 20 mM, pH 4,8, que contenía cloruro de zinc 10 mM y 15% de glicerol, y se incubaron a 50° C durante 30 minutos.

A continuación se añadieron 20 µl de fosfatasa alcalina (4 U / muestra), y se repitió la incubación durante 1 hora.

Por último se transfirieron las muestras a eppendorffs con filtro Whatman y se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 minutos. De los filtrados se tomaron 100 µl para inyectar en HPLC.

### **3.3. Condiciones cromatográficas**

La determinación de los niveles de 8-oxodG y de dG se realizó por HPLC, a través de detección electroquímica y ultravioleta, respectivamente.

La cuantificación de dG por el detector ultravioleta se realizó a 254 nm con una sensibilidad de 0,64 en todos los experimentos, mientras que las condiciones del detector electroquímico variaron de unos experimentos a otros: 400 mV / 20 nA (subobjetivo 1.1) y 225 mV / 10 nA (subobjetivos 1.2, 1.3 y objetivo 2).

La fase móvil utilizada (ácido fosfórico 50 mM, acetonitrilo al 2,5%, pH 5) se filtró a través de filtros de diámetro de poro 0,45 µm. El flujo de paso de fase móvil fue de 1 ml/min a una presión de 1000 PSI en los experimentos del subobjetivo 1.1 y del objetivo 2, y de 0,9 ml/min en los subobjetivos 1.2 y 1.3.

### **3.4. Cálculo de las concentraciones de dG y 8-oxodG**

Para cuantificar los valores obtenidos, se inyectaron cada día estándares de dG y de 8-oxodG de concentraciones conocidas. Así, en el caso de la dG, se inyectó una solución estándar de dG pura 100 µM en acetato sódico 10 mM, pH 4,8 y TRIS 1 M, pH 8 (11:1). Para la 8-oxodG, la solución estándar inyectada fue de 20 nM en el mismo solvente.

## Materiales y Métodos

A partir de las áreas obtenidas con los estándares se obtuvo un factor de calibración (F.C) para 8-oxodG y para dG:

$$- \text{F.C. (8-oxodG)} = \frac{10}{A_{10}}$$

donde:  $A_{10}$ : Área del estándar 10 nM de 8-oxodG.

$$- \text{F.C. (dG)} = \frac{100}{A_{dG100}}$$

donde:  $A_{dG 100}$ : Área del estándar de dG 100  $\mu\text{M}$ .

La concentración de 8-oxodG se obtuvo mediante la siguiente expresión:

$$- [\text{8-oxodG}] = \text{Area}_{8\text{oxodG}} \times \text{F.C (8oxodG)}$$

donde:  $\text{Area}_{8\text{oxodG}}$ : Área de 8-oxodG de la muestra.

La concentración de dG se obtuvo mediante la siguiente expresión:

$$- [\text{dG}] = \text{Area}_{dG} \times \text{F.C (dG)}$$

donde:  $\text{Area}_{dG}$ : Área de dG de la muestra.

Finalmente, se obtuvo la razón 8-oxodG /  $10^5$  dG como indicador del daño oxidativo al ADN:

$$- \text{8oxodG} / 10^5 \text{ dG} = 100 \times \text{8oxodG} / \text{dG}$$

#### **4. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LOS LÍPIDOS TOTALES**

##### **4.1. Extracción de lípidos**

Los lípidos se extrajeron de las muestras utilizando cloroformo:metanol en una proporción 2:1 (v/v) en presencia de butilhidroxitolueno (BHT) al 0,01%, según Folch et al. (1957). Posteriormente se separó la fase orgánica y se evaporó bajo un flujo de nitrógeno en un evaporador N-evap Model 111. La fase lipídica se sometió a un proceso de transesterificación mediante incubación con 2,5 ml de metanol-HCl al 5% durante 90 minutos a 75° C. La solución metanol-HCl se preparó mediante la adición de 1,3 ml de cloruro de acetilo a 18,7 ml de metanol, con el objeto de producir HCl anhidro. De este modo se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos grasos. La extracción de estos ésteres metílicos se efectuó añadiendo 2,5 ml de n-pentano y 1 ml de solución saturada de NaCl, agitando durante 60 minutos en un vibrador de brazo oscilante Vibromatic-384 y centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos a 4° C. La fase de n-pentano se separó y se evaporó bajo flujo de nitrógeno. Por último, los ésteres metílicos se disolvieron en 75 µl de disulfuro de carbono (CS<sub>2</sub>) como vehículo para su posterior análisis mediante cromatografía de gases / espectrometría de masas (GC/MS).

##### **4.2. Condiciones cromatográficas**

La separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos se llevó a cabo en una columna SP2330 (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm) con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 Serie II. Como detector se utilizó un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5973A en modo de impacto iónico. El puerto de inyección se mantuvo a 220° C y el detector a 250° C; el programa de temperatura consistía en 100° C durante 2 minutos, subida de temperatura a 10° C/minuto hasta los 200° C, 5° C/minuto hasta los 240° C y, por último, se mantuvo 10 minutos a 240° C. La identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó por comparación con los correspondientes estándares. Los resultados se expresan como moles en %.

### **4.3. Cálculo de los índices relacionados con la composición lipídica**

Los diferentes índices se calcularon de la forma que se detalla a continuación:

- El contenido de ácidos grasos saturados (**SFA**, del inglés: *Saturated Fatty Acids*):  
**SFA** = [ $\Sigma\%$ mol (8:0 + 10:0 + 11:0 + 12:0 + 13:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0 + 20:0 + 24:0)]
  
- El contenido de ácidos grasos insaturados (**UFA**, del inglés: *Unsaturated Fatty Acids*):  
**UFA** = [ $\Sigma\%$ mol (16:1 + 18:1 + 18:2 + 18:3 + 18:4 + 20:1 + 20:2 + 20:3 + 20:4 + 20:5 + 22:4 + 22:5 + 22:6)]
  
- El contenido de ácidos grasos monoinsaturados (**MUFA**, del inglés: *Monounsaturated Fatty Acids*):  
**MUFA** = [ $\Sigma\%$ mol (16:1 + 18:1 + 20:1 + 24:1)]
  
- El contenido de ácidos grasos insaturados (**PUFA**, del inglés: *Polyunsaturated Fatty Acids*):  
**PUFA** = [ $\Sigma\%$ mol (18:2 + 18:3 + 20:2 + 20:3 + 20:4 + 20:5 + 22:5 + 22:6)]
  
- El contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3 (**PUFA(n-3)**):  
**PUFA(n-3)** = [ $\Sigma\%$ mol (18:3 + 20:5 + 22:5<sup>23</sup> + 22:6)]
  
- El contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 6 (**PUFA(n-6)**):  
**PUFA(n-6)** = [ $\Sigma\%$ mol (18:2 + 20:2 + 20:3 + 20:4 + 22:4 + 22:5<sup>23</sup>)]
  
- La longitud media de la cadena (**ACL**, del inglés: *Average Chain Length*):  
**ACL** = [ $(\Sigma\text{mol } \%totalC_8 \times 8) + (\Sigma\text{mol } \%totalC_{10} \times 10) + (\Sigma\text{mol } \%totalC_{11} \times 11) + (\Sigma\text{mol } \%totalC_{12} \times 12) + (\Sigma\text{mol } \%totalC_{13} \times 13) + (\Sigma\text{mol } \%totalC_{14} \times 14) + (\Sigma\text{mol } \%totalC_{15} \times 15) + (\Sigma\text{mol } \%totalC_{16} \times 16) + (\Sigma\text{mol } \%totalC_{17} \times 17) + (\Sigma\text{mol } \%totalC_{18} \times 18) + (\Sigma\text{mol } \%totalC_{20} \times 20) + (\Sigma\text{mol } \%totalC_{22} \times 22) + (\Sigma\text{mol } \%totalC_{24} \times 24)$ ] / 100
  
- El índice de dobles enlaces (**DBI**, del inglés: *Double Bound Index*):  
**DBI** = [(1 x  $\Sigma\%$ ácidos monoenoicos) + (2 x  $\Sigma\%$ ácidos dienoicos) + (3 x  $\Sigma\%$ ácidos trienoicos) + (4 x  $\Sigma\%$ ácidos tetraenoicos) + (5 x  $\Sigma\%$ ácidos pentaenoicos) + (6 x  $\Sigma\%$ ácidos hexaenoicos)]

<sup>23</sup> A la hora de calcular el % de ácidos grasos pertenecientes a cada una de las series: omega 3 y omega 6, se tienen en cuenta solamente los que pertenecen a cada una de ellas, es decir para la serie omega 3 se contabilizará el 22:5n-3 y para la serie omega 6 se contabilizará el 22:5n-6.

- El índice de peroxidizabilidad lipídica (**PI**, del inglés: *Peroxidizability Index*; Witting & Horwit, 1964):

$$\mathbf{PI} = [(0,025 \times \Sigma\% \text{ácidos monoenoicos}) + (1 \times \Sigma\% \text{ácidos dienoicos}) + (2 \times \Sigma\% \text{ácidos trienoicos}) + (4 \times \Sigma\% \text{ácidos tetraenoicos}) + (6 \times \Sigma\% \text{ácidos pentaenoicos}) + (8 \times \Sigma\% \text{ácidos hexaenoicos})]$$

## **5. CANTIDAD DE LOS COMPLEJOS I, II, III, Y IV DE LA CADENA RESPIRATORIA ASÍ COMO DE AIF, SIRT1, NRF-2, PCG-1 $\alpha$ y UCP2,4: ANÁLISIS DE WESTERN BLOT**

La concentración de los complejos mitocondriales I y III, que contienen los generadores de radicales libres, y de los complejos II y IV, que no producen ROS y se usan como controles, se determinó mediante el análisis de Western Blot de estos complejos proteicos representativos, según Sanz et al. (2006a). Asimismo se determinó por el mismo método la concentración de AIF en mitocondria, SIRT1, NRF-2, UCP2, UCP4, y el principal regulador de la biogénesis mitocondrial, PCG-1 $\alpha$ , en tejido.

Para realizar la inmunodetección se utilizó un anticuerpo monoclonal específico para las subunidades NDUFS3 (30000 Dalton) y NDUF9 (39000 Dalton) del complejo I, la subunidad de 70000 Dalton del complejo II, la proteína Rieske (29000 Dalton) y la subunidad II del núcleo (48000 Dalton) del complejo III, y la subunidad I (57000 Dalton) del complejo IV (1:2000, 1:500, 1:1000 y 1:1000, respectivamente) y anticuerpos monoclonales específicos para el segmento C-terminal (comprendido del aminoácido 593 al 613) de AIF (1:1000), y para PCG-1 $\alpha$  (1:200), UCP4 (1:200), SIRT1 (1:500), NRF-2 (H-300; 1:100) y UCP2 (1:200).

Como control se utilizaron un anticuerpo anti-porina (1:5000) o anti- $\beta$ -actina (1:5000) para referir la cantidad total de las subunidades analizadas de los complejos I, II, III y IV o de las otras moléculas estudiadas frente a la masa mitocondrial total, representada por la cantidad de porina, o al contenido proteico total, representado por la cantidad de  $\beta$ -actina.

Se utilizó un anticuerpo secundario apropiado y un sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa para la detección del anticuerpo primario. La cuantificación y grabación de la señal fue realizada con un equipo ChemiDoc de BioRad. La concentración proteica se determinó por el método de Bradford. Los datos se expresaron en unidades arbitrarias.

## 6. MEDIDA DE S-ADENOSILMETIONINA Y S-ADENOSILHOMOCISTEÍNA

Los análisis de S-adenosilmetionina (SAM) y de S-adenosilhomocisteína (SAH) se llevaron a cabo por HPLC según el método descrito por Wang et al. (2001). Siguiendo dicho método, 100 mg de hígado congelado se homogeneizaron en nitrógeno líquido en un mortero y se transfirieron a un vial previamente pesado que contenía 4 volúmenes de ácido perclórico 0,4 M, y se agitaron vigorosamente. Se centrifugaron a 11000g y se recogieron los sobrenadantes. Una alícuota de 60  $\mu$ l de muestra se inyectó en el HPLC.

La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa se llevó a cabo con una columna analítica C18 4,60 mm (25 cm) (Phenomenex-komasil 5u 100A C18) en un sistema de Agilent Technologies. El sistema del HPLC consistía en una bomba primaria (G1312A) Serie 1200, un desgasificador (G1379A) Serie 1100, un inyector automático de muestras ALS (del inglés *Automatic Liquid Samples*, G1313A) Serie 1100, un horno de columnas TTC (G1316A) serie 1200 y un detector ultravioleta VVO (G1314B). La fase móvil consistía en dos eluyentes: solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, y ácido 1-Heptanesulfónico sal sódico 8 mM, a pH 3 ajustado con ácido fosfórico (Buffer A), y  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Buffer B). La columna de HPLC estaba equilibrada con 80% de Buffer A y 20% de Buffer B. La muestra se inyectó y la separación se obtuvo usando un gradiente escalonado. El gradiente consistía en 8 minutos a las condiciones de equilibración, 30 segundos para incrementar Buffer B al 40%, 12,5 minutos en la nueva condición, y 30 segundos para regresar a las condiciones de equilibrado y 10 minutos antes de la siguiente inyección. El transcurso de la carreras fueron de 30 minutos, el flujo de 1 ml/min y la temperatura de la columna se mantuvo constante a 45° C. Las áreas de los picos se monitorizaron a 254 nm con un detector ultravioleta. Todas las soluciones, tras ser preparadas y ajustado el pH, así como los estándares y las soluciones de las muestras, se filtraron a través de un filtro Millipore de 0,45  $\mu$ m. SAM y SAH se identificaron de acuerdo a sus tiempos de retención, 5,8 y 9,7 minutos, respectivamente. La cuantificación se basó en la integración de las áreas de los picos y se comparó con las curvas de calibración de los estándares de SAM y SAH. Dentro del rango de concentraciones estudiadas se observó linealidad, 2-200  $\mu$ M para ambas. Los resultados fueron recalculados para expresarlos como nmol/g de tejido. El ratio SAM/SAH, que representa el potencial de metilación, se calculó como un parámetro cuantitativo de las reacciones de metilación intracelulares.

## 7. CONTENIDO EN ATP, ADP Y AMP

Las concentraciones de ATP, ADP y AMP se midieron por HPLC según el método de Stocchi et al. (1985). 100 mg de hígado congelado se homogeneizaron bajo nitrógeno líquido en un mortero y se transfirieron a un vial prepesado que contenía 4 volúmenes de ácido perclórico 0,4 M y se agitaron vigorosamente. Tras centrifugarlos a 11000g, se recogieron los sobrenadantes. Una alícuota de la dilución de esta muestra se inyectó en el sistema HPLC. La cromatografía líquida en fase reversa se llevó a cabo con una columna analítica C18 en el sistema de Agilent Technologies previamente descrito. La fase móvil consistía en dos eluyentes: solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M, pH 6,8 (Buffer A), y  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Buffer B). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: 2 minutos en buffer A al 10%, 20 minutos hasta llegar a 25% de Buffer B. El gradiente regresó a Buffer A en 2 minutos. El transcurso de las carreras fue de 30 minutos, el flujo de 1,0 ml/min y la temperatura de la columna se mantuvo constante a 30° C. Las áreas de los picos fueron monitorizados a 254 nm con un detector ultravioleta. Todas las soluciones, tras ser preparadas y ajustado el pH, así como los estándares y las soluciones de las muestras, se filtraron a través de un filtro Millipore de 0,45  $\mu\text{M}$ . Los picos que representan ATP, ADP y AMP se identificaron de acuerdo a sus tiempos de retención, 4,892, 5,471 y 6,959 minutos, respectivamente. La cuantificación se llevó a cabo usando curvas estándar para cada nucleótido; se observó linealidad dentro del rango de concentraciones estudiadas, 10-100  $\mu\text{M}$  para los 3. Los resultados se recalcularon para ser expresados como nmol / mg proteína. A partir del análisis de la composición de nucleótidos también se calcularon los siguientes índices: Ratio ADP / ADP; nucleótidos de adenina totales: ATP + ADP + AMP y la carga energética:  $(\text{ATP} + 0,5 \times \text{ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$ .

## 8. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para analizar estadísticamente los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se realizaron los siguientes tratamientos estadísticos:

### 8.1. Características muestrales

De cada conjunto de datos se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Media aritmética de cada grupo de datos.
- Desviación estándar ( $\sigma_{n-1}$ ).
- Error estándar de la media ( $\sigma_{n-1} / \sqrt{n}$ ).

### 8.2. Análisis estadísticos

En el estudio 1.1, la prueba estadística para valorar las diferencias entre las medias de los tres grupos experimentales empleada fue el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía<sup>24</sup>.

En los casos en los que el ANOVA previo resultó significativo se realizó, a posteriori, la prueba de rango múltiple de Duncan a fin de precisar entre qué grupos concretos existían las diferencias observadas previamente con el ANOVA.

Para analizar el resto de los experimentos se utilizó, como prueba estadística, el test t de Student.

El nivel mínimo de significación fue 0,05 en todas las comparaciones. El grado de significación obtenido se representó en todas las tablas y gráficas como: \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

Los parámetros, las pruebas estadísticas y la comprobación de que las condiciones de aplicación de dichas pruebas se cumplían se realizaron con el programa Statgraphics Plus 4.0.

---

<sup>24</sup> Los supuestos que han de cumplir los datos para poder analizarlos con el ANOVA: normalidad e igualdad de varianzas entre los grupos (homocedasticidad) fueron comprobados previamente a la aplicación de esta prueba estadística.

# Resultados

# 1. Estudio de la restricción de metionina y aminoácidos sobre el estrés oxidativo mitocondrial en la rata Wistar

## MODELO 1.1. RESTRICCIÓN DE METIONINA AL 40 Y 80% EN HÍGADO

### 1.1.1. Peso de animales y órganos

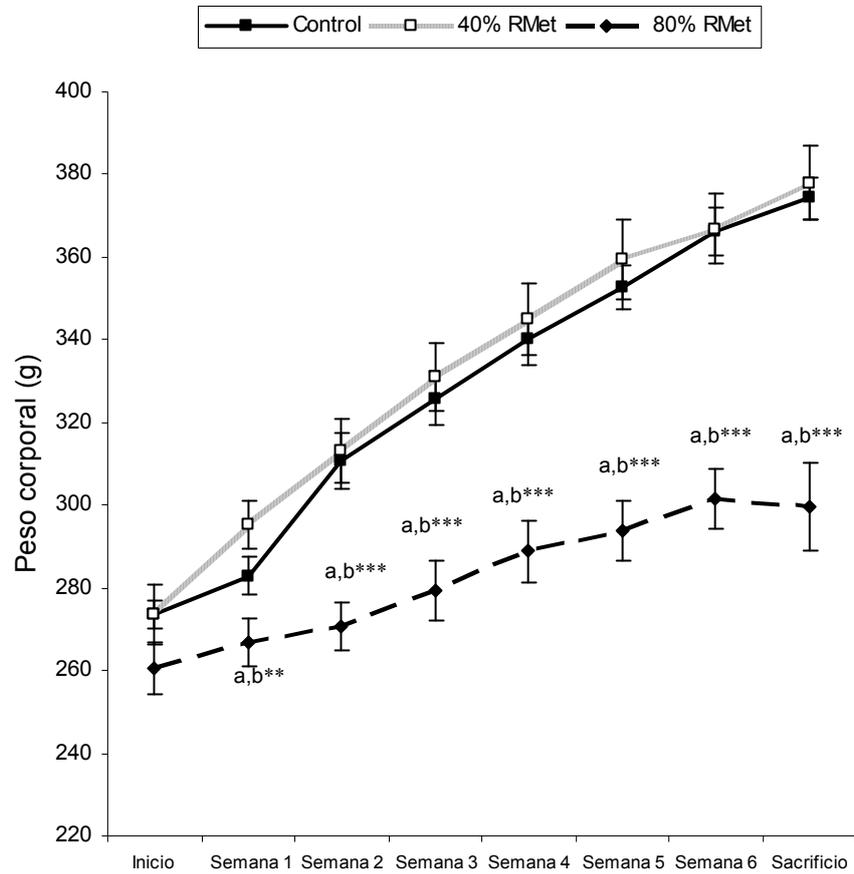
No se observaron diferencias significativas en el peso de los animales al inicio del tratamiento experimental. Sin embargo, a lo largo del mismo, la ganancia de peso de los animales restringidos en metionina al 80% (80% RMet) fue menor que la de los controles y que la de los restringidos al 40% en dicho aminoácido (40% RMet), alcanzando la significación estadística ( $p < 0,001$ ) en la segunda semana de tratamiento (Figura 6). No hubo diferencias significativas entre los animales 40% RMet y los controles.

De todos los órganos estudiados, se observó un descenso significativo en el peso del hígado ( $p < 0,05$ ) y del bazo ( $p < 0,001$ ) en el grupo 80% RMet en relación a los otros dos, mientras que el peso de los demás órganos fue similar en los tres grupos experimentales (Tabla 8).

**Tabla 8.** Peso de los órganos (g) de los animales controles, restringidos en metionina al 40% (40% RMet) y restringidos en metionina al 80% (80% RMet).

	Control	40% RMet	80% RMet
<b>Hígado</b>	7,97 ± 0,27	8,11 ± 0,37	6,61 ± 0,46 <sup>a*, b*</sup>
<b>Corazón</b>	1,2 ± 0,03	1,18 ± 0,07	1,04 ± 0,07
<b>Bazo</b>	0,52 ± 0,02	0,52 ± 0,03	0,38 ± 0,02 <sup>a***, b***</sup>
<b>Riñón</b>	2,43 ± 0,08	2,41 ± 0,08	2,11 ± 0,12
<b>Cerebro</b>	2,01 ± 0,03	2,03 ± 0,04	1,97 ± 0,03

Los superíndices indican diferencias significativas respecto al grupo: <sup>a</sup>control, <sup>b</sup>40% RMet; \* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 10 animales diferentes.



**Figura 6.** Variación del peso corporal (g) durante el periodo experimental de los animales controles, 40% RMet y 80% RMet. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 10 animales diferentes. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>b</sup>40% RMet; \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ).

### 1.1.2. Consumo de oxígeno mitocondrial

El efecto de la restricción de metionina al 40 y 80% sobre las tasas de consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de hígado de rata se muestra en la Tabla 9. Estas medidas se llevaron a cabo en presencia de sustratos del complejo I (piruvato-malato y glutamato-malato) y del complejo II (succinato) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

En todos los casos, la adición de ADP estimuló significativamente el consumo de oxígeno desde el estado no fosforilante (estado 4) al fosforilante (estado 3), indicando la buena calidad de las preparaciones mitocondriales.

Sin embargo, al comparar la intensidad de consumo de oxígeno entre los diferentes grupos experimentales no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con ningún sustrato ni en el estado 4 ni en el 3 (Tabla 9).

Tampoco se encontraron diferencias entre los distintos grupos en el índice de control respiratorio (RCR) con ninguno de los sustratos empleados (Tabla 10), presentando dicho parámetro los valores más elevados con glutamato-malato.

**Tabla 9.** Efecto de la restricción de metionina al 40 y 80% sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado de rata suplementadas con piruvato-malato, glutamato-malato y succinato (y rotenona) como sustratos en ausencia (estado 4) y en presencia (estado 3) de ADP.

Sustrato	Control	40% RMet	80% RMet
<b>Piruvato-malato (Estado 4)</b>	5,4 ± 0,6	6,2 ± 0,8	5,6 ± 0,7
<b>Piruvato-malato (Estado 3)</b>	17,1 ± 1,3	19,1 ± 1,8	15,6 ± 1,0
<b>Glutamato-malato (Estado 4)</b>	8,8 ± 0,8	9,1 ± 1,3	9,8 ± 1,1
<b>Glutamato-malato (Estado 3)</b>	94,4 ± 5,8	96,6 ± 6,0	98,0 ± 8,1
<b>Succinato + rotenona (Estado 4)</b>	30,9 ± 2,4	30,7 ± 2,3	32,1 ± 2,6
<b>Succinato + rotenona (Estado 3)</b>	120 ± 9,1	123 ± 9,6	122 ± 9,4

Los resultados se expresan en nanomoles de  $O_2 / \text{min} \times \text{mg}$  proteína mitocondrial. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales. Los valores representan la media ± SEM de 10 animales diferentes.

**Tabla 10.** Efecto de la restricción de metionina al 40 y 80% sobre el índice de control respiratorio (RCR) en mitocondrias de hígado de rata suplementadas con piruvato-malato, glutamato-malato y succinato (y rotenona).

Sustrato	Control	40% RMet	80% RMet
<b>Piruvato-malato</b>	3,4 ± 0,3	3,3 ± 0,3	3,1 ± 0,3
<b>Glutamato-malato</b>	11,2 ± 0,8	11,8 ± 1,2	10,8 ± 0,9
<b>Succinato + rotenona</b>	3,9 ± 0,1	4 ± 0,1	3,9 ± 0,1

No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 10 animales diferentes.

### **1.1.3. Producción mitocondrial de radicales libres**

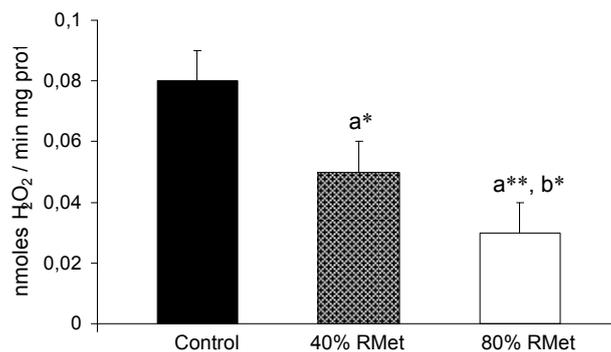
La tasa de producción basal de radicales libres en el complejo I con piruvato-malato como sustrato descendió significativamente en los grupos 40% RMet y 80% RMet respecto al grupo control ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente), y también fue significativamente menor cuando la restricción de metionina fue del 80% que cuando lo fue del 40% ( $p < 0,05$ ; Figura 7).

Con glutamato-malato ambos niveles de restricción también disminuyeron la tasa de generación basal de ROS en el complejo I de la cadena respiratoria ( $p < 0,01$  en el caso de 40% RMet y  $p < 0,001$  en el de 80% RMet), y de nuevo dicha tasa fue significativamente menor con el nivel más alto de restricción (80% RMet) que con el intermedio (40% RMet;  $p < 0,05$ ; Figura 8).

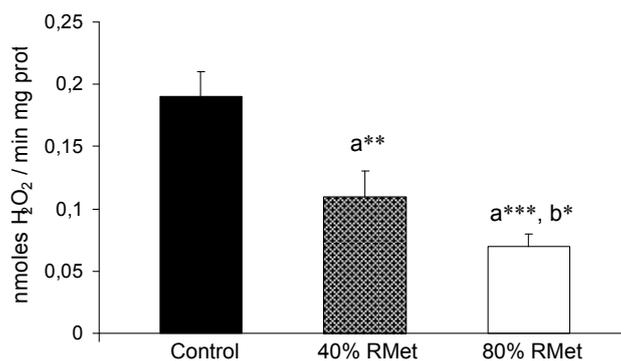
La tasa de producción basal de ROS en el complejo III se estimó empleando succinato como sustrato y rotenona (Figura 9a). Dicha tasa descendió significativamente tanto en el grupo 40% RMet como en el 80% RMet en relación con el grupo control ( $p < 0,01$ ), pero no se encontraron diferencias entre ambos niveles de restricción ( $p > 0,05$ ), y la magnitud del descenso fue mucho menor que con los sustratos de unión al complejo I. Cuando el mismo ensayo se realizó sin rotenona se observaron unos mayores niveles de ROS en ausencia del inhibidor que en su presencia, debido al flujo reverso de electrones hacia el complejo I; en este caso se observó un descenso en el nivel de ROS en el grupo 40% RMet con respecto a los otros dos ( $p < 0,01$ ), no encontrándose diferencias significativas entre los grupos control y 80% RMet ( $p > 0,05$ ; Figura 9b).

## Resultados

La estimación de las tasas máximas de generación de ROS se llevó a cabo usando combinaciones apropiadas de sustratos e inhibidores de la cadena respiratoria (Tabla 11). La reducción completa del complejo I se realizó añadiendo rotenona con piruvato-malato o glutamato-malato (sustratos de unión al complejo I). Aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística con piruvato-malato + rotenona ( $p > 0,05$ ), con glutamato-malato + rotenona si que se observó un descenso significativo en los grupos 40% RMet y 80% RMet en relación con el control ( $p < 0,01$ ). No se encontraron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre los distintos grupos para la producción máxima de ROS con succinato + antimicina A (reducción máxima del complejo III).

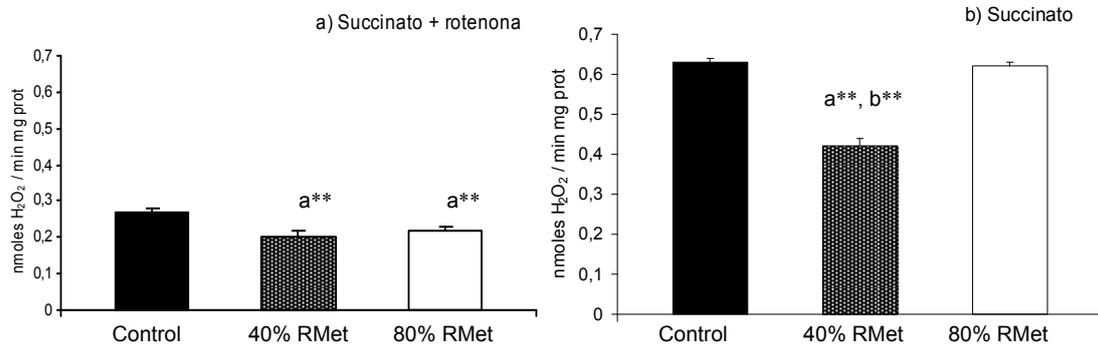


**Figura 7.** Tasa de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de hígado de ratas controles, 40% RMet y 80% RMet con piruvato-malato como sustrato. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>b</sup>40% RMet; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 10 animales diferentes.



**Figura 8.** Tasa de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de hígado de ratas controles, 40% RMet y 80% RMet con glutamato-malato como sustrato. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>b</sup>40% RMet; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 10 animales diferentes.

## Resultados



**Figura 9.** Tasas de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de hígado de ratas controles, 40% RMet y 80% RMet suplementadas con: a) Succinato y rotenona, y b) Succinato. Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control; <sup>b</sup>80% RMet; \*\*( $p < 0,01$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 10 animales diferentes.

**Tabla 11.** Tasas máximas de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria en mitocondrias de hígado de ratas controles, 40% RMet y 80% RMet.

Sustrato	Control	40% RMet	80% RMet
<b>Piruvato-malato + rotenona</b>	0,31 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,03
<b>Glutamato-malato + rotenona</b>	0,44 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,03 <sup>a**</sup>	0,27 $\pm$ 0,03 <sup>a**</sup>
<b>Succinato + rotenona + antimicina A</b>	1,93 $\pm$ 0,13	1,88 $\pm$ 0,15	1,83 $\pm$ 0,04

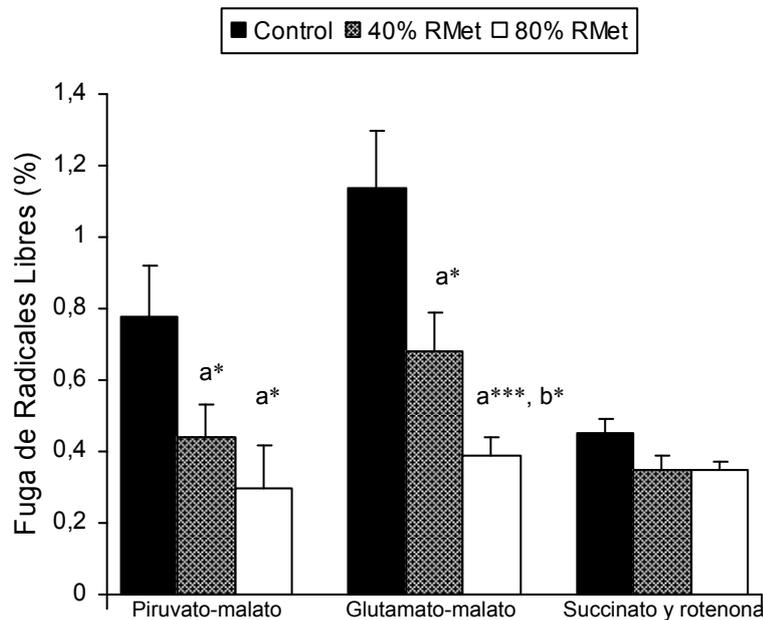
Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo control; \*\*( $p < 0,01$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 10 animales diferentes.

### 1.1.4. Fuga de radicales libres

La fuga de radicales libres (% , Figura 10) representa el porcentaje de electrones que se escapan de la cadena respiratoria mitocondrial dando lugar a ROS.

Con piruvato-malato dicho parámetro fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en los grupos restringidos en metionina que en el grupo control. Lo mismo se pudo observar con glutamato-malato ( $p < 0,05$  en el caso de 40% RMet y  $p < 0,001$  en el de 80% RMet) y, además, en este último caso se encontraron valores significativamente menores en el grupo 80% RMet que en el grupo 40% RMet ( $p < 0,05$ ). Con succinato (y rotenona), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p > 0,05$ ).

En conjunto se puede ver, pues, un claro descenso en la fuga de radicales libres en el complejo I de la cadena respiratoria, pero no en el III.



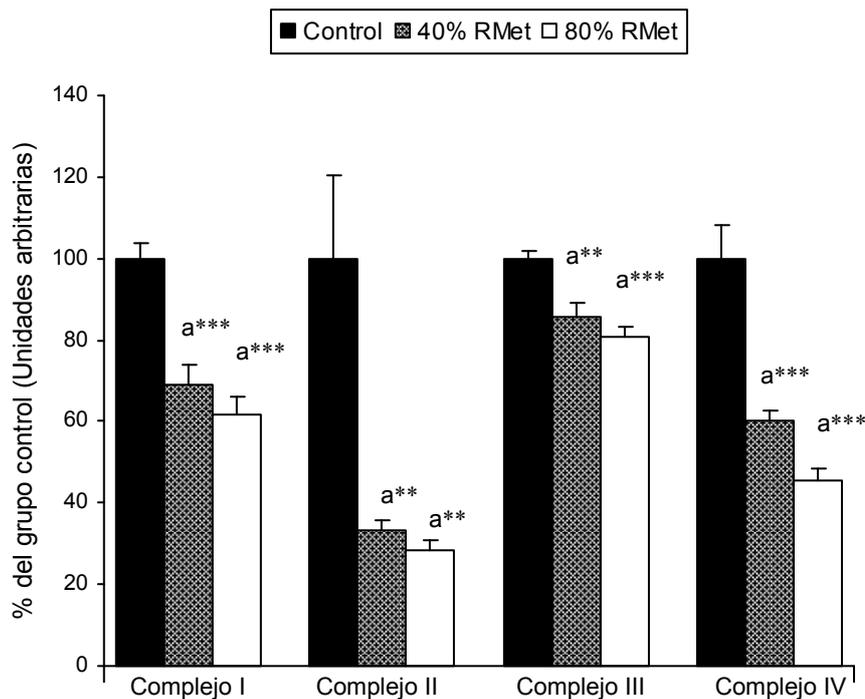
**Figura 10.** Efecto de la restricción de metionina al 40 y 80% sobre la fuga de radicales libres (%) en mitocondrias de hígado de rata, en presencia de piruvato-malato, glutamato-malato o succinato (+ rotenona) como sustratos. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>b</sup>40% RMet; \*( $p < 0,05$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 10 animales diferentes.

### **1.1.5. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

La abundancia de los complejos proteicos I, II, III y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial se muestra en la Figura 11.

Para todos los parámetros estudiados se encontraron niveles significativamente menores en los grupos 40% RMet y 80% RMet que en el grupo control, sin hallarse diferencias significativas entre ambos niveles de restricción. El mayor descenso (70%) se observó para el complejo II, y el menor (15-20%) para el complejo III.

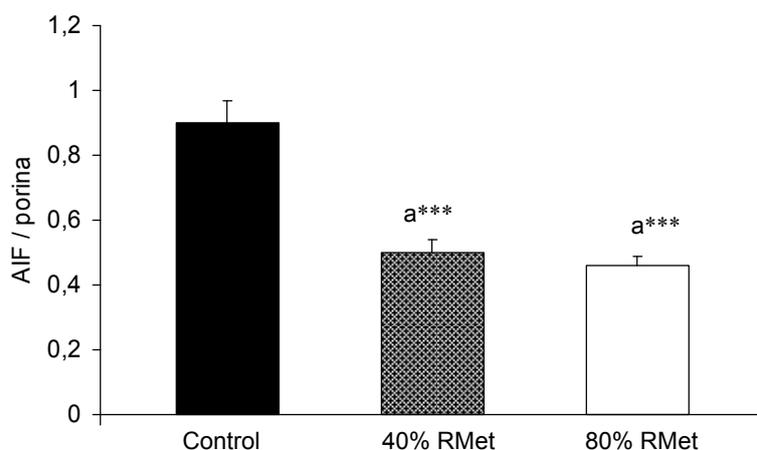
Aunque en todos los casos la abundancia de los complejos fue menor cuando la restricción de metionina aplicada fue del 80% que cuando lo fue del 40%, en ninguno de ellos dicha diferencia alcanzó la significación estadística.



**Figura 11.** Cantidad de los complejos I (sub 39KDa), II (sub 70KDa), III (sub 48KDa), y IV (sub 57KDa) de la cadena respiratoria, medida como el cociente de unidades del complejo / unidades de porina, en mitocondrias de hígado de ratas controles, 40% RMet y 80% RMet. Valores del grupo control:  $2,16 \pm 0,08$  (Complejo I),  $0,39 \pm 0,08$  (Complejo II),  $1,21 \pm 0,02$  (Complejo III),  $1,34 \pm 0,11$  (Complejo IV). Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo control; \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 10 animales diferentes.

### 1.1.6. Cantidad de AIF

En la Figura 12 se muestran los datos de la abundancia de AIF en las mitocondrias de hígado de ratas controles y restringidas en metionina, estimada como el cociente entre los moles de AIF y los de porina (utilizada como marcador mitocondrial). Como se puede observar, se produjo una disminución significativa de los niveles de AIF en los grupos 40% RMet y 80% RMet en relación al control ( $p < 0,001$ ), no encontrándose diferencias entre estos últimos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 12.** Abundancia de AIF (mol de AIF / mol porina) en mitocondrias de hígado de ratas controles, 40% RMet y 80% RMet. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo control; \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 10 animales diferentes.

### 1.1.7. Daño oxidativo a proteínas

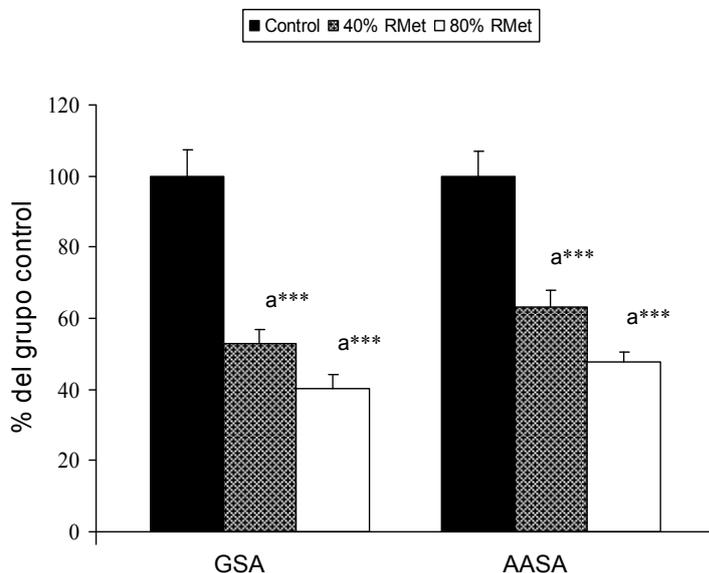
Las Figuras 13 y 14 recogen los distintos marcadores de daño oxidativo (GSA y AASA), glicooxidativo (CEL y CML) y lipooxidativo (CML y MDAL) que se analizaron en las proteínas mitocondriales de hígado de ratas controles y restringidas en metionina.

Los carbonilos proteicos GSA y AASA descendieron significativamente con la restricción de metionina ( $p < 0,001$ ; Figura 13) tanto al 40% como al 80% de restricción, en relación al grupo control. Aunque en ambos casos se obtuvieron menores niveles en el grupo 80% RMet que en 40% RMet, esta diferencia no alcanzó la significación estadística ( $p > 0,05$ ).

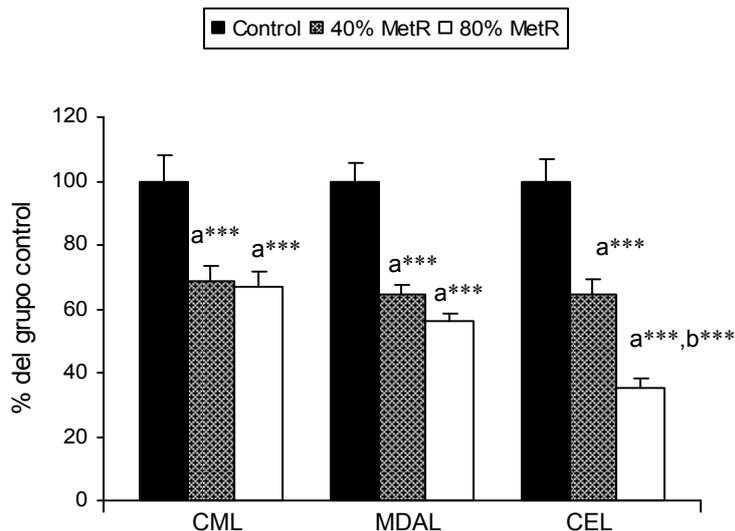
Los niveles de los aductos CML y MDAL disminuyeron significativamente en los grupos restringidos respecto al control ( $p < 0,001$ ; Figura 14). Del mismo modo fueron menores en los

## Resultados

animales 80% RMet que en los 40% RMet pero esta última diferencia no resultó ser significativa ( $p > 0,05$ ). Por su parte, el descenso en los niveles del marcador glicooxidativo CEL fue significativo a ambos niveles de restricción ( $p < 0,001$ ) respecto al grupo control, y también lo fue entre los grupos 40% RMet y 80% RMet (Figura 14).



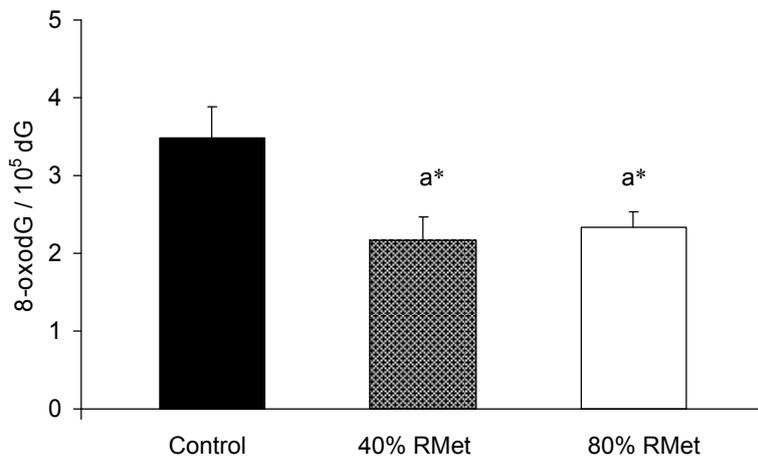
**Figura 13.** Efecto de la restricción de metionina al 40 y 80% sobre los niveles de los carbonilos proteicos GSA y AASA en mitocondrias de hígado de rata. Valores del grupo control:  $4461 \pm 334$  (GSA),  $246 \pm 17$  (AASA). Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo control; \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles} / \text{mol}$  lisina como la media  $\pm$  SEM de 10 animales diferentes.



**Figura 14.** Efecto de la restricción de metionina al 40 y 80% sobre los niveles de los marcadores de estrés glicooxidativo y/o lipooxidativo en mitocondrias de hígado de rata. Valores del grupo control:  $300 \pm 20$  (CEL),  $2052 \pm 169$  (CML),  $478 \pm 26$  (MDAL). Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>b</sup>40% RMet; \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles} / \text{mol}$  lisina como la media  $\pm$  SEM de 10 animales diferentes.

**1.1.8. Daño oxidativo al ADN mitocondrial**

El daño oxidativo al ADN mitocondrial se estimó en los distintos grupos experimentales como la razón 8-oxodG /  $10^5$  dG. Como se muestra en la Figura 15, los niveles de este marcador fueron significativamente menores ( $p < 0,001$ ) en las ratas 40% RMet y 80% RMet que en las ratas controles. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos restringidos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 15.** Daño oxidativo al ADN mitocondrial (8-oxodG /  $10^5$  dG) en hígado de ratas controles, 40% RMet y 80% RMet. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo control; \* ( $p < 0,05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 8-10 animales diferentes.

### **1.1.9. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales**

En la Tabla 12 se muestran el análisis de la composición de los ácidos grasos en mitocondrias de hígado de rata. La restricción de metionina al 40% incrementó significativamente los niveles de los ácidos linoleico (18:2n-6) y docosapentanoico (22:5n-3), y disminuyó los ácidos linolénico (18:3n-3) y araquidónico (20:4n-6) en comparación con el grupo control. Por su parte, la restricción de metionina al 80% incrementó de forma significativa los niveles de los ácidos esteárico (18:0), linoleico (18:2n-6) y adrenico (22:4n-6), y descendió el nivel de los ácidos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1n-7), oleico (18:1n-9), linolénico (18:3n-3), dihomo- $\gamma$ -linolénico (20:3n-6), y araquidónico (20:4n-6) en relación al grupo control. Cuando se compararon ambos niveles de restricción, en el grupo 80% RMet se encontraron menores niveles de los ácidos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1n-7), dihomo- $\gamma$ -linolénico (20:3n-6), araquidónico (20:4n-6) y mayores de esteárico (18:0) y linoleico (18:2n-6) que en el grupo 40% RMet.

A partir de estos ácidos grasos se calcularon las distintas fracciones lipídicas, que se muestran en la Figura 16. Así pues, se estudiaron el contenido total en ácidos grasos saturados (SFA) e insaturados (UFA) y, dentro de los insaturados, se analizaron por separado los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y los poliinsaturados (PUFA), desglosando estos últimos en ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 (PUFAn-3) y de la familia n-6 (PUFAn-6). Todas las fracciones lipídicas estudiadas fueron similares en los tres grupos experimentales ( $p > 0,05$ ) excepto los MUFA, que descendieron significativamente en el grupo 80% RMet ( $p < 0,05$ ) con respecto a los otros dos (Figura 16).

La longitud de cadena de los ácidos grasos de los lípidos hepáticos (ACL) no se vio alterada en ningún grupo experimental (Figura 17a).

Para analizar la posible variación en el número total de dobles enlaces se calculó el índice de dobles enlaces (DBI). Dicho índice descendió significativamente en el grupo 80% RMet frente al grupo control ( $p < 0,01$ ) y al 40% RMet ( $p < 0,01$ ), no observándose diferencias entre estos dos últimos (Figura 17b).

De forma paralela el índice de peroxidizabilidad lipídica (PI) de los ácidos grasos hepáticos, estimación de la susceptibilidad de los mismos a la peroxidación lipídica, sufrió un descenso significativo en el grupo sometido al mayor nivel de restricción de metionina (80%) en comparación a los otros dos grupos (Figura 17c).

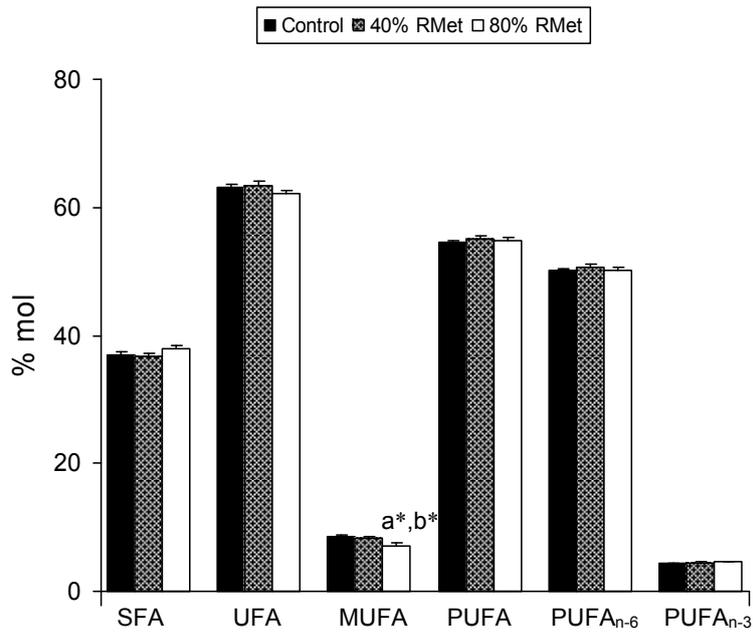
## Resultados

**Tabla 12.** Composición (% mol) de los ácidos grasos de las mitocondrias hepáticas en ratas controles, 40% RMet y 80% RMet.

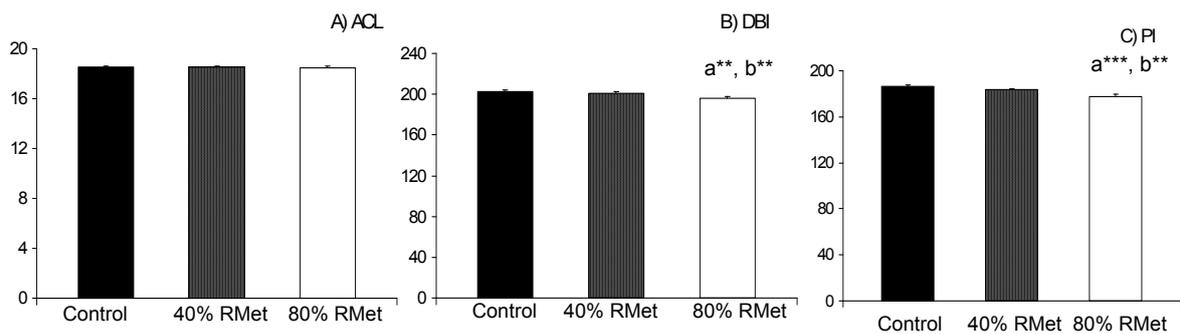
	Control	40% RMet	80% RMet
<b>14:0</b>	0,41 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,39 ± 0,03
<b>16:0</b>	16,36 ± 0,24	16,22 ± 0,26	15,43 ± 0,23 <sup>a**, b*</sup>
<b>16:1n-7</b>	0,70 ± 0,04	0,69 ± 0,06	0,43 ± 0,03 <sup>a***, b***</sup>
<b>18:0</b>	20,20 ± 0,41	20,06 ± 0,46	22,07 ± 0,43 <sup>a**, b**</sup>
<b>18:1n-9</b>	7,78 ± 0,30	7,61 ± 0,31	6,78 ± 0,35 <sup>a*</sup>
<b>18:2n-6</b>	15,85 ± 0,23	17,82 ± 0,45 <sup>a**</sup>	19,84 ± 0,48 <sup>a***, b**</sup>
<b>18:3n-3</b>	0,25 ± 0,02	0,17 ± 0,01 <sup>a**</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>a*</sup>
<b>20:3n-6</b>	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,14 ± 0,007 <sup>b*</sup>
<b>20:4n-6</b>	32,07 ± 0,17	30,38 ± 0,15 <sup>a***</sup>	27,73 ± 0,46 <sup>a***, b***</sup>
<b>22:4n-6</b>	1,55 ± 0,10	1,71 ± 0,14	1,99 ± 0,13 <sup>a*</sup>
<b>22:5n-6</b>	0,45 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,50 ± 0,03
<b>22:5n-3</b>	0,32 ± 0,02	0,44 ± 0,02 <sup>a**</sup>	0,37 ± 0,02
<b>22:6n-3</b>	3,82 ± 0,10	3,82 ± 0,14	4,09 ± 0,08

Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>b</sup>40% RMet; \*(p < 0,05), \*\*(p < 0,01), \*\*\*(p < 0,001). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 10 animales en todos los casos.

## Resultados



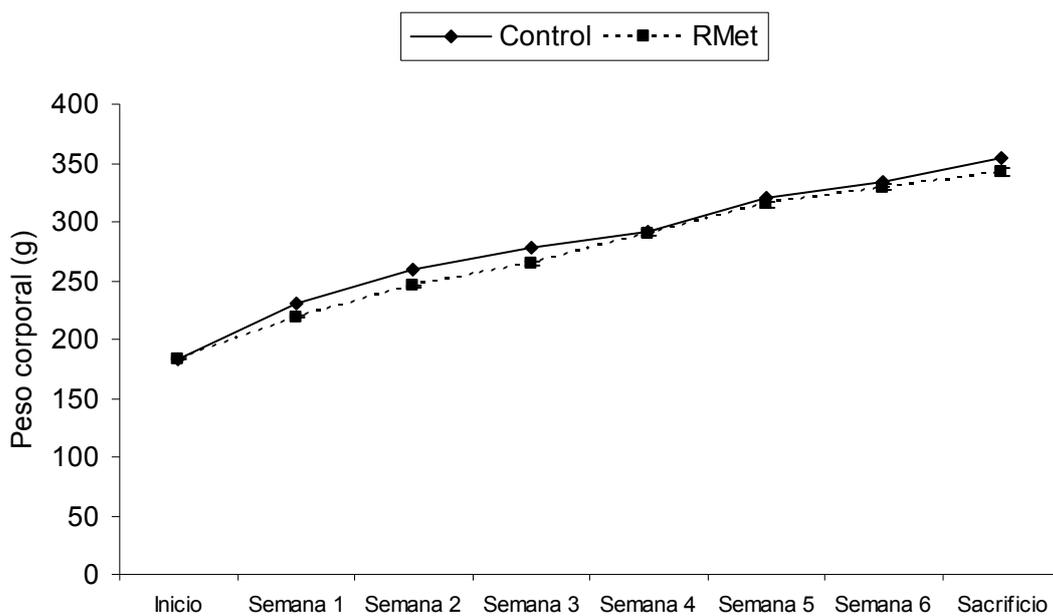
**Figura 16.** Efecto de la restricción de metionina al 40 y al 80% sobre las distintas fracciones lipídicas en mitocondrias de hígado de rata. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control, <sup>b</sup>40% RMet; \*( $p < 0,05$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM del % de moles de cada fracción de 10 animales diferentes.



**Figura 17.** Efecto de la restricción de metionina al 40 y 80% sobre: a) la longitud media de cadena (ACL), b) el índice de dobles enlaces (DBI), y c) el índice de peroxidizabilidad (PI) de los lípidos en mitocondrias de hígado de rata. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo: <sup>a</sup>control; <sup>b</sup>40% RMet; \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 10 animales diferentes en todos los casos.

**MODELO 1.2. RESTRICCIÓN DE METIONINA AL 40% EN CEREBRO Y RIÑÓN****1.2.1. Peso de animales y órganos**

De acuerdo con lo observado en el estudio anterior, la restricción de metionina al 40% (RMet) no alteró significativamente la evolución del peso corporal ni durante las 7 semanas de duración del tratamiento dietético ni al final de dicho periodo (Figura 18). Asimismo, no hubo cambios significativos en el peso de ningún órgano al final del periodo experimental (Tabla 13).



**Figura 18.** Variación del peso corporal (g) durante el periodo experimental de los animales controles y restringidos en metionina al 40% (RMet). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales diferentes.

**Tabla 13.** Peso de los órganos (g) de los animales controles y RMet.

	<b>Control</b>	<b>RMet</b>
<b>Hígado</b>	9,09 ± 0,15	9,13 ± 0,14
<b>Corazón</b>	0,88 ± 0,05	0,84 ± 0,03
<b>Bazo</b>	0,59 ± 0,03	0,63 ± 0,04
<b>Riñón</b>	1,98 ± 0,04	2,09 ± 0,07
<b>Cerebro</b>	1,85 ± 0,04	1,94 ± 0,07

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6-8 animales diferentes.

### **1.2.2. Consumo de oxígeno mitocondrial**

En la Tabla 14 se reflejan los valores del consumo de oxígeno en mitocondrias de cerebro y riñón de ratas controles y RMet. Como se puede apreciar, mientras que el consumo de oxígeno mitocondrial fue similar tanto en el estado 4 como en el 3 en mitocondrias de riñón de animales controles y RMet ( $p > 0,05$  en todos los casos), en el caso de las mitocondrias de cerebro la restricción de metionina al 40% dio lugar a un incremento significativo en el consumo de oxígeno mitocondrial en el estado fosforilante (estado 3), mientras que no se alteraron los valores del mismo en el estado de reposo (estado 4).

Por su parte, no se encontraron diferencias significativas en el RCR entre los grupos control y RMet con ninguno de los sustratos empleados (Tabla 15).

Resultados

**Tabla 14.** Efecto de la restricción de metionina al 40% sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de cerebro y riñón de rata suplementadas con piruvato-malato, glutamato-malato y succinato (y rotenona) como sustratos en ausencia (estado 4) y en presencia (estado 3) de ADP.

Sustrato	Cerebro		Riñón	
	Control	RMet	Control	RMet
<b>Piruvato-malato (Estado 4)</b>	11,2 ± 1,4	12,7 ± 0,5	24,8 ± 2,7	27,9 ± 1,8
<b>Piruvato-malato (Estado 3)</b>	22,4 ± 1,5	27,9 ± 2,1*	92,4 ± 8,6	93,4 ± 5,9
<b>Glutamato-malato (Estado 4)</b>	13,8 ± 2,3	16,2 ± 0,7	24,9 ± 2,5	29,2 ± 2,0
<b>Glutamato-malato (Estado 3)</b>	23,8 ± 1,9	30,3 ± 1,7*	80,5 ± 7,0	80,8 ± 10,0
<b>Succinato + rotenona (Estado 4)</b>	15,5 ± 1,7	17,6 ± 0,9	76,7 ± 3,9	76,8 ± 5,3
<b>Succinato + rotenona (Estado 3)</b>	20,3 ± 0,8	28,0 ± 2,9*	166,2 ± 21,4	190,6 ± 13,7

Los resultados se expresan en nanomoles de O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales; \*(p < 0,05). Los valores representan la media ± SEM de 8 animales diferentes.

**Tabla 15.** Efecto de la restricción de metionina al 40% sobre el índice de control respiratorio (RCR) en mitocondrias de cerebro y riñón de rata suplementadas con piruvato-malato, glutamato-malato y succinato (y rotenona).

Sustrato	Cerebro		Riñón	
	Control	RMet	Control	RMet
<b>Piruvato-malato</b>	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,2	3,9 ± 0,3	3,5 ± 0,3
<b>Glutamato-malato</b>	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,2	3,4 ± 0,3	2,8 ± 0,3
<b>Succinato + rotenona</b>	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,0

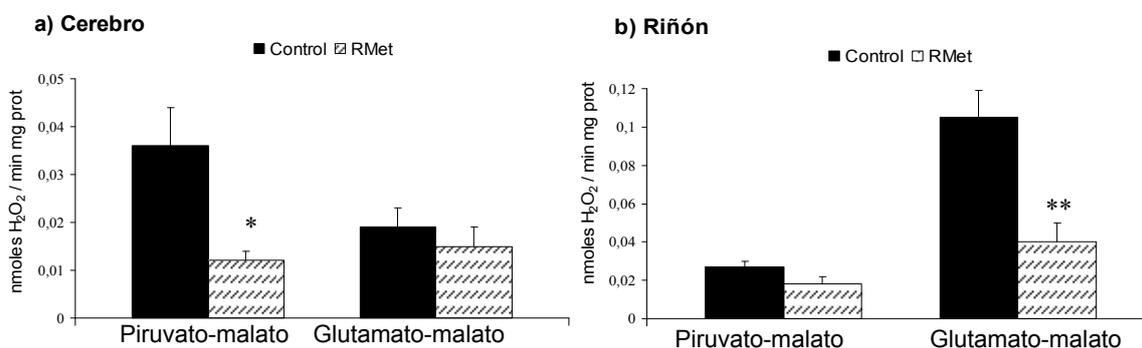
No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales diferentes.

### 1.2.3. Producción mitocondrial de radicales libres

En cerebro de rata, la restricción de metionina al 40% disminuyó la producción basal de radicales libres en el complejo I con piruvato-malato pero no con glutamato-malato como sustratos (Figura 19a); sin embargo, no alteró la producción máxima de ROS por parte de este complejo cuando se añadió rotenona a las mitocondrias de cerebro suplementadas con piruvato-malato ni con glutamato-malato (máximo estado de reducción del complejo I; Tabla 16).

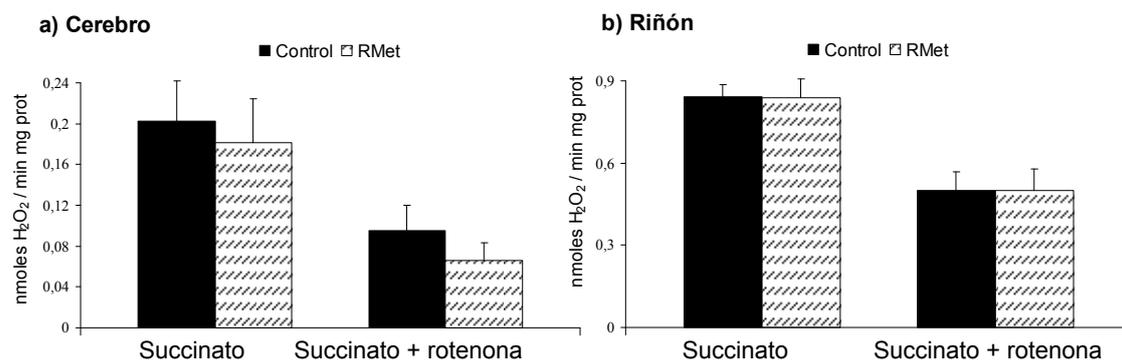
Por su parte, cuando se estudió la producción de ROS en mitocondrias de riñón, se apreció un descenso en la producción basal de radicales libres por parte del complejo I con piruvato-malato y glutamato-malato como sustratos, pero sólo alcanzó la significación estadística ( $p < 0,05$ ) en el segundo de los casos (Figura 19b). Al igual que se observó en cerebro, la restricción de metionina no cambió los niveles máximos de producción de ROS en el complejo I en mitocondrias de riñón (Tabla 16).

La tasa de producción basal de ROS por parte del complejo III (con succinato y rotenona) no varió entre los grupos control y RMet ni en mitocondrias de cerebro (Figura 20a) ni de riñón (Figura 20b), y lo mismo puede decirse cuando se analizó la tasa máxima de producción de ROS por parte de este complejo, es decir, cuando el complejo III se reduce completamente tras añadir antimicina A a las mitocondrias suplementadas con succinato y rotenona (Tabla 16). Cuando los ensayos con succinato se llevaron a cabo en ausencia de rotenona (permitiendo así el flujo reverso de electrones hacia el complejo I), aunque los niveles de radicales libres fueron mayores que en los ensayos realizados en presencia de rotenona, tampoco se encontraron variaciones entre los grupos experimentales ( $p > 0,05$ ) en ninguno de los dos órganos analizados (Figura 20a y b).



**Figura 19.** Efecto de la restricción de metionina al 40% sobre la tasa basal de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) por parte del complejo I en mitocondrias de: a) cerebro y b) riñón de ratas controles y RMet con piruvato-malato y glutamato-malato como sustratos. Los superíndices muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales diferentes.

## Resultados



**Figura 20.** Efecto de la restricción de metionina al 40% sobre las tasa de producción de  $H_2O_2$  (nanomoles de  $H_2O_2$  / min  $\times$  mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de: a) cerebro y b) riñón de rata suplementadas con succinato (con y sin rotenona). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales diferentes.

**Tabla 16.** Tasas máximas de producción de  $H_2O_2$  (nanomoles de  $H_2O_2$  / min  $\times$  mg proteína mitocondrial) en los complejos I y III, en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria en mitocondrias de cerebro y riñón de ratas controles y RMet.

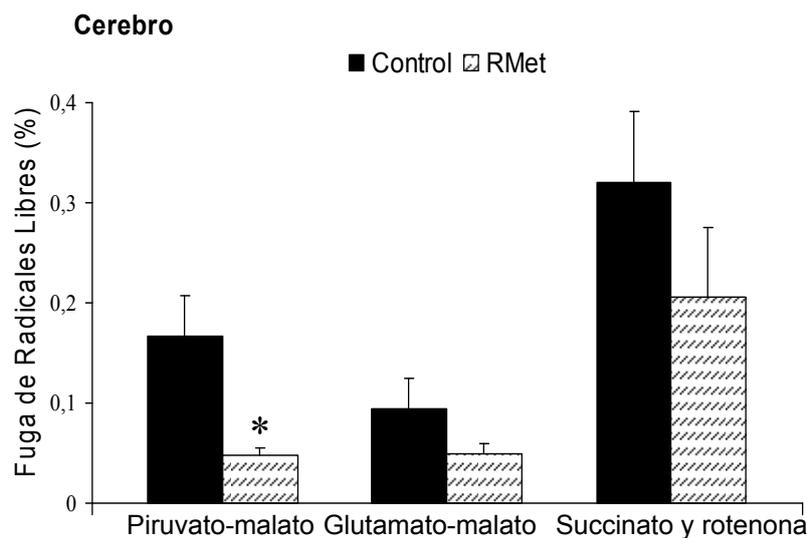
Sustrato	Cerebro		Riñón	
	Control	RMet	Control	RMet
<b>Piruvato-malato + rotenona</b>	0,291 $\pm$ 0,041	0,245 $\pm$ 0,058	1,059 $\pm$ 0,085	1,071 $\pm$ 0,117
<b>Glutamato-malato + rotenona</b>	0,205 $\pm$ 0,019	0,209 $\pm$ 0,040	1,076 $\pm$ 0,091	0,097 $\pm$ 0,128
<b>Succinato + rotenona + antimicina A</b>	0,808 $\pm$ 0,06	0,810 $\pm$ 0,063	8,464 $\pm$ 0,521	7,705 $\pm$ 0,765

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales diferentes.

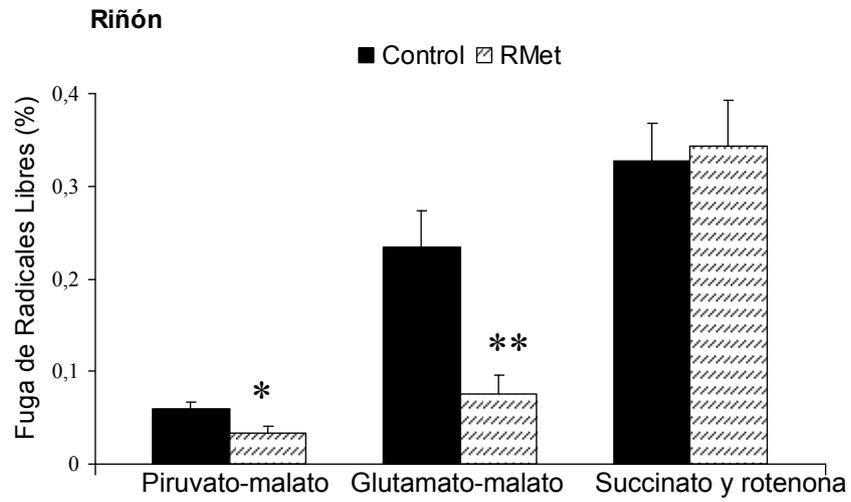
### 1.2.4. Fuga de radicales libres

La restricción de metionina generó un descenso en la fuga de radicales libres en cerebro de rata con todos los sustratos empleados, descenso que fue significativo ( $p < 0,05$ ) con piruvato-malato pero no con glutamato-malato ni con succinato (y rotenona) como sustratos (Figura 21).

Con respecto al riñón, la fuga de radicales libres fue significativamente menor en el complejo I de la cadena respiratoria tanto con piruvato-malato ( $p < 0,05$ ) como con glutamato-malato ( $p < 0,01$ ) como sustratos, y no se alteró cuando el sustrato empleado fue succinato (y rotenona; Figura 22).



**Figura 21.** Efecto de la restricción de metionina al 40% sobre la fuga de radicales libres (%) en mitocondrias de cerebro de rata, en presencia de piruvato-malato, glutamato-malato o succinato (y rotenona) como sustratos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales;  $*(p < 0,05)$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 7-8 animales diferentes.



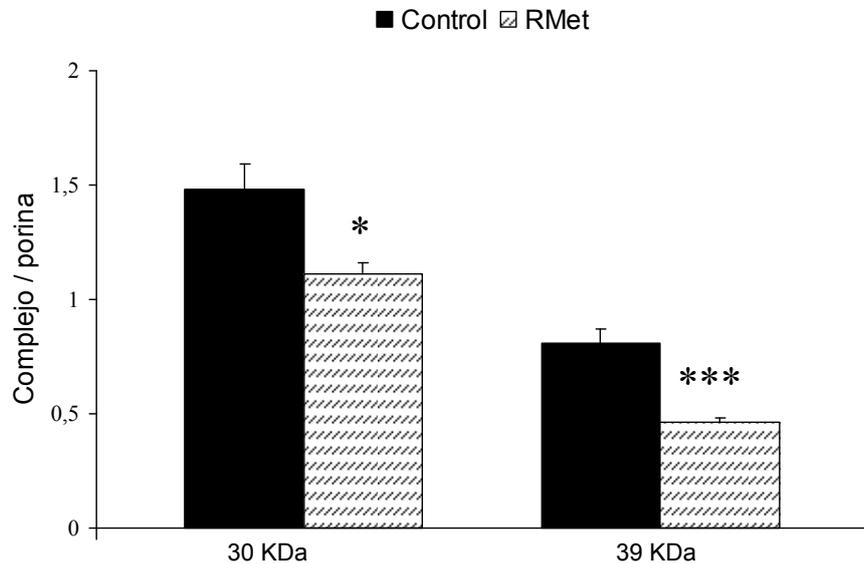
**Figura 22.** Efecto de la restricción de metionina al 40% sobre la fuga de radicales libres (%) en mitocondrias de riñón de rata en presencia de piruvato-malato, glutamato-malato o succinato (y rotenona) como sustratos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 7-8 animales diferentes.

### **1.2.5. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

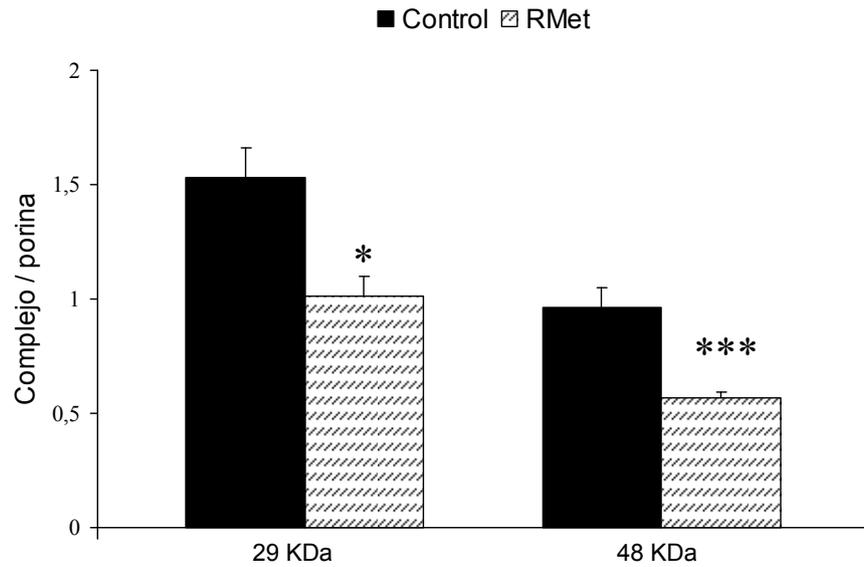
La abundancia de los complejos proteicos I, II, III y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en cerebro de ratas controles y RMet se muestra en las Figuras 23, 24 y 25.

En todos los casos se encontraron menores niveles en el grupo RMet que en el control, pero los cambios detectados para los complejos II y IV no alcanzaron la significación estadística ( $p > 0,05$ ; Figura 25); sin embargo, la restricción de metionina sí consiguió descender significativamente el contenido de los complejos I y III (Figuras 23 y 24).

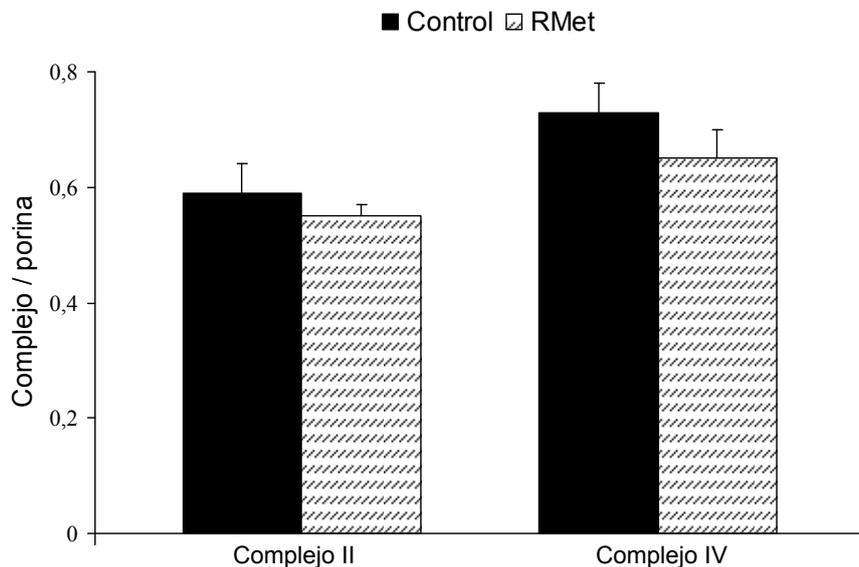
La menor abundancia del complejo I se observó tanto con anticuerpos para la subunidad NDUFS3, de 30KDa (25% de descenso) como para la subunidad NDUF9, de 39KDa (43%) (Figura 23) y, en el caso del complejo III (el otro complejo de la cadena respiratoria mitocondrial capaz de generar ROS), la menor abundancia también se observó con anticuerpos frente a las dos subunidades analizadas (Figura 24), la proteína Rieske, de 29KDa (34%), y CORE 2, de 48KDa (40%).



**Figura 23.** Cantidad de las subunidades 30KDa y 39KDa del complejo I de la cadena respiratoria, medida como el cociente de unidades del complejo / unidades porina, en cerebro de ratas controles y restringidas en metionina. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales; \* ( $p < 0,05$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5-7 animales diferentes.



**Figura 24.** Cantidad de las subunidades 29KDa y 48KDa del complejo III de la cadena respiratoria, estimada como el cociente de unidades del complejo / unidades porina, en cerebro de ratas controles y restringidas en metionina. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales; \*( $p < 0,05$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5-7 animales diferentes.

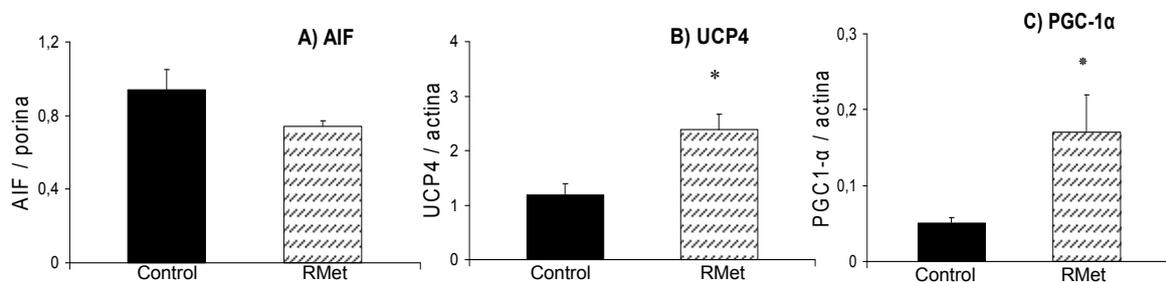


**Figura 25.** Cantidad de los complejos II (subunidad 70KDa) y IV (subunidad 57KDa) de la cadena respiratoria, estimada como el cociente de unidades del complejo / unidades porina, en cerebro de ratas controles y restringidas en metionina. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5-7 animales diferentes.

### 1.2.6. Cantidad de AIF, PGC-1 $\alpha$ y UCP4

La abundancia relativa de la flavoproteína mitocondria AIF, estimada como el cociente entre los moles de AIF y los de porina, descendió en el cerebro de las ratas restringidas en metionina, en relación a las controles, pero dicho descenso no resultó ser significativamente estadístico ( $p > 0,05$ ; Figura 26a).

Por su parte, los nivel de la proteína mitocondrial UCP4 y del factor de biogénesis mitocondrial PGC-1 $\alpha$  se incrementaron significativamente con la restricción de metionina ( $p < 0,05$  en ambos casos) (Figuras 26b y c).



**Figura 26.** Abundancia de: a) AIF, b) UCP4 y c) PGC-1 $\alpha$ , cuantificadas por densitometría como unidades arbitrarias normalizadas para porina (AIF) o actina (UCP4 y PGC-1 $\alpha$ ) en cerebro de ratas controles y restringidas en metionina. Los superíndices muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales; \*( $p < 0,05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 5-7 muestras.

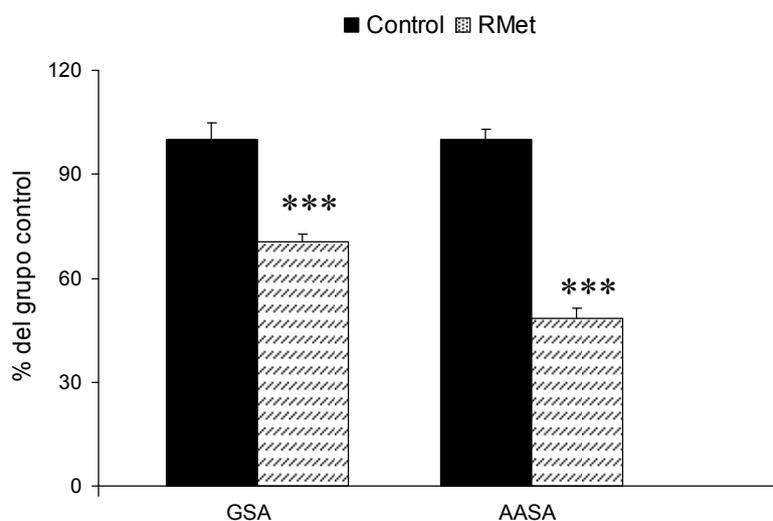
### 1.2.7. Daño oxidativo a proteínas

En las Figuras 27 y 28 se recogen los distintos marcadores específicos de oxidación, lipooxidación y glicooxidación en proteínas de cerebro de ratas Wistar tras ser sometidas a restricción de metionina durante 7 semanas.

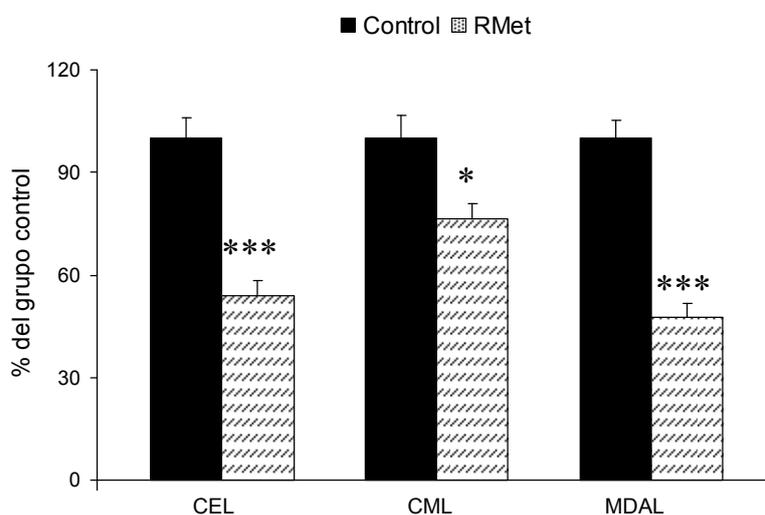
La comparación entre ratas controles y tratadas reveló que la restricción de metionina está asociada a diferencias relevantes en los niveles de los distintos marcadores de daño a proteínas analizados. Todos los marcadores analizados (GSA, AASA, CML, CEL y MDAL) mostraron niveles significativamente menores en el grupo RMet, con una media de descenso de un 40%. La magnitud del descenso fue de cerca del 30% para GSA, 52% para AASA (Figura 27), 46% para CEL, 24% para CML y 53% en el caso de MDAL (Figura 28), sugiriendo

## Resultados

pues un menor estatus generalizado del daño oxidativo a proteínas inducido por la restricción de metionina.



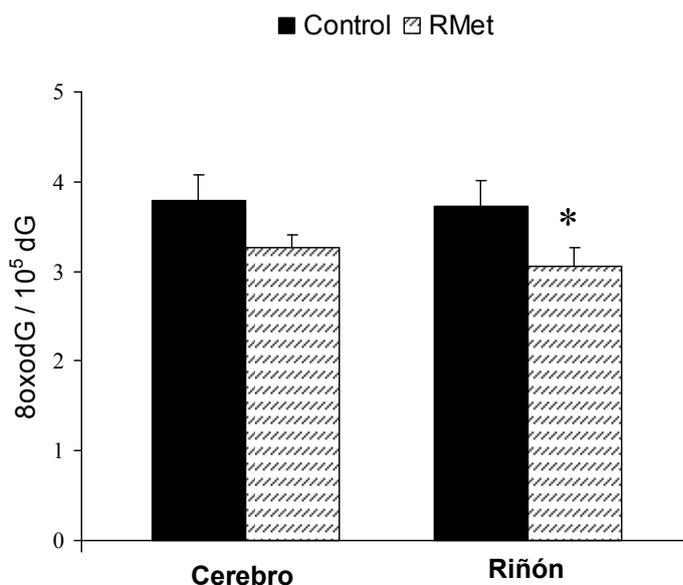
**Figura 27.** Efecto de la restricción de metionina sobre los niveles de los carbonilos proteicos GSA y AASA en proteínas de cerebro de rata. Valores del grupo control:  $8240 \pm 403$  (GSA),  $197 \pm 6$  (AASA). Unidades =  $\mu\text{moles} / \text{mol}$  lisina. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo control; \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5-7 animales diferentes.



**Figura 28.** Efecto de la restricción de metionina sobre los niveles de estrés glicooxidativo y/o lipooxidativo en proteínas de cerebro de rata. Unidades =  $\mu\text{moles} / \text{mol}$  lisina. Valores del grupo control:  $319 \pm 19$  (CEL),  $1917 \pm 130$  (CML),  $337 \pm 18$  (MDAL). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; \* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5-7 animales diferentes.

### 1.2.8. Daño oxidativo al ADN mitocondrial

Como se aprecia en la Figura 29, el daño oxidativo al ADN mitocondrial, estimado como el cociente  $8\text{-oxodG} / 10^5 \text{ dG}$ , fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en el riñón de los animales restringidos en metionina al 40% que en el de los controles. En cerebro, sin embargo, la restricción de metionina al 40% generó un ligero descenso en los niveles de daño oxidativo al ADN mitocondrial, pero dicho descenso no alcanzó la significación estadística ( $p > 0,05$ ).



**Figura 29.** Daño oxidativo al ADN mitocondrial ( $8\text{-oxodG} / 10^5 \text{ dG}$ ) en cerebro y riñón de ratas controles y RMet. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos control y RMet;  $*(p < 0,05)$ . Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 6-8 animales diferentes.

### 1.2.9. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales

La restricción de metionina alteró la composición en ácidos grasos de los lípidos totales de cerebro de rata (Tabla 17). Como se observa, en el grupo RMet el nivel de los ácidos oleico ( $18:1n-9$ ), linoleico ( $18:2n-6$ ), docosapentanoico de la serie 3 ( $22:5n-3$ ) y 6 ( $22:5n-6$ ), y nervónico ( $24:1n-9$ ) se incrementó significativamente en relación al grupo control, mientras que se observó un significativo descenso en el nivel de los ácidos grasos altamente insaturados araquidónico ( $20:4n-6$ ), adrenico ( $22:4n-6$ ) y docosahexanoico ( $22:6n-3$ ).

En lo que se refiere a las distintas fracciones lipídicas (Figura 30), el total de ácidos grasos saturados (SFA) e insaturados (UFA) fue similar en ambos grupos ( $p > 0,05$ ); sin

## Resultados

embargo, dentro de la fracción de insaturados, la restricción de metionina provocó un incremento significativo en el nivel de ácidos monoinsaturados (MUFA;  $p < 0,01$ ) y un descenso en el de poliinsaturados (PUFA;  $p < 0,001$ ) y, en particular, en los PUFA de la serie 6 ( $p < 0,001$ ).

La composición acil de la membrana indica que las membranas de cerebro mantienen una longitud media de cadena (ACL) de ácidos grasos similar, de cerca de 18 átomos de carbono ( $p > 0,05$ ) en las ratas controles y restringidas en metionina (Figura 31a).

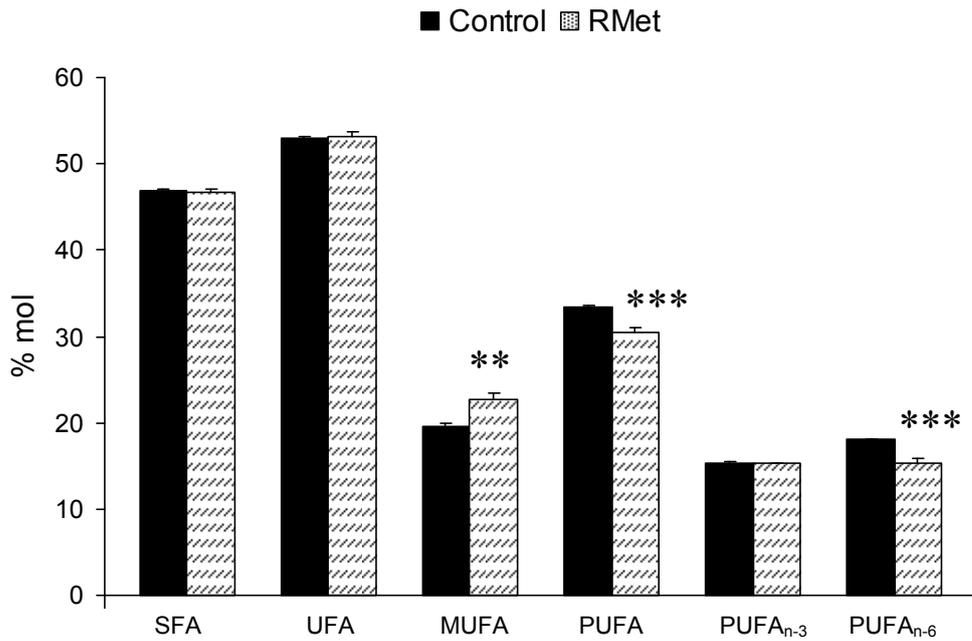
Sin haberse observado cambios en la cantidad de UFA, el índice de dobles enlaces (DBI), y el índice de peroxidizabilidad (PI) descendieron significativamente en el grupo RMet, en un 5,2% y 6,8%, respectivamente (Figuras 31a y b).

**Tabla 17.** Composición en ácidos grasos de los lípidos de cerebro en ratas controles y restringidas en metionina.

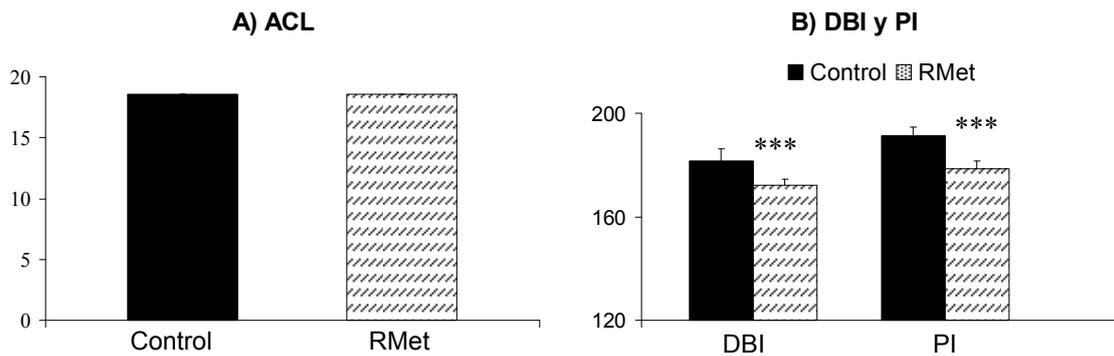
	Control	RMet
<b>14:0</b>	0,32 ± 0,05	0,26 ± 0,02
<b>16:0</b>	22,99 ± 0,29	22,78 ± 0,30
<b>16:1n-7</b>	0,27 ± 0,01	0,30 ± 0,008
<b>18:0</b>	22,28 ± 0,19	21,82 ± 0,56
<b>18:1n-9</b>	19,10 ± 0,25	22,08 ± 0,73**
<b>18:2n-6</b>	0,82 ± 0,03	1,00 ± 0,04*
<b>20:0</b>	1,19 ± 0,10	1,43 ± 0,14
<b>20:3n-6</b>	0,15 ± 0,004	0,14 ± 0,004
<b>20:4n-6</b>	13,03 ± 0,12	10,70 ± 0,49**
<b>22:4n-6</b>	3,52 ± 0,04	2,86 ± 0,09***
<b>22:5n-6</b>	0,46 ± 0,01	0,56 ± 0,03*
<b>22:5n-3</b>	1,10 ± 0,07	1,54 ± 0,05***
<b>22:6n-3</b>	14,25 ± 0,08	13,70 ± 0,11**
<b>24:0</b>	0,14 ± 0,004	0,41 ± 0,20
<b>24:1n-9</b>	0,28 ± 0,01	0,32 ± 0,008*

Unidades: % mol. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los valores representan la media ± SEM de 7 muestras diferentes.

## Resultados



**Figura 30.** Efecto de la restricción de metionina sobre las distintas fracciones lipídicas en cerebro de rata. Los superíndices indican diferencias significativas con el grupo control; \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM del % de moles de cada fracción de 7 muestras diferentes.



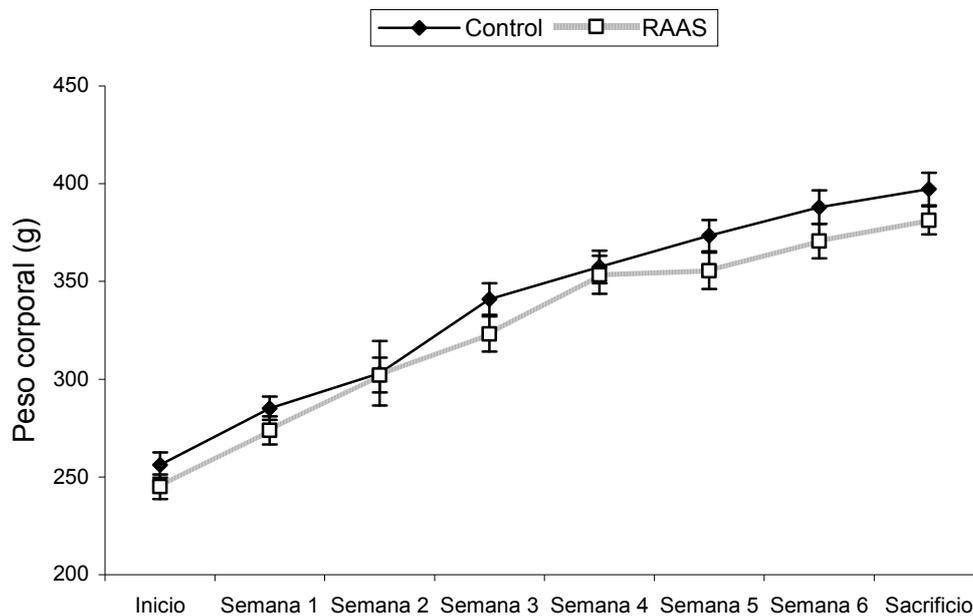
**Figura 31.** Efecto de la restricción de metionina sobre: a) la longitud media de cadena (ACL), y b) el índice de dobles enlaces (DBI) y el índice de peroxidizabilidad (PI) de los lípidos en cerebro de rata. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos control y RMet; \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 5-7 animales diferentes.

### MODELO 1.3. RESTRICCIÓN AL 40% DE TODOS LOS AMINOÁCIDOS DE LA DIETA EXCEPTO METIONINA EN HÍGADO

#### 1.3.1. Peso de animales y órganos

El peso corporal de las ratas Wistar sometidas a una restricción del 40% en todos los aminoácidos de la dieta excepto la metionina (RAAS) no varió significativamente en relación con las ratas pertenecientes al grupo control ( $p > 0,05$ ) ni durante las 7 semanas de restricción ni al final de dicho periodo experimental, como se aprecia en la Figura 32.

La Tabla 18 recoge el peso de los distintos órganos al final del tratamiento dietético. Como se puede observar, el tamaño del riñón fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ) en el grupo RAAS que en el control, no observándose diferencias en el resto de los órganos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 32.** Variación del peso corporal (g) durante las 7 semanas de periodo experimental de los animales controles y restringidos al 40% en todos los aminoácidos de la dieta excepto en metionina (RAAS). No se encontraron diferencias significativas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales diferentes.

## Resultados

**Tabla 18.** Peso de los órganos (g) de los animales controles y RAAS.

	<b>Control</b>	<b>RAAS</b>
<b>Hígado</b>	8,96 ± 0,37	8,57 ± 0,29
<b>Corazón</b>	0,87 ± 0,04	0,84 ± 0,02
<b>Bazo</b>	0,54 ± 0,02	0,50 ± 0,01
<b>Riñón</b>	2,10 ± 0,05	1,83 ± 0,03***
<b>Cerebro</b>	2,01 ± 0,03	2,02 ± 0,06

Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos control y RAAS; \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 8 animales diferentes.

### **1.3.2. Consumo de oxígeno mitocondrial**

La tasa de consumo de oxígeno se midió en ausencia (estado 4) y en presencia (estado 3) de ADP en mitocondrias hepáticas aisladas a partir de ratas controles y RAAS, empleando para ello distintos sustratos de la cadena respiratoria mitocondrial.

La adición de ADP estimuló significativamente el consumo de oxígeno desde el estado no fosforilante (estado 4) al fosforilante (estado 3) en todos los casos, lo cual es un indicativo de la buena calidad de las preparaciones mitocondriales.

Cuando se comparó la intensidad de consumo de oxígeno entre los grupos experimentales no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con ningún sustrato ni en el estado no fosforilante ni en el fosforilante (Tabla 19).

Del mismo modo, tampoco se encontraron diferencias en el RCR con ninguno de los sustratos empleados (Tabla 20), presentando dicho parámetro los valores más elevados con glutamato-malato.

## Resultados

**Tabla 19.** Efecto de la restricción al 40% de todos los aminoácidos excepto la metionina sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado de rata suplementadas con distintos sustratos en ausencia (estado 4) y en presencia (estado 3) de ADP.

Sustrato	Control	RAAS
<b>Piruvato-malato</b>		
<b>Estado 4</b>	6,9 ± 0,8	7,4 ± 0,9
<b>Estado 3</b>	23,5 ± 1,7	24,5 ± 2,2
<b>Glutamato-malato</b>		
<b>Estado 4</b>	9,4 ± 1	9 ± 0,6
<b>Estado 3</b>	91,1 ± 3,9	88,9 ± 3,9
<b>Succinato + rotenona</b>		
<b>Estado 4</b>	28 ± 2,7	26,5 ± 1,9
<b>Estado 3</b>	112,1 ± 8,3	103,5 ± 6,7

Los resultados se expresan en nanomoles de O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales. Los valores se expresan como la media ± SEM de 8 animales diferentes.

**Tabla 20.** Efecto de la restricción de aminoácidos (excepto metionina) al 40% sobre el RCR en mitocondrias de hígado de rata suplementadas con distintos sustratos.

	Control	RAAS
<b>Piruvato-malato</b>	3,7 ± 0,5	3,8 ± 0,8
<b>Glutamato-malato</b>	10,4 ± 1	10,3 ± 1
<b>Succinato + rotenona</b>	4,1 ± 0,2	4,1 ± 0,2

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Los valores se expresan como la media ± SEM de 8 animales diferentes.

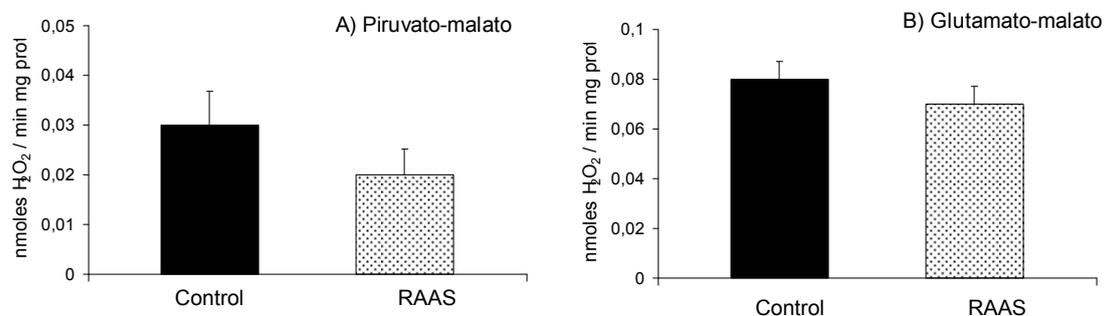
### 1.3.3. Producción mitocondrial de radicales libres

La restricción de aminoácidos al 40% (excepto metionina) no varió la intensidad de producción basal de radicales libres en mitocondrias de hígado cuando estas fueron suplementadas con los sustratos de unión al complejo I piruvato-malato (Figura 33a) y glutamato-malato (Figura 33b), ni cuando lo fueron con el sustrato de unión al complejo II succinato (y rotenona; Figura 33b), indicando de este modo que la producción basal de ROS no se vio alterada con la restricción de aminoácidos ni en el complejo I ni en el III.

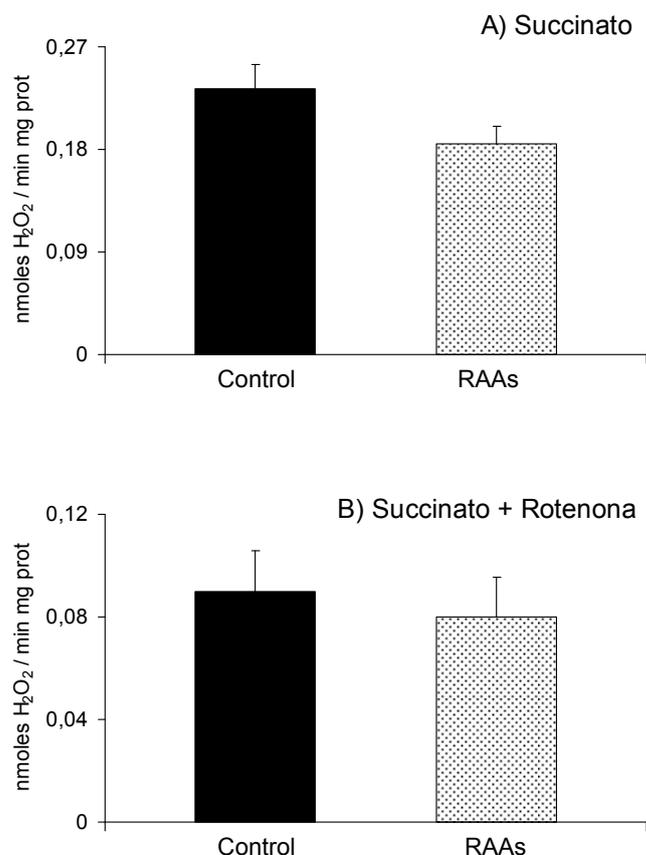
Al comparar la producción mitocondrial de radicales libres entre mitocondrias suplementadas únicamente con succinato (Figura 34a) y mitocondrias suplementadas con dicho sustrato y rotenona (Figura 34b) se obtuvo lo esperado: un incremento significativo de la producción de radicales libres en ausencia del inhibidor debido al flujo reverso de electrones que en este caso ocurre hacia el complejo I.

La Tabla 21 recoge las tasas máximas de producción de ROS por los complejos respiratorios cuando estos están completamente reducidos. El inhibidor respiratorio rotenona se añadió a las preparaciones mitocondriales suplementadas con piruvato-malato y con glutamato-malato para reducir completamente el complejo I y estudiar así la producción máxima de radicales libres por parte de dicho complejo. La producción de ROS fue menor en el grupo RAAS que en el control, alcanzando la significación estadística ( $p < 0,05$ ) solo en el caso del glutamato-malato pero no en el de piruvato-malato.

La adición del inhibidor antimicina A se empleó para estudiar la producción máxima de radicales libres del complejo III (completamente reducido). No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.



**Figura 33.** Efecto de la restricción al 40% de todos los aminoácidos de la dieta excepto la metionina sobre la tasa de producción basal de radicales libres (nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) en el complejo I de la cadena respiratoria. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p > 0,05$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales diferentes.



**Figura 34.** Tasa de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de hígado de ratas controles y RAAS suplementadas con a) succinato y b) succinato y rotenona. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales diferentes.

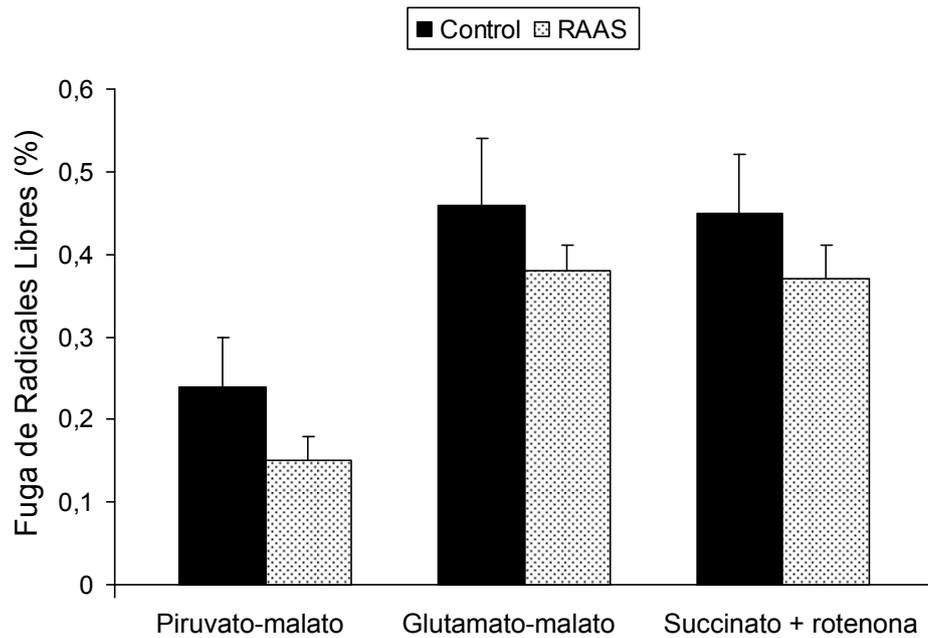
**Tabla 21.** Tasas máximas de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria en mitocondrias de hígado de ratas controles y RAAS.

	Control	RAAS
<b>Piruvato-malato + rotenona</b>	0,135 ± 0,008	0,115 ± 0,011
<b>Glutamato-malato + rotenona</b>	0,161 ± 0,012	0,134 ± 0,007*
<b>Succinato + rotenona + antimicina A</b>	0,826 ± 0,043	0,843 ± 0,061

Los superíndices muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales; \*(p < 0,05). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 animales diferentes.

### 1.3.4. Fuga de radicales libres

Cuando se comparó la fuga de radicales libres (%) entre los grupos control y RAAS, aunque con todos los sustratos empleados se observó un descenso en el grupo restringido, esta diferencia no resultó ser significativa ( $p > 0,05$ ) en ninguno de los casos (Figura 35).



**Figura 35.** Efecto de la restricción al 40% de todos los aminoácidos de la dieta excepto la metionina sobre la fuga de radicales libres en los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en ningún caso ( $p > 0,05$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales diferentes.

### **1.3.5. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

De acuerdo a la ausencia de efecto de la restricción de aminoácidos sobre la producción mitocondrial de ROS, y tal como se observa en la Tabla 22, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la abundancia relativa de ninguno de los 4 complejos de la cadena respiratoria mitocondrial entre los grupos control y RAAS.

**Tabla 22.** Abundancia relativa de los complejos respiratorios mitocondriales en mitocondrias de hígado de ratas controles y RAAS.

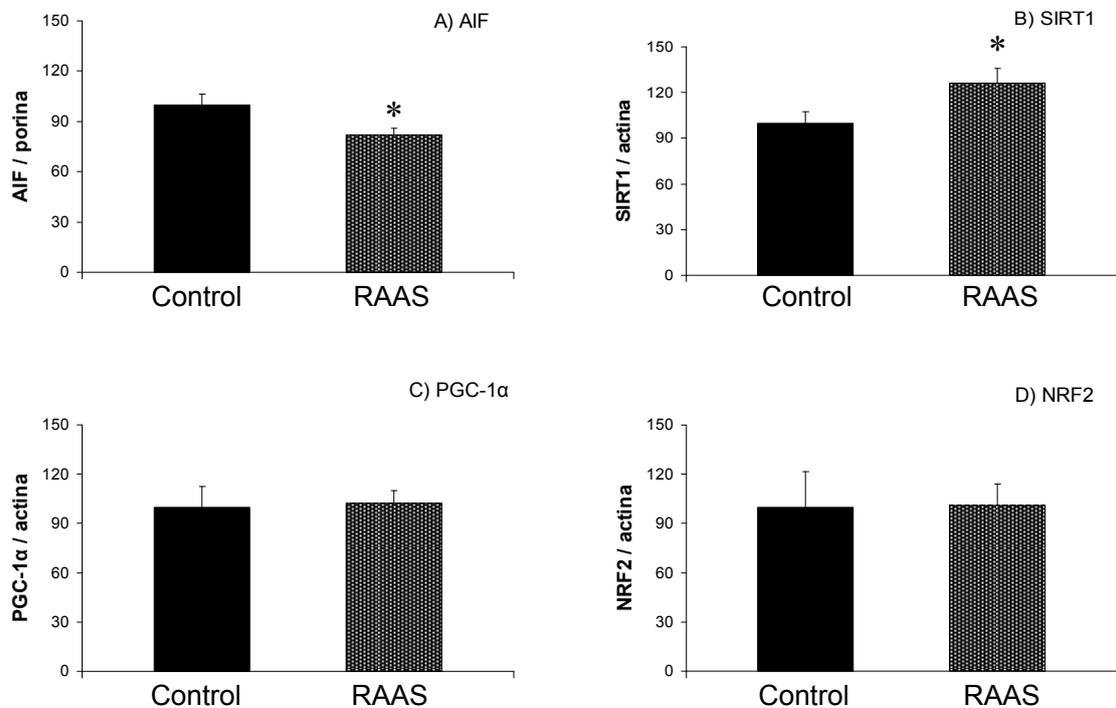
	<b>Control</b>	<b>RAAS</b>
<b>Complejo I- sub 30KDa</b>	100 ± 8,77	87,38 ± 4,17
<b>Complejo I- sub 39KDa</b>	100 ± 9,57	94,45 ± 3,08
<b>Complejo II-sub 70KDa</b>	100 ± 11,51	125,67 ± 8,13
<b>Complejo III- sub 29KDa</b>	100 ± 11,44	85,19 ± 5,55
<b>Complejo III-sub 48KDa</b>	100 ± 8,64	80,09 ± 4,30
<b>Complejo IV-sub 57KDa</b>	100 ± 5,94	90,10 ± 13,80

Los resultados se expresan en unidades arbitrarias normalizadas para porina. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y RAAS en ninguno de los casos. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 5-7 animales diferentes.

### 1.3.6. Cantidad de AIF, SIRT1, PGC-1 $\alpha$ y NRF-2

La Figura 36 muestra la abundancia de los factores de biogénesis mitocondrial PGC-1 $\alpha$  y NRF-2, así como de las proteínas AIF y SIRT1.

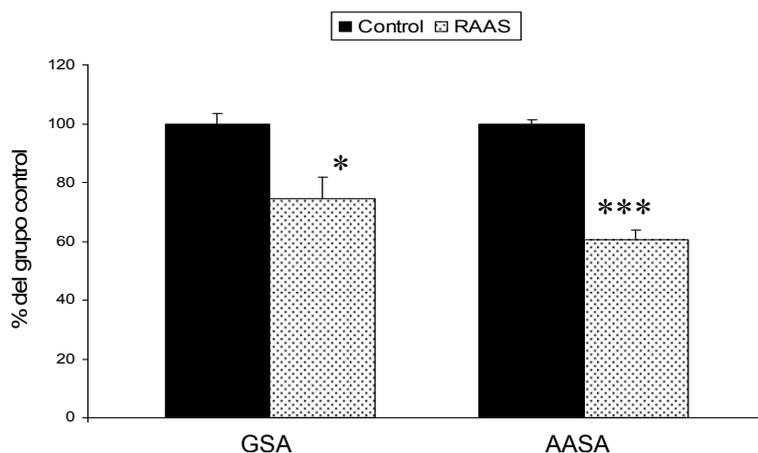
Los niveles de los factores de biogénesis mitocondrial PGC-1 $\alpha$  y NRF-2 no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales. Sin embargo, AIF descendió significativamente, en un 18% ( $p < 0,05$ ), y SIRT1 se incrementó de forma también significativa (un 26%;  $p < 0,05$ ) en el grupo RAAS en relación al control.



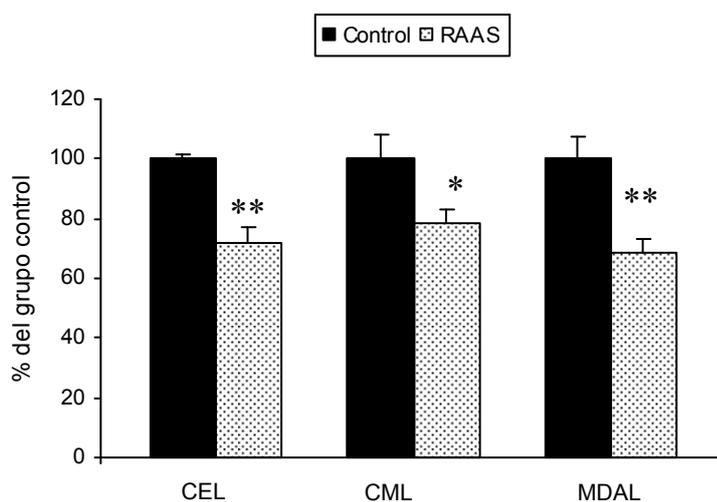
**Figura 36.** Cantidad de AIF, SIRT1, PGC-1 $\alpha$  y NRF-2, cuantificadas por densitometría como unidades arbitrarias normalizadas para porina (AIF) o actina (SIRT1, PGC-1 $\alpha$  y NRF-2) en hígado de ratas controles y RAAS. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*( $p < 0,05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 5-7 muestras.

### 1.3.7. Daño oxidativo a proteínas

Los distintos marcadores específicos de oxidación, glicooxidación y lipooxidación proteica analizados se muestran en las Figuras 37 y 38. Todos ellos mostraron valores significativamente menores en el grupo RAAS que en el control. Los descensos abarcaron desde un 21% en CML hasta un 39% en AASA, con una media de descenso del 28% para los cinco marcadores proteicos considerados en conjunto.



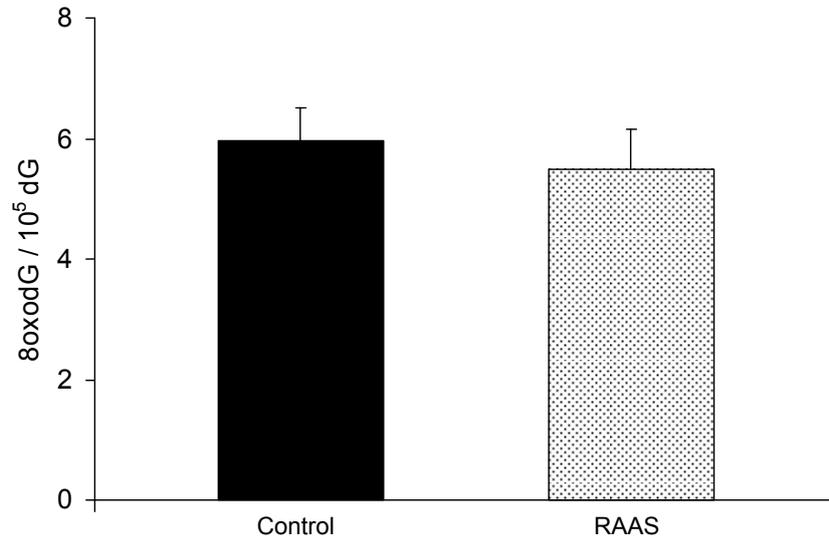
**Figura 37.** Efecto de la restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto la metionina sobre los niveles de los carbonilos proteicos GSA y AASA en proteínas de hígado de rata. Valores del grupo control:  $4460,28 \pm 166,02$  (GSA),  $149,77 \pm 2,13$  (AASA). Unidades =  $\mu\text{moles} / \text{mol lisina}$ . Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 7-8 animales diferentes.



**Figura 38.** Efecto la restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto la metionina sobre los niveles de los marcadores de estrés glicooxidativo y/o lipooxidativo en proteínas de hígado de rata. Valores del grupo control:  $385,37 \pm 4,92$  (CEL),  $1500,62 \pm 118,71$  (CML),  $330,80 \pm 25,31$  (MDAL). Unidades =  $\mu\text{moles} / \text{mol lisina}$ . Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 7-8 animales diferentes.

### **1.3.8. Daño oxidativo al ADN mitocondrial**

El daño oxidativo al ADN mitocondrial se estimó como el ratio 8-oxodG /  $10^5$  dG y, como se aprecia en la Figura 39, no se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) cuando se compararon los niveles de este parámetro entre los grupos experimentales.



**Figura 39.** Daño oxidativo (8-oxodG /  $10^5$  dG) al ADN mitocondrial en hígado de ratas controles y RAAS. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p > 0,05$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 animales diferentes.

### **1.3.9. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales**

La Tabla 23 refleja el efecto de la restricción al 40% de todos los aminoácidos de la dieta excepto la metionina sobre la composición completa de los ácidos grasos de los lípidos de las mitocondrias hepáticas.

Entre los diferentes ácidos grasos analizados, sólo se observaron cambios significativos para los ácidos grasos linoleico (18:2n-6), que aumentó en el grupo RAAS, y araquidónico (20:4n-6), que descendió en dicho grupo.

Esto resultó en descensos significativos en el DBI (Figura 40b) y en el PI (Figura 40c) en el grupo RAAS, mientras que no varió la cantidad total de ninguna de las fracciones lipídicas analizadas, SFA, UFA, MUFA o PUFA, estos últimos analizados tanto en conjunto como desglosados en PUFA de la serie 3 y de la serie 6 (Figura 41).

## Resultados

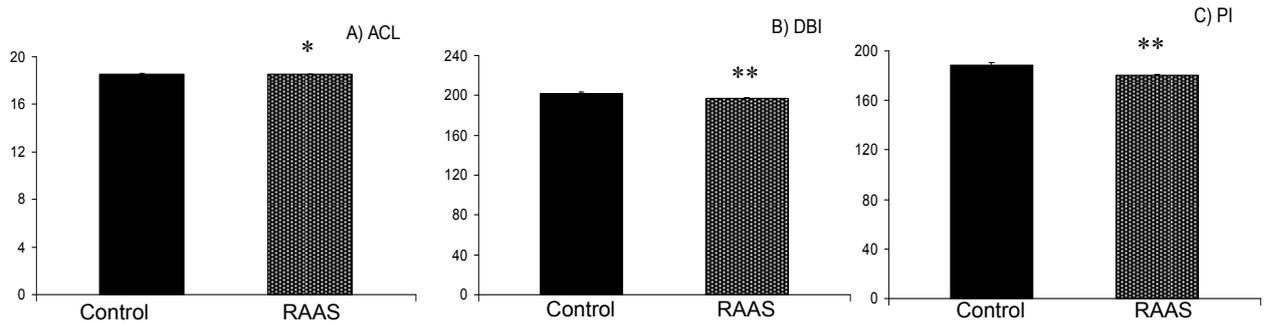
Por su parte, la longitud media de cadena de los ácidos grasos (ACL) descendió significativamente ( $p < 0,05$ ) en los animales RAAS, probablemente debido a la sustitución parcial de ácido araquidónico por linoleico en dicho grupo (Figura 40a).

**Tabla 23.** Composición (% mol) de los ácidos grasos de las mitocondrias hepáticas en ratas controles y RAAS.

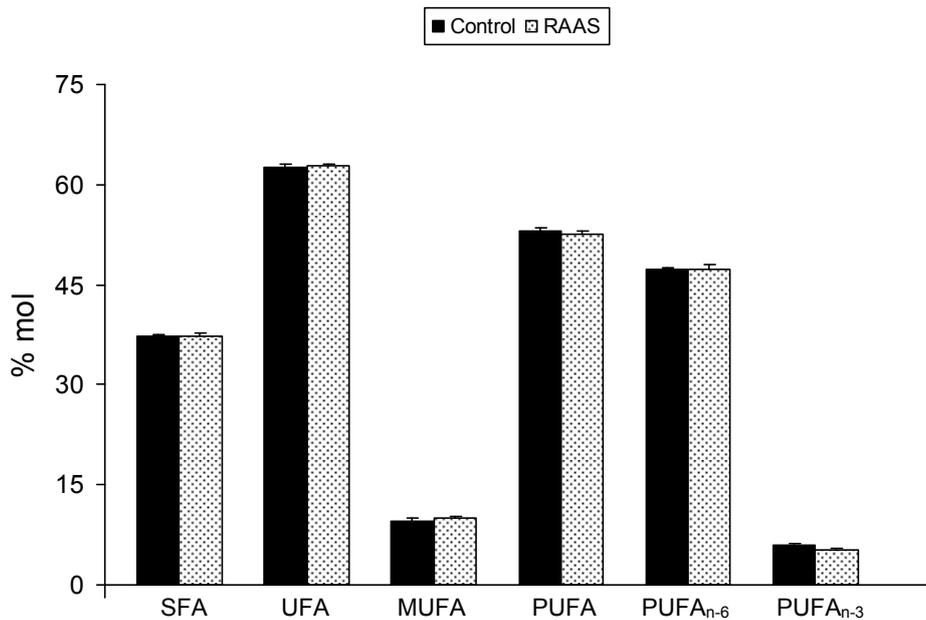
	<b>Control</b>	<b>RAAS</b>
<b>14:0</b>	0,27 ± 0,04	0,31 ± 0,05
<b>16:0</b>	16,63 ± 0,27	16,84 ± 0,39
<b>16:1n-7</b>	1,29 ± 0,13	1,34 ± 0,12
<b>18:0</b>	18,68 ± 0,48	18,19 ± 0,24
<b>18:1n-9</b>	7,97 ± 0,30	8,50 ± 0,19
<b>18:2n-6</b>	15,11 ± 0,13	16,38 ± 0,41*
<b>18:4n-6</b>	0,89 ± 0,07	1,04 ± 0,08
<b>20:0</b>	0,20 ± 0,05	0,15 ± 0,02
<b>20:1n-9</b>	0,26 ± 0,03	0,22 ± 0,01
<b>20:2n-6</b>	0,61 ± 0,07	0,59 ± 0,02
<b>20:3n-6</b>	0,26 ± 0,04	0,35 ± 0,02
<b>20:4n-6</b>	30,31 ± 0,22	28,98 ± 0,31**
<b>22:0</b>	1,08 ± 0,05	1,28 ± 0,08
<b>24:0</b>	0,42 ± 0,07	0,49 ± 0,03
<b>22:6n-3</b>	5,93 ± 0,26	5,27 ± 0,18

Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos control y RAAS; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ). Los resultados representan la media ± SEM de 7-8 animales.

## Resultados



**Figura 40.** Efecto de la restricción de todos los aminoácidos de la dieta excepto la metionina al 40% sobre: a) la longitud media de cadena (ACL), b) el índice de dobles enlaces (DBI), y c) el índice de peroxidizabilidad (PI) de los lípidos en mitocondrias de hígado de rata. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos control y RAAS; \*\*( $p < 0,01$ ). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 7-8 animales.



**Figura 41.** Efecto de la restricción de aminoácidos al 40% excepto la metionina sobre las diferentes fracciones lipídicas, en mitocondrias de hígado de rata. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos control y RAAS para ninguna de las fracciones estudiadas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM del % de moles de cada fracción de 7-8 animales diferentes.

### 1.3.10. Estudio de los metabolitos de la metionina

El tratamiento al 40% de restricción de todos los aminoácidos de la dieta excepto la metionina no alteró significativamente ( $p > 0,05$ ) los niveles de los metabolitos del ciclo de la metionina S-adenosilmetionina (SAM) y S-adenosilhomocisteína (SAH), ni tampoco el ratio SAM / SAH, indicativo del potencial de metilación (Tabla 24).

**Tabla 24.** Efecto de la restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto la metionina sobre los metabolitos de la metionina en hígado de rata.

	Control	RAAS
<b>S-Adenosilmetionina (SAM)</b>		
<i>nmol / mg proteína</i>	2,34 ± 0,16	2,38 ± 0,26
<i>nmol / g tejido</i>	201,80 ± 10,60	184,81 ± 9,82
<b>S-Adenosilhomocisteína (SAH)</b>		
<i>nmol / mg proteína</i>	0,45 ± 0,07	0,43 ± 0,05
<i>nmol / g tejido</i>	39,82 ± 4,56	34,43 ± 4,04
<b>Ratio SAM / SAH*</b>	5,63 ± 0,47	5,65 ± 0,43

No se encontraron diferencias entre los distintos grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 7-8 muestras.

\*Ratio SAM / SAH: Potencial de metilación.

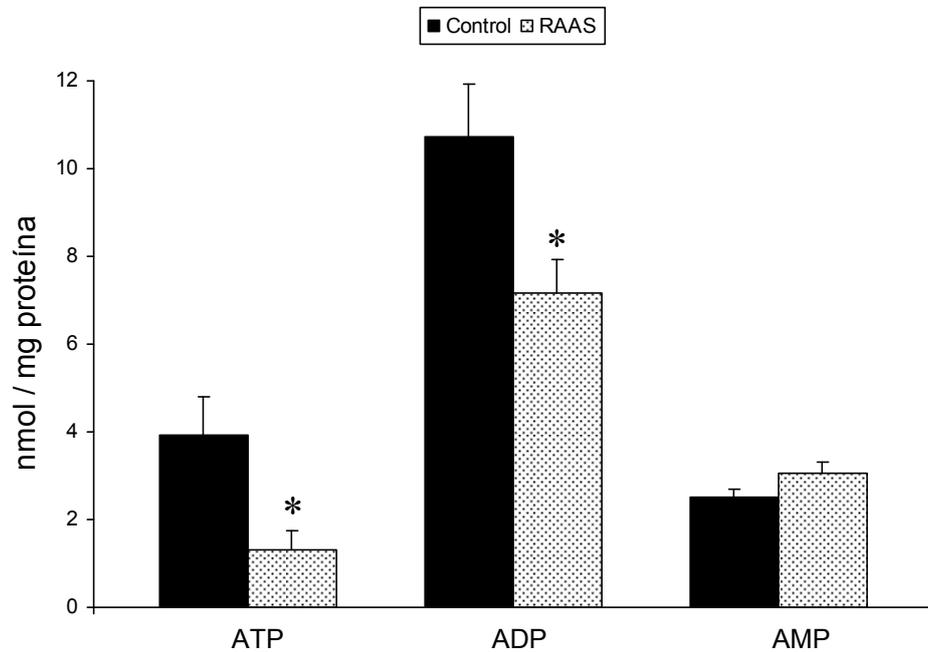
### 1.3.11. Contenido total de nucleótidos de adenina

Para comprobar los efectos bioenergéticos de la restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto la metionina a nivel tisular se analizaron los nucleótidos de adenina.

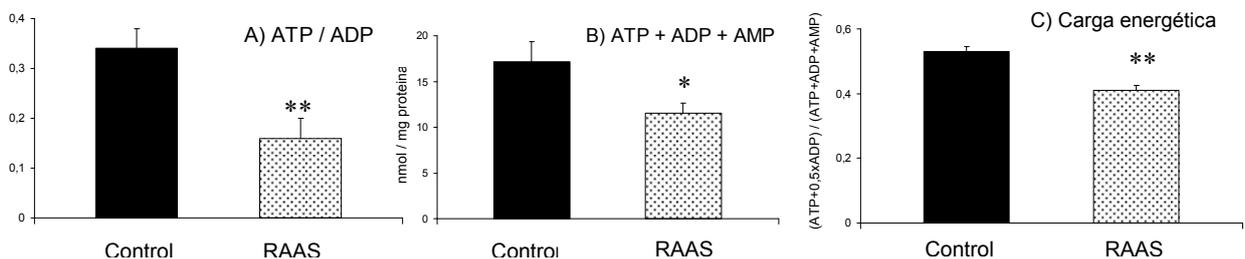
Como se observa en la Figura 42, los niveles de los nucleótidos ATP y ADP descendieron significativamente, un 67% y 33%, respectivamente, en el grupo RAAS en relación al control, mientras que los niveles de AMP fueron similares en ambos grupos experimentales ( $p > 0,05$ ). El descenso en la suma total de los nucleótidos de adenina (Figura 43b) también alcanzó la significación estadística ( $p < 0,05$ ), a pesar de la ausencia de cambios en los niveles de AMP.

## Resultados

Además, la restricción de aminoácidos también descendió significativamente el cociente ATP / ADP (un 53%; Figura 43a) y la carga energética total (23% de descenso; Figura 43c).



**Figura 42.** Efecto de la restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto de la metionina sobre el contenido en ATP, ADP y AMP en hígado de rata. Unidades = nmoles / mg proteína. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*(p < 0,05). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 7-8 muestras.



**Figura 43.** Efecto de la restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto de la metionina sobre el ratio ATP / ADP, la carga total de nucleótidos de adenina y la carga energética (ATP + 0,5\*ADP) / (ATP + ADP + AMP) en hígado de rata. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*(p < 0,05), \*\*(p < 0,01). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 7-8 muestras.

## 2. Estudio del modelo de restricción de dieta EOD sobre el estrés oxidativo mitocondrial en hígado de ratón C57BL/6.

### 2.1. Ingesta media y peso de animales y órganos

Los ratones C57BL/6 integrantes de los grupos control y EOD (alimentación en días alternos) no mostraron diferencias significativas en el peso corporal al inicio del experimento ( $p > 0,05$ ); aunque ambos grupos fueron ganando peso durante las 7 semanas de experimentación. Dicha ganancia fue menor en el grupo EOD que en el control, alcanzando la significación estadística ( $p < 0,05$ ) a partir de la cuarta semana de experimentación y manteniéndose hasta el final del tratamiento (Figura 44).

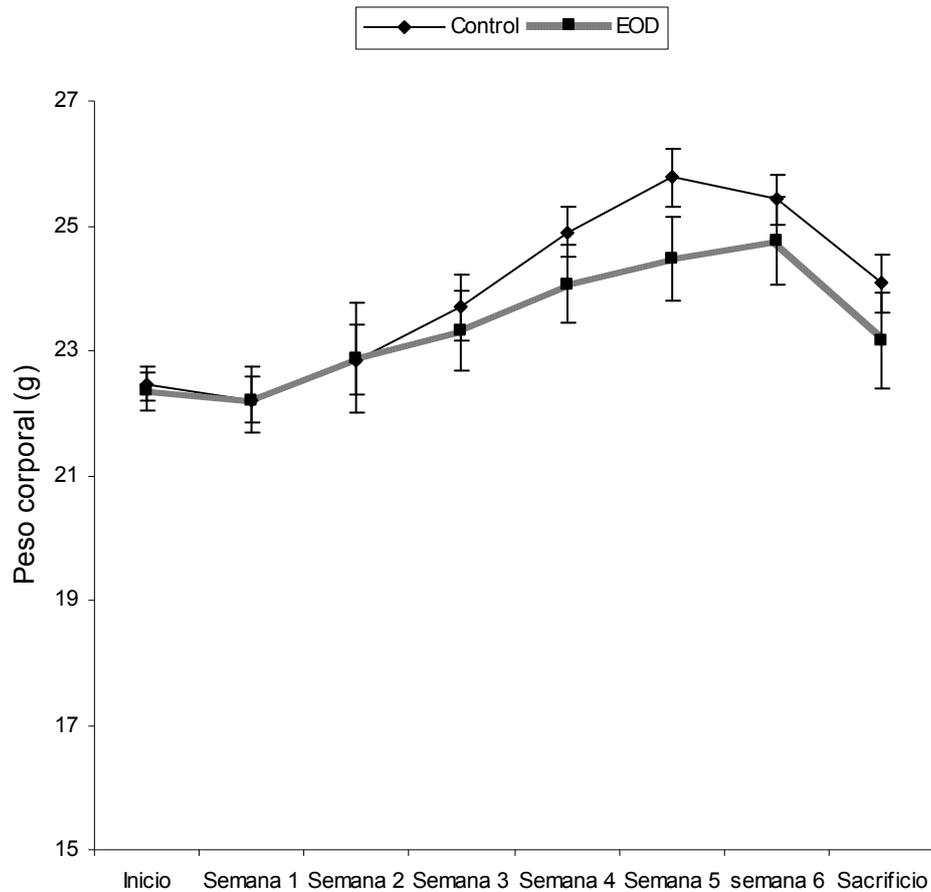
Al final del tratamiento experimental se analizó el peso de distintos órganos (Tabla 25); entre estos, el bazo y el riñón presentaron valores significativamente menores en el grupo EOD que en el control ( $p < 0,001$  y  $p < 0,05$ , respectivamente), no encontrándose diferencias en el peso del resto de los órganos ( $p > 0,05$ ).

La ingesta media a lo largo del periodo experimental fue un 20% menor en los ratones EOD que en los controles ( $p < 0,001$ ; Tabla 25).

**Tabla 25.** Peso de los órganos (g) e ingesta media de ratones C57BL/6 controles y EOD.

	Control	EOD
<b>Peso órganos</b>		
<b>Hígado</b>	1,01 ± 0,05	0,99 ± 0,04
<b>Corazón</b>	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
<b>Bazo</b>	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00***
<b>Riñón</b>	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,01*
<b>Cerebro</b>	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,01
<b>Ingesta</b>	9,08 ± 0,33	7,27 ± 0,23***

Los asteriscos representan diferencias significativas entre los grupos control y EOD; \*( $p < 0,05$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados representan la media ± SEM de 14 animales diferentes.



**Figura 44.** Evolución del peso corporal (g) durante el periodo experimental de ratones C57BL/6 controles y EOD. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 14 animales diferentes.

## **2.2. Consumo de oxígeno mitocondrial**

Las tasas de consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado de ratón, en presencia de sustratos de unión al complejo I (glutamato-malato) y del complejo II (succinato) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial se muestran en la Tabla 26.

El consumo de oxígeno en estado 3 (fosforilante) fue varias veces mayor que en estado 4 (no fosforilante) con glutamato-malato y con succinato (y rotenona) como sustratos, mostrando la buena calidad y acoplamiento de las preparaciones mitocondriales empleadas. No se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) cuando se comparó la intensidad de consumo de oxígeno entre los grupos experimentales con ningún sustrato ni en el estado 4 ni en el 3.

## Resultados

Tampoco se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el RCR entre los grupos experimentales, presentando dicho parámetro valores más elevados con glutamato-malato que con succinato.

**Tabla 26.** Efecto del modelo de restricción de dieta EOD sobre la tasa de consumo de oxígeno y el RCR en mitocondrias de hígado de ratón C57BL/6 con glutamato-malato y succinato (con rotenona) como sustratos en ausencia (estado 4) y en presencia (estado 3) de ADP.

Sustrato	Control	EOD
<b>Glutamato-malato</b>		
Estado 4	7,7 ± 1,4	11 ± 2,4
Estado 3	39 ± 7	55,9 ± 12,1
RCR	5,2 ± 0,4	5,1 ± 0,5
<b>Succinato + rotenona</b>		
Estado 4	32,7 ± 8,1	34,2 ± 4,8
Estado 3	70,9 ± 9,4	84,3 ± 18,8
RCR	2,5 ± 0,3	2,4 ± 0,2

Los resultados se expresan en nanomoles de  $O_2$  / min × mg proteína mitocondrial. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los valores representan la media ± SEM de 7 animales diferentes.

### **2.3. Producción mitocondrial de radicales libres**

Tras 7 semanas de restricción de dieta por el método de alimentación en días alternos EOD, la tasa de producción basal de radicales libres en mitocondrias de hígado de ratón descendió significativamente (un 44%;  $p < 0,05$ ) con glutamato-malato (sustrato de unión al complejo I) en relación al grupo control alimentado *ad libitum* (Figura 45a).

Sin embargo, cuando las mismas mitocondrias se suplementaron con succinato (sustrato de unión al complejo II) y rotenona, aunque los niveles basales de producción de ROS fueron menores en el grupo EOD que en el grupo control, este descenso no alcanzó la significación estadística ( $p > 0,05$ ; Figura 45b).

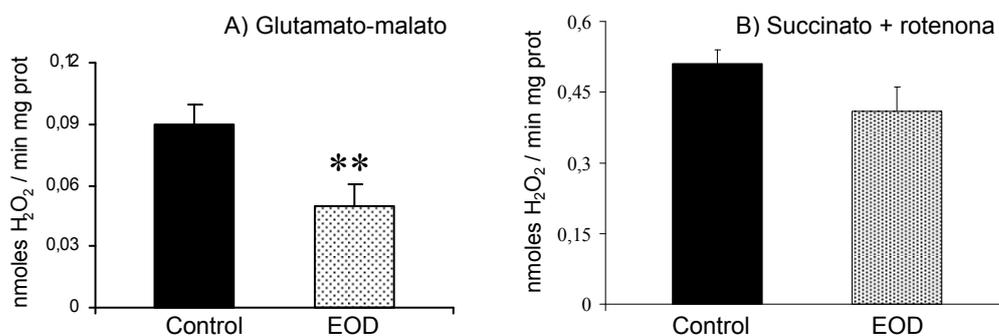
## Resultados

En conjunto se pudo observar, pues, un descenso significativo en la producción basal de radicales libres en el complejo I pero no en el III.

Las tasas máximas de producción de ROS se ensayaron con los complejos respiratorios completamente reducidos, usando para ello combinaciones apropiadas de sustratos e inhibidores de la cadena respiratoria (rotenona, antimicina A o TTFA).

La reducción completa del complejo I se llevó a cabo añadiendo rotenona a las mitocondrias suplementadas con piruvato-malato o glutamato-malato. Aunque en ambos casos se observaron menores niveles de ROS en el grupo EOD que en el control, las diferencias no alcanzaron la significación estadística ( $p > 0,05$ ; Tabla 27).

Los inhibidores TTFA y antimicina A se añadieron a mitocondrias suplementadas con succinato (y rotenona) para reducir completamente los complejos II y III, respectivamente. La adición de TTFA no incrementó la producción basal de ROS que se obtuvo con succinato y rotenona, sugiriendo que el complejo II no es un importante generador de ROS, mientras que cuando se añadió antimicina A si que se observó una diferencia entre la producción máxima y la basal del complejo III ( $p < 0,001$ ). En ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p > 0,05$ ; Figura 46).



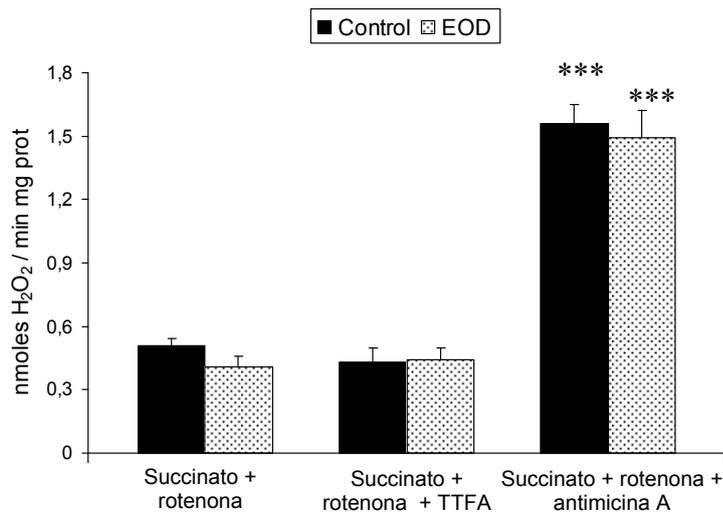
**Figura 45.** Tasa de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de hígado de ratones C57BL/6 control y EOD suplementadas con a) glutamato-malato y b) succinato y rotenona, como sustratos. Los superíndices muestran diferencias significativas; \*\*( $p < 0,01$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 7 animales diferentes.

## Resultados

**Tabla 27.** Tasas máximas de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) en el complejo I mitocondrial en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria en mitocondrias de hígado de ratones C57BL/6 controles y EOD.

Sustrato	Control	EOD
<b>Piruvato-malato + rotenona</b>	0.23 ± 0.02	0.15 ± 0.04
<b>Glutamato-malato + rotenona</b>	0.35 ± 0.05	0.27 ± 0.02

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 7 animales diferentes.

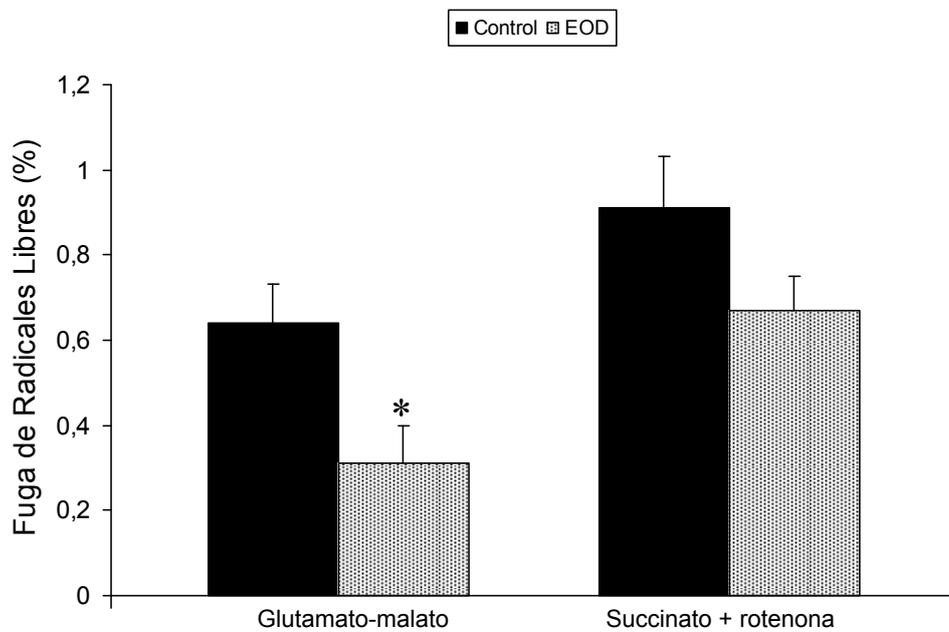


**Figura 46.** Efecto de los inhibidores TTFA y antimicina A sobre la producción de radicales libres (nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min × mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de hígado de ratones C57BL/6 controles y EOD suplementadas con succinato como sustrato. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en las mismas condiciones experimentales. Los asteriscos indican diferencias significativas entre pruebas en ausencia y presencia de antimicina A; \*\*\*( $p < 0,001$ ).

#### 2.4. Fuga de radicales libres

La fuga de radicales libres en mitocondrias hepáticas de ratones C57BL/6 descendió significativamente en el grupo EOD con glutamato-malato (52% de descenso;  $p < 0,05$ ). Con succinato (y rotenona), sin embargo, la diferencia entre los grupos control y EOD no alcanzó la significación estadística ( $p > 0,05$ ).

Así pues, en conjunto se observó un descenso en el la fuga de radicales libres en el complejo I pero no en el complejo III (Figura 47).



**Figura 47.** Fuga de radicales libres en mitocondrias de hígado de ratones C57BL/6 controles y EOD en presencia de glutamato-malato y succinato (+ rotenona) como sustratos. Los asteriscos indican diferencias significativas;  $*(p < 0,05)$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 7 animales diferentes.

## **2.5. Cantidad de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

La cantidad de los complejos proteicos I, II, III y IV de la cadena respiratoria se muestra en la Tabla 28.

En el grupo EOD se encontraron niveles significativamente menores para todos los parámetros estudiados en comparación con el grupo control. El mayor descenso (61,9%) se observó para el complejo II, y el menor para el complejo IV (33,7%).

El descenso en el complejo I se observó tanto con anticuerpos frente a la subunidad de 30KDa (48,7% de descenso,  $p < 0,05$ ) como frente a la de 39 KDa (48,3% de disminución,  $p < 0,01$ ).

En el caso del otro complejo con capacidad para generar ROS, el complejo III, el descenso también se observó con anticuerpos frente a dos subunidades: la de 29KDa (37,6%,  $p < 0,05$ ) y la de 48KDa (52%,  $p < 0,001$ ).

**Tabla 28.** Complejos respiratorios mitocondriales en hígado de ratones C57BL/6 controles y EOD.

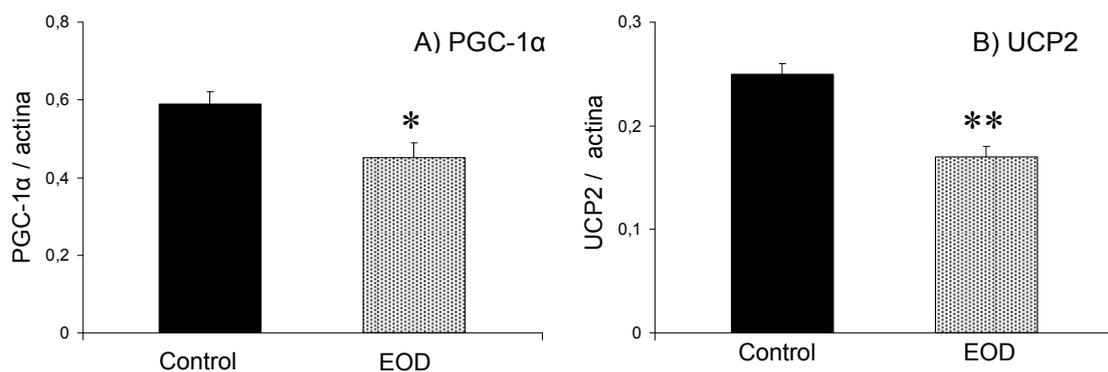
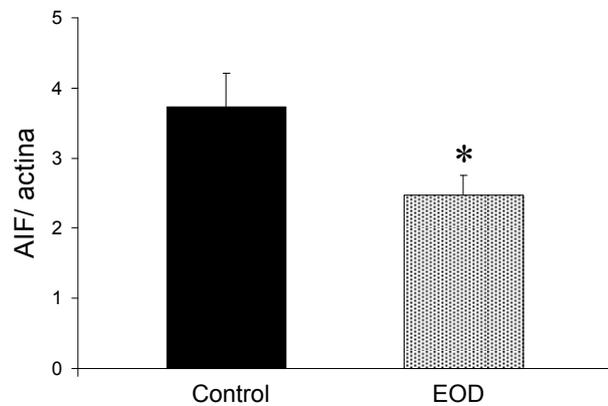
	<b>Control</b>	<b>EOD</b>
<b>Complejo I- sub 30KDa</b>	2,79 ± 0,45	1,43 ± 0,20*
<b>Complejo I- sub 39KDa</b>	3,95 ± 0,49	2,04 ± 0,28**
<b>Complejo II- sub 70KDa</b>	7,05 ± 0,97	2,68 ± 0,44***
<b>Complejo III- sub 29KDa</b>	1,73 ± 0,19	1,08 ± 0,18*
<b>Complejo III-sub 48KDa</b>	5,60 ± 0,66	2,01 ± 0,36***
<b>Complejo IV- sub 57KDa</b>	3,94 ± 0,53	1,89 ± 0,36**

Los valores representan el cociente de unidades del complejo / unidades de actina. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 7 animales diferentes.

## 2.6. Cantidad de AIF, PGC-1 $\alpha$ y UCP2

La abundancia de AIF estimada como el cociente entre los moles de AIF y los de actina, descendió significativamente (un 34% de descenso,  $p < 0,05$ ) en los ratones EOD en comparación con los controles alimentados *ad libitum* (Figura 48). Lo mismo se observó para PGC-1 $\alpha$ , cuyos niveles descendieron un 24% en el grupo EOD ( $p < 0,05$ ; Figura 49a). La cantidad de la proteína desacoplante UCP2 también fue menor (32%,  $p < 0,01$ ) en el grupo restringido que en el control (Figura 49b).

**Figura 48.** Cantidad de AIF (mol de AIF / mol actina) en hígado de ratones C57BL/6 controles y EOD. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos control y EOD;  $*(p < 0,05)$ . Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 7 animales diferentes.



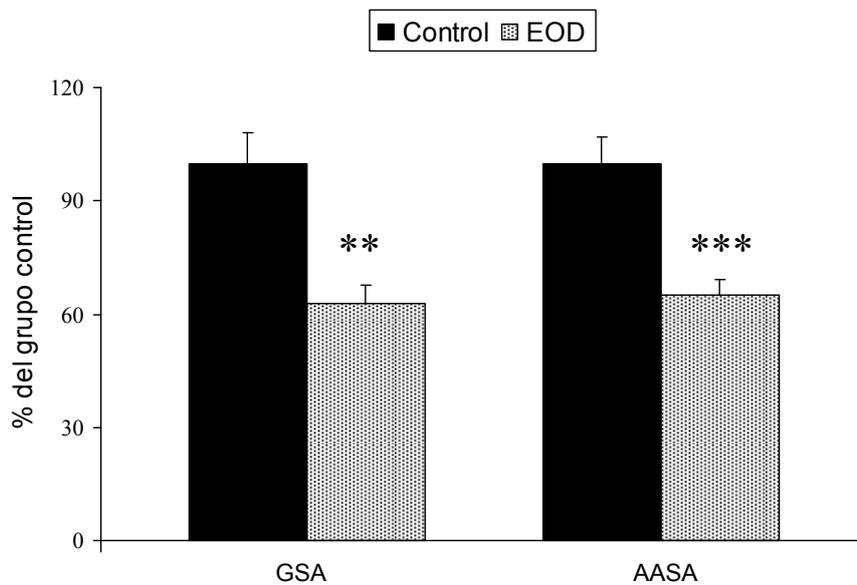
**Figura 49.** Cantidad de: a) PGC-1 $\alpha$  (mol de PGC-1 $\alpha$  / mol actina) y b) UCP2 (mol de UCP2 / mol actina) en hígado de ratones C57BL/6 controles y EOD. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control;  $*(p < 0,05)$ ,  $** (p < 0,01)$ . Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 7 animales diferentes.

## 2.7. Daño oxidativo a proteínas

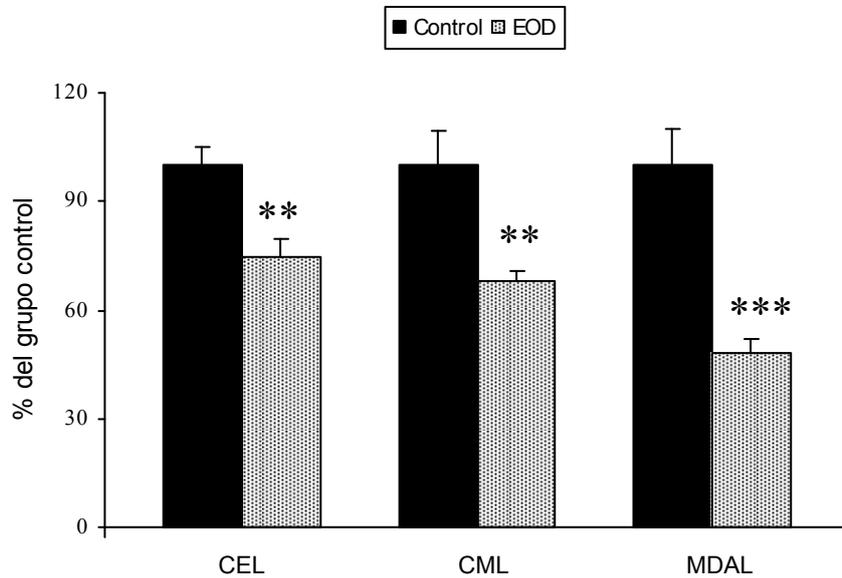
Los distintos marcadores específicos de oxidación proteica, glicooxidación y lipooxidación analizados en hígado de ratones controles y EOD se recogen en las Figuras 50 y 51.

Los niveles de los carbonilos proteicos GSA y AASA descendieron significativamente en el grupo EOD con respecto al control ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente; Figura 50).

Por su parte, el descenso en los niveles de los aductos CML y MDAL también resultó ser significativo ( $p < 0,01$  para ambos), y lo mismo ocurrió con el marcador de glicooxidación CEL ( $p < 0,001$ ; Figura 51).



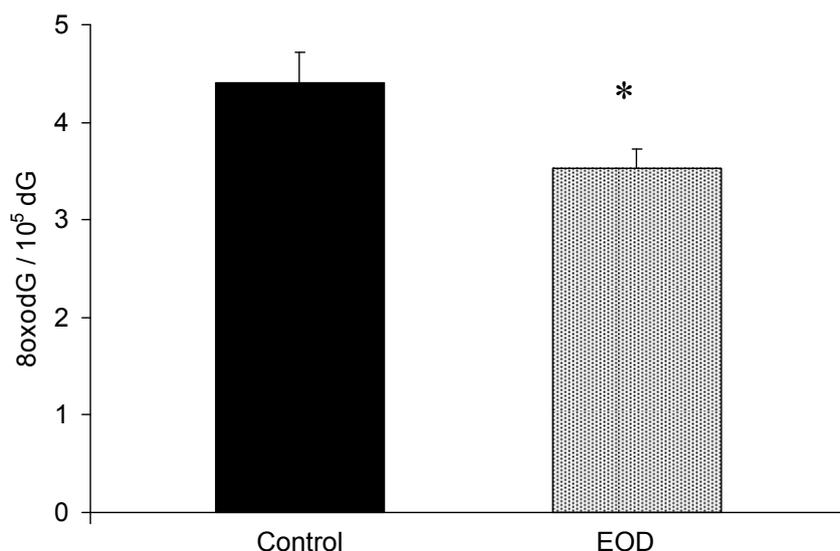
**Figura 50.** Efecto del modelo de RD EOD sobre los niveles de los carbonilos proteicos GSA y AASA en proteínas de hígado de ratón C57BL/6. Valores del grupo control:  $3079,54 \pm 246,38$  (GSA),  $207,83 \pm 14,36$  (AASA). Unidades =  $\mu\text{moles} / \text{mol lisina}$ . Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 7 animales diferentes.



**Figura 51.** Efecto del modelo de RD EOD sobre los niveles de los marcadores de estrés glicooxidativo y/o lipooxidativo en proteínas de hígado de ratón C57BL/6. Valores del grupo control:  $587,73 \pm 31,62$  (CEL),  $1532,2 \pm 146,83$  (CML),  $963,45 \pm 95,56$  (MDAL). Unidades =  $\mu\text{moles} / \text{mol}$  lisina. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales; \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 7 animales diferentes.

### **2.8. Daño oxidativo al ADN mitocondrial**

El daño oxidativo al ADN mitocondrial se estimó como el ratio 8-oxodG /  $10^5$  dG. Como se observa en la Figura 52, los niveles de este marcador descendieron significativamente ( $p < 0,05$ ) en el grupo EOD en comparación con el grupo control.



**Figura 52.** Daño oxidativo al ADN mitocondrial (8-oxodG /  $10^5$  dG) en hígado de ratones C57BL/6 controles y EOD. Los superíndices muestran diferencias significativas con el grupo control; \*( $p < 0,05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 7 animales diferentes.

### **2.9. Análisis de la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales**

La composición de ácidos grasos de los lípidos hepáticos y los índices derivados de los mismos se muestran en la Tabla 29 y en la Figura 53.

Como se puede observar en la Tabla 29, el modelo de alimentación EOD alteró la composición de los ácidos grasos en hígado de ratón C57BL/6. Los niveles de los ácidos esteárico (18:0), linoleico (18:2n-6), dihomo- $\gamma$ -linolénico (20:3n-6) y araquidónico (20:4n-6) descendieron significativamente en dicho grupo, mientras que los niveles de los ácidos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1n-7), oleico (18:1n-9) linolenico (18:3n-3), eicosapentanoico (20:5n-3) y docosapentanoico (22:5n-3) se incrementaron.

## Resultados

Los cambios cuantitativos más notables fueron el incremento en los niveles del ácido oleico (18:1n-9) y el descenso en los de los ácidos linoleico (18:2n-6) y araquidónico (20:4n-6) ( $p < 0,001$  en todos ellos). Dichos cambios se vieron reflejados en incrementos significativos en la fracción de los MUFA así como en descensos en los PUFA generales y, dentro de ellos, en los de la serie 6 (Figura 53).

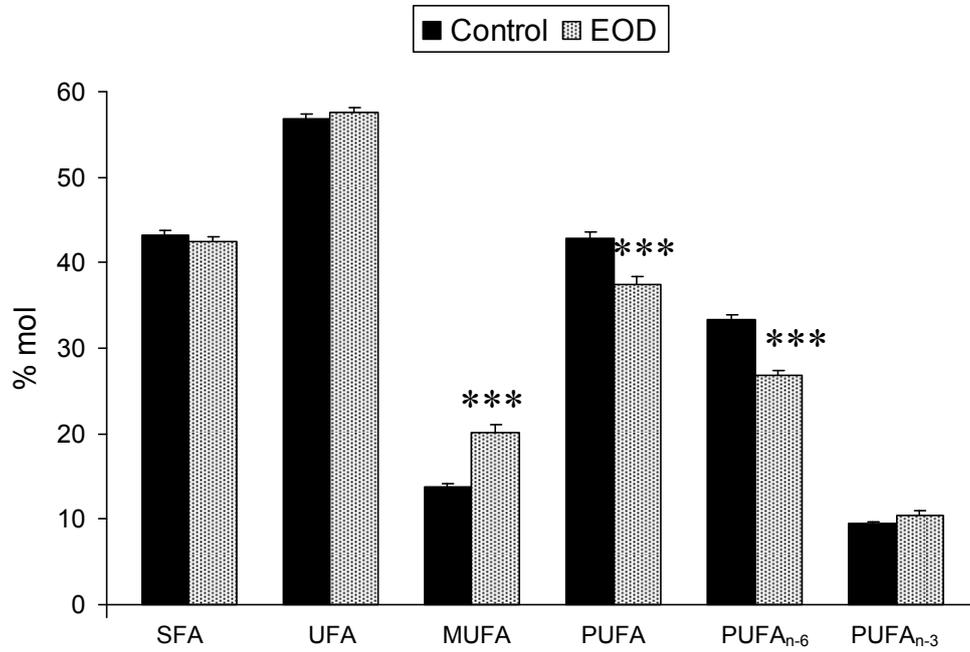
Desde el punto de vista del contenido en dobles enlaces, los dos tipos de cambios observados en las distintas fracciones lipídicas (el incremento en los MUFA y el descenso en los PUFA n-6) se compensaron, resultando en una ausencia de cambios significativos en el DBI y en el PI entre los ratones controles y EOD. Además, la longitud de cadena de los ácidos grasos de los lípidos hepáticos (ACL) tampoco se vio alterada (Tabla 29).

**Tabla 29.** Composición (% mol) de los ácidos grasos de total de lípidos en hígado de ratones C57BL/6 controles y EOD e índices derivados de los mismos.

	Control	EOD
<b>14:0</b>	0,33 ± 0,02	0,36 ± 0,03
<b>16:0</b>	24,75 ± 0,19	25,95 ± 0,30**
<b>16:1n-7</b>	1,30 ± 0,06	1,87 ± 0,10***
<b>18:0</b>	10,55 ± 0,60	8,59 ± 0,27*
<b>18:1n-9</b>	12,54 ± 0,34	18,21 ± 1,03***
<b>18:2n-6</b>	21,24 ± 0,40	18,03 ± 0,42***
<b>18:3n-3</b>	0,25 ± 0,02	0,58 ± 0,05***
<b>20:0</b>	5,75 ± 0,19	5,74 ± 0,32
<b>20:3n-6</b>	1,23 ± 0,01	0,81 ± 0,08***
<b>20:4n-6</b>	10,91 ± 0,18	8,03 ± 0,33***
<b>20:5n-3</b>	0,57 ± 0,03	0,83 ± 0,05**
<b>22:0</b>	1,82 ± 0,13	1,84 ± 0,10
<b>22:5n-3</b>	0,35 ± 0,01	0,56 ± 0,02***
<b>22:6n-3</b>	8,34 ± 0,15	8,54 ± 0,53
<b>ACL</b>	18,25 ± 0,1	18,17 ± 0,1
<b>DBI</b>	159,21 ± 2,12	150,72 ± 3,7
<b>PI</b>	140,6 ± 2,23	130,19 ± 5,3

Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los valores representan la media ± SEM de 7 animales diferentes.

## Resultados



**Figura 53.** Efecto del modelo de RD EOD sobre las distintas fracciones lipídicas en hígado de ratón C57BL/6. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control; \*\*\*( $p < 0,001$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM del % de moles de cada fracción de 7 animales diferentes.

# Discusión

La restricción de dieta (RD) es la manipulación experimental no genética mejor conocida en la comunidad científica capaz de alargar la longevidad máxima de los animales incluyendo a los mamíferos, disminuir su velocidad de envejecimiento y retrasar la aparición de las enfermedades degenerativas (Barger et al., 2003). La RD disminuye la intensidad del envejecimiento en un 30-50% en la inmensa mayoría de las especies estudiadas hasta la fecha: rotíferos, nematodos como *Caenorhabditis elegans*, arácnidos, insectos como *Drosophila melanogaster*, peces, ratas y ratones (Sohal and Weindruch, 1996) y los estudios en marcha en primates, y los pocos disponibles en humanos, apuntan en la misma dirección (Roth et al., 2004).

El objetivo general de estos estudios no es la aplicación de la RD a la población en general, debido a la gran dificultad de su implementación y los riesgos asociados. Se trata más bien de estudiar el fenómeno de la RD en animales en condiciones controladas para identificar los componentes dietéticos responsables y los mecanismos moleculares mediante los cuales retrasa el envejecimiento de los mamíferos. Una vez bien conocidos, se podrán manipular de forma relativamente sencilla a través de la dieta. Esto posibilitará retrasar el envejecimiento humano sin necesidad de reducir la ingesta de calorías, evitando así una intervención tan drástica y difícilmente practicable en humanos como la RD.

## **1. ESTUDIO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA Y AMINOÁCIDOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL EN LA RATA WISTAR**

Numerosos estudios previos han demostrado que la RD es capaz de disminuir la producción mitocondrial de radicales libres y el daño oxidativo a macromoléculas (Sanz et al., 2006d) y que estos cambios pueden ser reproducidos por la restricción de proteínas independientemente de la restricción de calorías (Ayala et al., 2007; Gomez et al., 2007; Sanz et al., 2004) pero no así por la restricción de lípidos (Sanz et al., 2006b) ni carbohidratos (Sanz et al., 2006c). En un estudio de longevidad en ratas se encontró que la RD prevenía casi totalmente la nefropatía, y que la restricción de calorías sin restringir el contenido proteico también tenía este mismo efecto, pero en menor grado, indicando así que la restricción de proteínas podría ejercer un pequeño efecto en la protección frente a las enfermedades renales (Masoro et al., 1989). En ese mismo estudio no se encontraron diferencias significativas en la longevidad máxima de ratas sometidas a un régimen clásico de RD frente a aquellas bajo RD sin restricción de proteínas, lo que llevó a los autores a concluir que, en su experimento, la

## Discusión

restricción de proteínas no afectaba a la longevidad. Sin embargo, 16 de los 18 estudios de restricción de proteínas realizados a lo largo de toda la vida de los animales (ratas o ratones) encontraron un incremento en la longevidad máxima (Pamplona and Barja, 2006). Tomados en conjunto los 16 estudios positivos, el incremento en la longevidad máxima fue, como media, del 19,6%, lo que representa un efecto de extensión de la longevidad de aproximadamente el 50% del efecto de la RD (que incrementa la longevidad máxima en un 30-50%). Además, los pocos estudios disponibles que se conocen hasta la fecha no apoyan la idea de que la restricción de carbohidratos (Khorakova et al., 1990) o la de lípidos (Iwasaki et al., 1988; Shimokawa et al., 1996) afecten a la longevidad de los roedores de laboratorio. Por tanto, cerca del 50% del efecto de la RD sobre la longevidad de los roedores parece ser debido a la restricción de proteínas en la dieta, mientras que el 50% restante se debería a otros componentes desconocidos de la dieta, o a las calorías en sí mismas.

Tratando de encontrar el componente proteico responsable de estos efectos, nos centramos en el aminoácido metionina, ya que varias fuentes relacionan a la metionina con el envejecimiento. Es bien conocido que la restricción de metionina sin restricción de calorías incrementa la longevidad máxima en ratas (Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994; Zimmerman et al., 2003) y ratones (Miller et al., 2005; Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994), con una intensidad en general consistente con la observada durante la restricción proteica (aunque el efecto de la restricción de proteínas sobre la longevidad es menor que el de la RD). Además, recientes estudios han demostrado que tanto la restricción de proteínas (Min and Tartar, 2006) como la de metionina (Troen et al., 2007) también incrementan la longevidad en *Drosophila melanogaster*. De acuerdo con los efectos que la restricción de metionina ejerce sobre la longevidad máxima, éste régimen dietético también retrasa muchos cambios relacionados con el envejecimiento y enfermedades degenerativas en roedores, y algunos de los cambios que produce son también típicos de la RD clásica. Así, la restricción de metionina en ratas disminuye en un 70% el contenido en grasa visceral, evita totalmente (al igual que la restricción de calorías), los aumentos de colesterol y triglicéridos con la edad y la resistencia a la insulina, y baja la concentración de insulina e IGF-1 en plasma. En ratones, la restricción de metionina retrasa el desarrollo de cataratas y los cambios en la función inmune asociados al envejecimiento, y también disminuye los niveles séricos de glucosa, insulina, IGF-1 y T4 (Miller et al., 2005).

Por otro lado, el contenido en metionina de las proteínas está inversamente relacionado con la longevidad máxima en mamíferos (Ruiz et al., 2005), lo cual tiene sentido ya que la metionina es uno de los aminoácidos de las proteínas más susceptibles a la oxidación por radicales libres (Moskovitz et al., 2001).

Frente a los efectos beneficiosos que se observaron en distintos parámetros relacionados con el estrés oxidativo mitocondrial durante 7 semanas de restricción de

## Discusión

metionina, y que se discutirán ampliamente en esta sección, estos cambios no se relacionaron con un retraso en el crecimiento de los animales cuando fueron sometidos a una restricción de metionina del 40%, pues no se produjeron diferencias en el peso de las ratas controles y las restringidas en metionina al 40% mientras que, de acuerdo con estudios previos (Orentreich et al., 1993), los animales restringidos en metionina un 80% si disminuyeron su peso corporal ya desde la segunda semana de tratamiento dietético.

Usando ese mismo protocolo dietético con el que se observó un incremento en la longevidad de los roedores, esto es, un 80% de restricción de metionina isocalórica y sustituyendo la metionina por el glutamato en la dieta, se encontró que la restricción de dicho aminoácido también disminuía la generación mitocondrial de radicales libres, principalmente en el complejo I (Sanz et al., 2006a), lo cual podría contribuir a explicar la relación entre la restricción de metionina, el estrés oxidativo y la extensión de la longevidad. Sin embargo, si la restricción de metionina es la única responsable de los descensos en la generación mitocondrial de radicales libres observada bajo un 40% de restricción de calorías y proteínas, sus efectos también deberían de observarse al nivel de restricción del 40% y sin incrementar el glutamato en la dieta. Esto se ha demostrado por vez primera en la presente tesis doctoral, pues la restricción de metionina tanto al 40 como al 80% sin alterar los niveles de ningún otro componente de la dieta disminuyó la producción mitocondrial de ROS en hígado de rata. El descenso fue algo mayor al 80% que al 40% de restricción cuando se emplearon sustratos de unión al complejo I, sugiriendo en este caso particular un efecto dosis-dependiente de la metionina.

Los efectos perjudiciales del envejecimiento se manifiestan mejor en tejidos postmitóticos, donde las células que se pierden o que son dañadas irreversiblemente no pueden ser reemplazadas por mitosis de las células intactas. Entre tales tejidos, el cerebro es el más importante, debido a su papel central en la homeostasis del organismo. Durante el envejecimiento normal, el cerebro sufre modificaciones tanto morfológicas como funcionales que afectan a los árboles dendríticos y a las sinapsis, a los neurotransmisores, la circulación y el metabolismo, así como acumulación de lipofucsina y alteraciones en los sistemas motor y sensorial, el sueño, la memoria y el aprendizaje (Srere, 1969). Las bases moleculares de estos cambios parecen implicar el estrés oxidativo (Mattson and Magnus, 2006). Si el proceso del envejecimiento es central para la mayoría de los procesos neuropatológicos, cualquier intervención capaz de retrasar dicho proceso también protegería frente a desórdenes neurodegenerativos. Por todo esto, estudiamos el efecto que la restricción de metionina al 40% podría ejercer sobre el estrés oxidativo mitocondrial en este órgano, así como en el riñón, uno de los órganos que más se afecta durante el envejecimiento de los roedores y se desconoce el efecto que esta manipulación dietética ejerce sobre dicho órgano detoxificador, y encontramos que, al igual que en hígado, la restricción de metionina descendió los niveles de generación

## Discusión

mitocondrial de ROS en el complejo I así como varios parámetros relacionados con el estrés oxidativo tanto en riñón como en cerebro.

Estos descensos en la producción mitocondrial de radicales libres observados en hígado, cerebro y riñón de ratas sometidas a un régimen de restricción de metionina sugieren que la metionina es el único aminoácido de la dieta responsable de los descensos en la producción mitocondrial de ROS durante la RD así como cuando se restringen únicamente las proteínas. Sin embargo, antes de alcanzar esta conclusión era necesario estudiar el posible efecto de otros aminoácidos de la dieta aparte de la metionina. Así pues, en la presente tesis, la restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto la metionina se ha llevado a cabo por vez primera en relación con el estrés oxidativo y la biogénesis mitocondrial mitocondrial y la apoptosis, bajo el contexto general del papel que la RD ejerce sobre la extensión de la longevidad. La ausencia de efecto de esta manipulación dietética sobre la producción mitocondrial de radicales libres descarta tal posibilidad y demuestra, por vez primera, que la menor ingesta de metionina es el único factor responsable del descenso en la tasa de generación de radicales libres de origen mitocondrial.

Respecto a los posibles mecanismos responsables del descenso en la producción mitocondrial de radicales libres durante la restricción de metionina, se han propuesto varias posibilidades (Sanz et al., 2006a). Entre ellas, en la presente tesis se han estudiado los posibles efectos de las variaciones en las cantidades de los complejos multiproteicos generadores de ROS. Está bien establecido que únicamente dos de los cuatro complejos respiratorios, el complejo I (Barja and Herrero, 1998; Genova et al., 2001) y el complejo III (Boveris et al., 1976) producen radicales libres en la mitocondria. Puesto que la restricción de metionina descendió la concentración de ambos complejos tanto en hígado como en cerebro de rata, estos descensos podrían ser responsables, al menos en parte, de los descensos observados en la producción mitocondrial de radicales libres. En lo que respecta al hígado, la magnitud cuantitativa de los descensos en los complejos respiratorios avala esta idea; el descenso en la producción de radicales libres fue mucho mayor con los sustratos de unión al complejo I piruvato-malato y glutamato-malato que con succinato y rotenona (que genera ROS solo en el complejo III). De acuerdo con esto, el descenso en la concentración del complejo I fue más grande que el observado en la cantidad de complejo III tanto al 40 como al 80% de restricción de metionina. Sin embargo, también debe haber otras causas diferentes de los descensos en los complejos respiratorios que sean responsables de la menor tasa de producción de radicales libres durante la restricción de metionina, como podrían ser la disminución en el grado de reducción electrónica de los generadores de ROS, o el incremento en su potencial redox, cambios que estarían de acuerdo con la menor fuga de radicales libres encontrada en todos los órganos estudiados (hígado, cerebro y riñón) en la presente tesis tras la restricción de metionina, así como en estudios previos de RD (Gredilla et al., 2001a,b). Por otro lado, el descenso en el contenido de complejo I también es consistente con el hecho de que la tasa máxima de producción de ROS con glutamato-malato y rotenona también

## Discusión

descendiera en hígado al 40 y 80% de restricción de metionina. Mientras que la producción basal de ROS (con sustrato únicamente) depende tanto de la concentración de los complejos respiratorios como de su grado de reducción electrónica, sólo el primero de los factores está implicado en el caso de la producción máxima de ROS. En cerebro de rata, y de acuerdo con lo descrito para hígado, encontramos que la restricción de metionina también afectó en el sentido apropiado los principales mecanismos oxidativos, jugando un papel clave en la determinación de la tasa de envejecimiento. En este estudio, la cantidad de los complejos I y III descendió, mientras que los niveles de los complejos II y IV no se alteraron, de forma similar a lo que se observó en estudios previos de RD (de Grey, 2001; Desai et al., 1996). Sin embargo, y al igual que en hígado, en el caso del cerebro el descenso en la cantidad de los complejos respiratorios no puede ser la única explicación del descenso que se observó en los niveles de generación de ROS pues, por una parte, solo se observó un descenso de radicales libres en el complejo I (con piruvato-malato), y no en el III (con succinato y rotenona), mientras que en lo que respecta a los complejos respiratorios, hubo un descenso en los niveles de ambos. Además, descendió la tasa basal de radicales libres que, como se acaba de mencionar, depende de la cantidad de complejos respiratorios y de su grado de reducción electrónica, mientras que la tasa máxima de producción de ROS, que solo depende de la concentración de complejos, no se alteró.

Otra posibilidad es que los cambios en la producción de radicales libres durante la restricción de metionina fueran debidos a posibles variaciones en los niveles de homocisteína. Es bien conocido que la suplementación de la metionina en la dieta daña muchos órganos vitales, como el sistema cardiovascular, el hígado y el sistema nervioso, e incrementa el estrés oxidativo (Hidiroglou et al., 2004; Mori and Hirayama, 2000). Los efectos tóxicos de la metionina en la dieta se han relacionado con su conversión a homocisteína, y con un incremento en los niveles de esta última (Hidiroglou et al., 2004; Mathias et al., 1996); así, dietas altas en proteínas o metionina incrementan los niveles plasmáticos de homocisteína en roedores y humanos (Velez-Carrasco et al., 2008; Verhoef et al., 2005). Los niveles de homocisteína también aumentan con la edad en humanos, y representan un factor de riesgo para el envejecimiento y las enfermedades degenerativas asociadas a los radicales libres entre las que se incluyen, al menos, la arterioesclerosis, el deterioro cognitivo, trombosis, cáncer, enfermedades renales crónicas y enfermedad de Parkinson (Seshadri, 2006). La homocisteína tiene un grupo tiol libre que puede ser fácilmente oxidado dando lugar a la generación de disulfidos mixtos en las proteínas, o a puentes disulfido entre proteínas diferentes o entre subunidades de la misma proteína. La adición de glutatión oxidado al complejo I mitocondrial incrementa su tasa de producción de radical superóxido, aunque este efecto se ha demostrado a concentraciones suprafisiológicas (Taylor et al., 2003). Los incrementos en el daño oxidativo debidos a la homocisteína también resultan en la activación de la proteína PARP (Poli (ADP-ribosa) Polimerasa) y en la inducción de p53, conduciendo así a daño en el ADN neuronal y a fenómenos apoptóticos (Kruman et al., 2000, 2002). Por tanto, el descenso en la producción mitocondrial de ROS durante la restricción de metionina podría ser debido a un menor

## Discusión

descenso en la concentración de homocisteína en la matriz mitocondrial, posibilidad que merece futuras investigaciones.

Por otro lado, el descenso en la producción de radicales libres también podría ser el resultado de una respuesta regulada; dado que la metionina es un donador de grupos metilo para diferentes reacciones celulares, los cambios en la metilación del ADN podrían ser también, de forma parcial, la causa de los numerosos cambios y variaciones en la expresión génica descritos durante la RD (Weindruch, 2003), entre los que se podrían incluir los descensos en los complejos respiratorios obtenidos en la presente tesis.

Por otro lado, el descenso observado en la cantidad de los complejos de la cadena respiratoria tanto al 40 como al 80% de restricción de metionina, en hígado y cerebro, está de acuerdo con los resultados obtenidos a partir de los estudios específicos de interferencia con ARN (RNAi) en *Caenorhabditis elegans* (Curran and Ruvkun, 2007; Dillin et al., 2002). Estos estudios han mostrado que inactivando genes que codifican para las subunidades de cualquiera de estos cuatro complejos respiratorios en el animal adulto se consigue un incremento en la longevidad máxima de los gusanos. Así pues, los dos tipos de manipulación experimental que incrementan la longevidad, restricción de metionina e inactivación por RNAi, tienen en común un marcado descenso en las cantidades de los cuatro complejos de la cadena transportadora de electrones.

El factor inductor de apoptosis (AIF) es una proteína mitocondrial que parece estar implicada en el ensamblaje / mantenimiento intramitocondrial de los complejos de la cadena respiratoria. Estudios previos han observado que el AIF, además de tener funciones apoptóticas, también se requiere para la fosforilación oxidativa mitocondrial (Porter and Urbano, 2006). En particular, las células deficientes en AIF presentan un menor contenido en el complejo I (Vahsen et al., 2004), señalando pues a un papel de AIF en la biogénesis o mantenimiento de este complejo multipolipéptico, y ratones con una expresión reducida de AIF presentan asimismo una expresión reducida de las subunidades del complejo I. Teniendo todo esto en cuenta, es posible que este factor esté implicado en los menores niveles de complejo I que se encontraron en mitocondrias hepáticas de ratas restringidas tanto al 40 como al 80% en metionina en relación a sus controles. Aunque en cerebro de ratas restringidas en metionina las diferencias observadas en los niveles de AIF no alcanzaron la significación estadística, si que se apreció una tendencia a la baja en los niveles de esta flavoproteína. Por tanto, es posible que el descenso observado en los niveles de AIF, especialmente en las mitocondrias hepáticas sometidas a una restricción del aminoácido metionina, haya contribuido a los descensos observados en el contenido del complejo I mitocondrial.

En lo que respecta a la restricción de todos los aminoácidos de la dieta excepto metionina, los animales restringidos en aminoácidos también presentaron un descenso en los

## Discusión

niveles de AIF de un 18% y, sin embargo, la cantidad de complejo I no varió. Esto podría indicar que este descenso en los niveles de AIF no es suficiente para llegar a ser limitante para la biogénesis del complejo I. Por otro lado, y como AIF presenta también funciones proapoptóticas, estos resultados sugieren que la restricción de aminoácidos podría contribuir a incrementar la protección frente a la apoptosis tisular a través de descensos moderados en los niveles de AIF que no comprometan a la función de la cadena respiratoria.

En todos los órganos estudiados, la restricción de metionina generó un descenso significativo en la fuga de radicales libres en el complejo I de la cadena respiratoria. Así pues, las mitocondrias restringidas en metionina no solo produjeron menos ROS por unidad de tiempo, sino que también produjeron menos ROS por unidad de flujo electrónico en la cadena respiratoria, de forma similar a lo que se encontró en ratas restringidas en calorías (Gredilla et al., 2001a,b), proteínas (Sanz et al., 2004) y metionina (al 80% y sustituyéndola por glutamato; Sanz et al., 2006a), así como en especies animales longevas en comparación con las de vida más corta (Barja, 2004). En todos estos modelos de envejecimiento retrasado, las mitocondrias son más eficientes, pues presentan una menor tasa de producción de ROS sin necesidad de disminuir el consumo de oxígeno mitocondrial y, por tanto, la producción energética, una interesante capacidad. En el caso del estudio de la restricción de metionina que se acaba de mencionar (Sanz et al., 2006a), el consumo de oxígeno no descendió, sino que incluso aumentó en corazón e hígado de rata. En ese estudio se propuso la posibilidad de que fuera el incremento en los niveles de glutamato, y no el descenso en los de metionina, el responsable de tal aumento. En la presente tesis el consumo de oxígeno no se alteró en hígado ni riñón; sin embargo, y al igual que se observó previamente en el trabajo de Sanz y colaboradores (2006a), la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial se vio incrementada de forma significativa en el cerebro de las ratas restringidas en metionina en un 40%; aunque estos resultados no permiten descartar la posibilidad de que fuera el incremento en los niveles de glutamato el responsable del mayor consumo de oxígeno en el estudio de Sanz y colaboradores (2006a) también es posible que la restricción de metionina sea la responsable de la mayor tasa de consumo de oxígeno mitocondrial en determinados órganos, mientras que en otros no la altere. Este incremento en la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial proporciona más pistas acerca de los posibles mecanismos responsables del descenso en la tasa de producción de ROS. Por contra a lo que sería el pensamiento intuitivo, cuando en el mismo individuo la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial aumenta, la producción de radicales libres tiende a disminuir, en lugar de a aumentar, debido a dos efectos distintos. Por un lado, el grado de reducción de la cadena respiratoria disminuye, lo cual tiende a descender la producción de radicales libres. Por otro lado, el incremento en el consumo de oxígeno disminuye la  $pO_2$  de forma local, y esto disminuye la producción de ROS ya que la  $K_m$  de los generadores de ROS (que tiene baja afinidad por el oxígeno) cae dentro del rango de la  $pO_2$  fisiológica de los tejidos, lo que significa que la producción de ROS es  $pO_2$  dependiente a las presiones parciales de oxígeno tisulares fisiológicas.

Entre las actuales teorías propuestas para explicar el fenómeno del envejecimiento, la teoría mitocondrial de envejecimiento por radicales libres es apoyada por numerosos datos experimentales. De acuerdo con esta teoría, los radicales libres originados en la mitocondria conducen a la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial, entre las que se incluyen mutaciones puntuales y grandes deleciones (Crott et al., 2005) y son estas mutaciones las que, de algún modo, originan el fenómeno de envejecimiento; además, la tasa de producción de radicales libres de origen mitocondrial y el grado de daño oxidativo al ADN mitocondrial correlacionan inversamente con la longevidad máxima en mamíferos (Barja, 2004). Así, de forma similar a lo que ocurre con la producción mitocondrial de ROS, numerosos estudios previos han demostrado que tanto la restricción de calorías (Lopez-Torres et al., 2002) como la de proteínas (Sanz et al., 2004) reducen los niveles de daño oxidativo al ADN mitocondrial, mientras que dichos niveles no se alteran en animales restringidos en lípidos (Sanz et al., 2006b) ni carbohidratos (Sanz et al., 2006c).

De acuerdo con lo observado en estudios previos (Naudí et al., 2007; Sanz et al., 2006a), la restricción de metionina disminuyó los niveles del marcador 8-oxodG en hígado y riñón de rata. Aunque en el presente estudio no se observaron cambios significativos en los niveles de este marcador en cerebro, es posible que en este órgano sea necesario un nivel mayor de restricción de metionina que el que se aplicó en cerebro en la presente tesis, esto es, un 40%, pues en el estudio llevado a cabo por Naudí y colaboradores (Naudí et al., 2007), un 80% de restricción de metionina sí que condujo a descensos significativos en los niveles del marcador 8-oxodG en el ADN mitocondrial de cerebro. Por su parte, la restricción de todos los aminoácidos de la dieta excepto la metionina no alteró los niveles de este marcador en hígado de rata. Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en la presente investigación son claros, e indican que una ingesta reducida de metionina durante la RD es el único factor responsable del descenso en la generación mitocondrial de radicales libres y en el daño oxidativo al ADN mitocondrial; puesto que la 8-oxodG es mutagénica (Moriya, 1993) esto podría descender la tasa de acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial y contribuir así a la extensión de la longevidad máxima (Barja, 2004).

Continuando con el daño oxidativo, y en lo que respecta a la modificación proteica, la restricción de metionina condujo a descensos significativos en los niveles de todos los marcadores de oxidación proteica analizados en la presente tesis: GSA, AASA, CEL, CML y MDAL, tanto en hígado como en cerebro de rata. Dichos descensos en la oxidación (GSA y AASA), glicooxidación (CEL y CML) y lipooxidación (CML y MDAL) proteica también están de acuerdo con la menor tasa de generación mitocondrial de radicales libres que se observó bajo esta manipulación dietética en ambos órganos. Esto mismo se ha observado en estos y otros órganos de rata tras la restricción de calorías, proteínas y metionina (al 80% y sustituyéndola por glutamato en la dieta) en ratas (Ayala et al., 2007; Portero-Otín & Pamplona, 2006; Sanz et

## Discusión

al., 2006a) contribuyendo así a la mejora del estatus oxidativo en los animales restringidos. Además de la cadena respiratoria, en las células del cerebro existen otros lugares que responden a la RD y posiblemente también a la restricción de proteínas, dando lugar a una regulación a la alta de los sistemas redox no mitocondriales y a un descenso en el estrés oxidativo (Hyun et al., 2006). Por todo esto, estos resultados también apoyan la idea de que un descenso en la ingesta de metionina podría ser el factor responsable del descenso en el estrés oxidativo mitocondrial observado durante la RD.

Entre los marcadores de oxidación proteica que se han considerado en la presente tesis, algunos de ellos (CML y especialmente MDAL) son dependientes de la peroxidación lipídica. Como la peroxidación lipídica aumenta fuertemente en función del número de dobles enlaces por ácidos grasos, también se midió la composición total en ácidos grasos tanto en las mitocondrias hepáticas como en cerebro. Se encontró que tanto la restricción de metionina al 40 como al 80% descendía de forma significativa el número total de dobles enlaces. Así, parte del descenso en los niveles de CML y MDAL podría ser secundario a este descenso en la insaturación de los ácidos grasos. Sin embargo, esta no puede ser la única explicación, ya que los otros 3 marcadores de oxidación proteica que se midieron (GSA, AASA y CEL) también descendieron durante la restricción de metionina. Por tanto, parece ser que un descenso en la producción de ROS inducido por la restricción de metionina conduce a un descenso generalizado en la oxidación, lipooxidación y glicooxidación de las proteínas mitocondriales.

Sin embargo, otros autores piensan que, junto con el descenso que la restricción de metionina genera en la producción mitocondrial de ROS, los efectos de la restricción de metionina sobre el metabolismo proteico también deberían ser considerados para tratar de explicar las aparentes acciones antienviejimiento de esta manipulación dietética (Hippkiss, 2008). La metionina es el aminoácido responsable de la iniciación de la traducción del ADN mensajero; se ha sugerido que la restricción de metionina actúa descendiendo la tasa de biosíntesis proteica debido a la limitación de este aminoácido, con el correspondiente descenso en la generación ribosomal de proteínas con error, lo cual disminuiría a su vez la carga total de proteínas anormales sobre las que tendrían que actuar las proteasas celulares y las proteínas chaperonas (tanto citoplasmáticas como mitocondriales); esto incrementaría la disponibilidad de las proteasas para eliminar las proteínas dañadas postsintéticamente, y ayudaría a retrasar la acumulación de proteínas oxidadas, uno de los principales síntomas moleculares de envejecimiento. Esta tasa más lenta de síntesis proteica también podría alterar el plegamiento proteico, lo cual también podría modificar la susceptibilidad proteica al ataque oxidativo.

El estudio de la restricción de todos los aminoácidos de la dieta excepto la metionina también fue útil para esclarecer si variaciones conocidas en otros parámetros relevantes para la extensión de la longevidad durante la RD son debidos a variaciones en los niveles de aminoácidos distintos de la metionina en la dieta. En el presente trabajo, todos los marcadores

## Discusión

de daño proteico disminuyeron tras la restricción, durante 7 semanas, de todos los aminoácidos de la dieta excepto la metionina. Por tanto, no sólo la restricción del aminoácido metionina, sino también la de otros aminoácidos de la dieta, fue capaz de inducir efectos protectores en las proteínas mitocondriales. Dado que en los animales restringidos en aminoácidos excepto metionina los descensos en la modificación proteica ocurrieron sin variaciones en la producción mitocondrial de ROS, probablemente fueron debidos a un incremento en la degradación de las proteínas modificadas en lugar de a una menor tasa de formación de modificaciones oxidativas en las proteínas. En cualquier caso, e independientemente del mecanismo molecular implicado, el descenso generalizado en la oxidación proteica inducido por la restricción de todos los aminoácidos de la dieta excepto la metionina, podría contribuir al descenso en la tasa de envejecimiento que tiene lugar durante la RD.

El descenso en la insaturación de los ácidos grasos en las mitocondrias hepáticas restringidas en metionina al 40 y al 80% fue debido a la variación de varios ácidos grasos, pero los cambios observados más importantes (cuantitativamente) fueron el descenso en el ácido altamente insaturado 20:4n-6 (el ácido graso que mostró los mayores cambios) y el incremento en el mucho menos insaturado 18:2n-6. Resultados similares se obtuvieron cuando se analizó la composición de los ácidos grasos en cerebro de ratas controles y restringidas en metionina: descendió el número de dobles enlaces gracias al descenso en los ácidos grasos más insaturados y a su sustitución por sus precursores menos insaturados. Este tipo de cambio de unos ácidos grasos por otros probablemente expresa una regulación negativa de las actividades  $\delta$ -5 y  $\delta$ -6 desaturasa durante la restricción de metionina en cerebro, donde esas dos enzimas son particularmente abundantes (Cho et al., 1999a, b) así como en hígado. Llama la atención el hecho de que este es, básicamente, el principal tipo de diferencia observada al comparar especies animales de diferentes longevidades. Los animales más longevos tienen membranas menos insaturadas en sus tejidos y mitocondrias que los animales de vida más corta, principalmente debido a un descenso en los niveles de los ácidos 22:6n-3 y 20:4n-6 y a un incremento en los niveles de 18:2n-6 (Hulbert et al., 2007), dando lugar, pues, a una menor peroxidación lipídica y a un menor daño a macromoléculas dependiente de lipooxidación (Pamplona et al., 2002a; Sanz et al., 2006d). Así pues, estos resultados parecen indicar que la restricción de metionina mimetiza los cambios inducidos por la RD en lo que se refiere a la sensibilidad de las membranas a la peroxidación lipídica.

Por su parte, cuando estudiamos el efecto de la restricción de todos los aminoácidos de la dieta excepto la metionina sobre la composición en ácidos grasos de las mitocondrias hepáticas de rata observamos, al igual que bajo la restricción de metionina, un descenso en la insaturación de los ácidos grasos. Este descenso se debió únicamente a variaciones en los niveles de dos ácidos grasos que están unidos en la misma ruta metabólica biosintética: el ácido altamente insaturado 20:4n-6, que descendió, y su precursor menos insaturado 18:2n-6, cuyos niveles se incrementaron, sin observarse cambios en la cantidad total de ácidos grasos

## Discusión

saturados o insaturados. El cambio observado en los niveles de estos dos ácidos grasos inducido por la restricción de aminoácidos parece ser debido a un descenso en la actividad de la enzima  $\delta$ -6 desaturasa, enzima limitante en la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie 6, pues el cociente 20:4 / 18:2 descendió significativamente con la restricción de aminoácidos. Este descenso en la insaturación de los ácidos grasos con la restricción de aminoácidos podría colaborar con el descenso en la generación mitocondrial de radicales libres a incrementar la longevidad durante la RD (que incluye la restricción de aminoácidos). Aunque el cambio en el DBI fue menor (cerca del 3%), sus efectos en la peroxidación lipídica podrían ser mucho mayores, ya que el incremento en la tasa de peroxidación lipídica en función del número de dobles enlaces no es lineal sino, que tiende a ser de tipo exponencial.

Como resultado de la RD, se han descrito variaciones en la biogénesis y bioenergética mitocondrial (Lopez-Lluch et al., 2006; Mattson and Magnus, 2006). Es interesante el hecho de que estos efectos de la RD se han asociado con cambios en los niveles de las proteínas PGC-1 $\alpha$  y UCP4, de forma similar al incremento observado en los niveles de dichos marcadores, cerebro de ratas restringidas en metionina en la presente tesis doctoral. De este modo, se ha observado que la proteína mitocondrial UCP4 es capaz de mediar un cambio adaptativo en el metabolismo energético, y que incrementa la resistencia de las neuronas al estrés metabólico y oxidativo (Mattson and Magnus, 2006). Además, la inducción de PGC-1 $\alpha$  se ha asociado con la activación de numerosos factores de transcripción que regulan la biogénesis mitocondrial y la respiración para reducir el daño oxidativo endógeno, además de las respuestas específicas de las células al frío, ayuno y ejercicio (Lopez-Lluch et al., 2006). Así, se ha propuesto que los efectos beneficiosos de la restricción de metionina podrían ser el resultado de una reprogramación fisiológica del metabolismo tanto a nivel tisular como celular; la restricción de metionina induce cambios en la función endocrina que conducen a una disminución en los niveles séricos de IGF-1, insulina, glucosa, tiroxina (T<sub>4</sub>), y leptina, y a un incremento en los de adiponectina y triiodotironina (T<sub>3</sub>) (Malloy et al., 2006; Miller et al., 2005). Este nuevo estado endocrino posiblemente determine las adaptaciones metabólicas de las células con particular relevancia para el escenario del estrés oxidativo, como las que se acaban de describir, dando lugar, así, a una mayor resistencia del sistema nervioso al estrés oxidativo.

La restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto metionina trajo consecuencias a nivel energético tisular, según se evidencia por los cambios en los niveles de los nucleótidos de adenina. Esto se debió a un descenso en los niveles de ADP y ATP, pero no en los de AMP. Además, el cociente ATP / ADP fue menor en el hígado de los animales restringidos en aminoácidos que en el de sus controles, y lo mismo se observó para la carga energética del adenilato. Así pues, la restricción de otros aminoácidos esenciales de la dieta aparte de la metionina causó un descenso en el contenido en reposo de la energía biológica en tejido hepático de rata. Dicho descenso no debe encontrarse entre los efectos beneficiosos de

## Discusión

la restricción de alimento, pero probablemente es sobrecompensado por otros cambios positivos a la vez que el animal se adapta a un nivel menor de carga energética. Se sabe que la limitación de aminoácidos esenciales inicia una vía metabólica de respuesta, que responde a la deficiencia de aminoácidos mediante la regulación de muchos pasos a lo largo de la vía ADN / ARN / proteínas (Kilberg et al., 2005). Entre estos eventos regulados cabe destacar algunos, como la remodelación de la cromatina, cambios en los niveles de ARN mensajero así como en la traducción dando lugar, pues, a variaciones en la expresión de numerosas proteínas entre las que se incluyen enzimas metabólicas.

Por otro lado, es bien conocido que cambios en los niveles de metionina en la dieta dan lugar a cambios en los metabolitos del ciclo de la metionina, entre los que se incluyen SAM y SAH (Finkelstein and Martin, 1986). En esta investigación no se encontraron diferencias entre los grupos control y restringido en aminoácidos (excepto metionina) en los niveles de SAM ni en los de SAH, así como tampoco se encontraron en el cociente SAM / SAH, de acuerdo con la presencia de metionina a la misma concentración en ambas dietas.

De acuerdo con la ausencia de cambios en la producción mitocondrial de radicales libres durante la restricción de todos los aminoácidos de la dieta menos de metionina, no se observaron cambios en la cantidad de los complejos respiratorios mitocondriales. Por otro lado, y de acuerdo con la ausencia de cambios en los niveles de ninguno de los cuatro complejos de la cadena respiratoria, no se alteraron los niveles de PGC-1 $\alpha$  ni de NRF-2 en el grupo restringido. La expresión de los genes de la cadena respiratoria se encuentra bajo el control de la familia de coactivadores PGC-1, entre los que se incluye PGC-1 $\alpha$ ; este cofactor responde a estímulos ambientales como el frío, o la disponibilidad de alimento y, sucesivamente, dirige factores de transcripción específicos, como NRF-2, que controlan la expresión de genes que codifican para proteínas constituyentes de la cadena respiratoria mitocondrial (Ryan and Hoogenraad, 2007). Estudios previos han encontrado un incremento en la biogénesis mitocondrial durante la RD (Nisoli et al., 2005), pero se desconoce qué componentes de la dieta son los responsables de esta respuesta. La ausencia de cambios en los niveles de PGC-1 $\alpha$  y NRF-2 durante la restricción de aminoácidos descarta el papel de otros aminoácidos aparte de la metionina, mientras que como se acaba de discutir, en cerebro de rata si se observaron incrementos en los niveles de PGC-1 $\alpha$  durante la restricción de metionina. Por tanto, estos datos tomados en conjunto sugieren que la restricción del aminoácido metionina podría ser la responsable, al menos en parte, del incremento en la biogénesis mitocondrial observado durante la RD, aunque evidentemente es necesario mucho más trabajo adicional para corroborar los resultados obtenidos en la presente tesis antes de alcanzar esta conclusión.

En levaduras, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, el gen sir 2 (en inglés *Silent Information Regulator 2*) codifica para deacetilasas de histonas dependientes de

NAD<sup>+</sup>, y desempeñan un importante papel en la determinación de la esperanza de vida así como en la respuesta a la RD (Chen and Guarente, 2007; Rogina and Helfand, 2004). En mamíferos hay 7 sirtuinas (sirtuinas 1-7), que son homólogas de las proteínas Sir 2 en organismos inferiores; de todas ellas, SIRT1 es el miembro de la familia que presenta una mayor homología con Sir 2, y se considera su ortólogo (Frye, 2000). Estudios recientes sugieren que los niveles de la proteína SIRT1 están elevados durante la RD y que, al igual que Sir 2 en levaduras e invertebrados, dicha sirtuina está implicada en la extensión de la longevidad inducida por la RD en mamíferos (Boily et al, 2008). Sin embargo, nunca se ha estudiado qué componentes de la dieta son los responsables de los incrementos en los niveles de sirtuinas observados durante la RD. En la presente tesis, las ratas restringidas en todos los aminoácidos de la dieta excepto en metionina presentaron un incremento en los niveles hepáticos de SIRT1 de un 26% por encima de sus controles. Esto permite demostrar que no es necesario disminuir la ingesta calórica para inducir SIRT1, e indica que la restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto la metionina tiene la capacidad de desencadenar dicho cambio. Sin embargo, este resultado no descarta la posibilidad de que otros componentes de la dieta también estén implicados en la elevación de los niveles de SIRT1 durante la RD, aspecto que debe ser estudiado en futuras investigaciones.

Estudios recientes han visto que SIRT1 interacciona directamente con PGC-1 $\alpha$  y la deacetila (Nemoto et al., 2005), de forma análoga a su interacción con p53 o miembros de la familia de factores de transcripción Forkhead, como Foxo3a; además, parece ser que en el hígado de mamíferos, durante los estados de ayuno y alimentación, tienen lugar ciclos de acetilación y deacetilación de PGC-1 $\alpha$  (Rodgers et al., 2005). Por tanto, el incremento en los niveles de SIRT1 podría contribuir a incrementos en la actividad de PGC-1 $\alpha$  y, por tanto, a la transcripción de genes mitocondriales y a la biogénesis mitocondrial durante la RD. Sin embargo, en este estudio, la restricción de todos los aminoácidos de la dieta al 40% excepto la metionina no alteró la cantidad de PGC-1 $\alpha$  ni la de los complejos respiratorios mitocondriales en hígado de ratas, frente al incremento observado en los niveles de SIRT1. Existen varios fenómenos reguladores a nivel molecular que podrían ser responsables de esta aparente discrepancia. Por un lado, el modelo de deacetilación de PGC-1 $\alpha$  dependiente de SIRT1 es quizás un modelo demasiado simplista, y no toma en cuenta otras modificaciones de PGC-1 $\alpha$  tales como fosforilación o metilación (Rodgers et al., 2008). Además, aunque la activación de SIRT1 deacetila PGC-1 $\alpha$ , también disminuye su actividad transcripcional y disminuye el consumo de oxígeno celular en un 25% (Nemoto et al., 2005). La amplitud de algunos de estos cambios podría ser distinta durante la RD, manipulación que incrementa PGC-1 $\alpha$  y la biogénesis mitocondrial, frente a la restricción de los aminoácidos de la dieta distintos de la metionina. Además, en el caso particular del tejido hepático, el incremento en los niveles de glucagón y glucocorticoides durante el ayuno o la RD incrementan la transcripción del gen que codifica para la proteína PGC-1 $\alpha$  (Rodgers et al., 2008), mientras que estos cambios

hormonales probablemente no tengan lugar en el modelo de restricción de aminoácidos aquí propuesto.

## **2. ESTUDIO DEL MODELO DE RESTRICCIÓN DE DIETA EOD SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL EN HÍGADO DE RATÓN C57BL/6**

En esta investigación se muestra, por vez primera, que la RD a través del método de alimentación en días alternos (EOD) en ratones C57BL/6 desciende, al igual que ocurre durante la RD clásica (restricción de calorías al 40%), la producción mitocondrial de radicales libres y el estrés oxidativo en mamíferos (Gredilla and Barja, 2005).

El descenso en la tasa mitocondrial de radicales libres en los ratones EOD en comparación con los controles se observó con los sustratos glutamato-malato pero no con succinato y el inhibidor rotenona. Como se ha comentado previamente, dos de los cuatro complejos respiratorios mitocondriales, el complejo I (Barja and Herrero, 1998) y el complejo III (Boveris et al., 1976) producen radicales libres. La ausencia de cambios en los niveles de ROS cuando se añadió TTFA a las mitocondrias suplementadas con succinato (y rotenona) avala la idea de que el complejo II no es un importante generador de radicales libres. Con glutamato-malato como sustratos, los electrones fluyen a través de los dos complejos generadores de ROS, los complejos I y III, mientras que con succinato y el inhibidor rotenona, sólo fluyen a través del complejo III. Por tanto, los resultados obtenidos indican que el descenso en la generación mitocondrial de ROS durante el método de alimentación EOD acontece exclusivamente en el complejo I. Esto es similar a lo que se ha observado en modelos clásicos de RD (Gredilla et al., 2001b; Lopez-Torres et al., 2002).

Además, el descenso en la producción mitocondrial de ROS en el complejo I se observó bajo condiciones basales, es decir, sólo con sustrato, que son unas condiciones más fisiológicas que las medidas llevadas a cabo en presencia de inhibidores respiratorios, y que son indicativas de la capacidad máxima de producción de radicales libres por parte de los complejos respiratorios.

De acuerdo con la ausencia de cambios en la tasa metabólica cuando se aplican protocolos clásicos de RD (McCarter et al., 1985), el régimen EOD no alteró el consumo de oxígeno mitocondrial. Así pues, esta ausencia de cambios en el consumo de oxígeno nos indica que el descenso en la generación mitocondrial de ROS no fue un simple resultado de un descenso en el flujo electrónico total. En lugar de esto, la eficiencia de la cadena respiratoria para evitar la fuga univalente de electrones al oxígeno se vio incrementada, pues la fuga de

## Discusión

radicales libres descendió en los ratones EOD. Esto también ha sido observado previamente en estudios clásicos de RD en roedores (Gredilla et al., 2001b; Lopez-Torres et al., 2002), y podría deberse a un menor grado de reducción o a un cambio en el potencial redox de los complejos respiratorios responsables de la generación de ROS.

Asimismo, se ha propuesto que un ligero desacoplamiento mitocondrial podría estar implicado en la extensión de la longevidad mediante un descenso en la producción mitocondrial de ROS (Echtay and Brand, 2007; Skulachev, 2004). En el caso particular de este estudio, el descenso observado en la cantidad relativa de la proteína UCP2 durante el régimen EOD no apoya tal posibilidad, pues el descenso en UCP2 debería disminuir, en lugar de incrementar, el desacoplamiento. Varias hipótesis podrían explicar este resultado; se podría deber, por ejemplo, a los niveles extremadamente bajos de UCP2 que hay en el hígado, en comparación con otros órganos (Echtay, 2007), o a la ausencia de activadores específicos de UCP2 en hepatocitos puesto que las proteínas desacoplantes necesitan ser activadas para desacoplar la respiración mitocondrial (Echtay et al., 2002). Además, no se puede excluir la posibilidad de que otros factores desacoplantes varíen en este modelo de EOD.

En lo que se refiere al mecanismo responsable del descenso en la generación mitocondrial de radicales libres, parte de dicho descenso podría ser debido a la menor cantidad de los complejos respiratorios que se observó en las mitocondrias hepáticas de los ratones restringidos mediante el método EOD, particularmente a la menor cantidad del complejo I, generador de radicales libres, que descendió en un 49% en los ratones EOD.

Por su parte, el descenso observado en los niveles de los complejos respiratorios podría estar relacionado con los menores niveles de PGC-1 $\alpha$  que se han observado en los ratones sometidos al régimen dietético EOD en este estudio. Como se ha comentado previamente, PGC-1 $\alpha$  es un coactivador principal responsable de la biogénesis mitocondrial, por lo que induce la síntesis de numerosas proteínas mitocondriales, entre las que se incluyen las que constituyen los complejos respiratorios (Ryan and Hoogenraad, 2007). Existen estudios previos que han encontrado incrementos en los niveles de PGC-1 $\alpha$  en ratones alimentados mediante el régimen EOD (Nisoli et al., 2005); sin embargo, esto se observó en una cepa distinta de ratones (B6129S, obtenidos del cruce de hembras C57BL/6 con machos SV127), sometida al régimen EOD durante un período distinto de tiempo (3 o 12 meses, frente al periodo de 7 semanas empleado en el presente estudio); además, lo que se midió en el trabajo de Nisoli y colaboradores fue la expresión de PGC-1 $\alpha$ , mientras que en este trabajo se estimó la cantidad de proteína.

Por otro lado, en el presente trabajo, el régimen dietético EOD descendió los niveles de la proteína AIF. Como se ha comentado anteriormente, AIF está implicada en la inducción de fenómenos apoptóticos, pero recientes investigaciones sugieren que esta flavoproteína mitocondrial interviene en funciones tanto de vida como de muerte celular (Porter and Urbano,

## Discusión

2006). En concreto, en las células deficientes en AIF, la fosforilación oxidativa está comprometida, y además el contenido del complejo I está reducido (Vahsen et al., 2004), por lo que parece ser que AIF ejerce un papel en la biogénesis o mantenimiento de dicho complejo multipolipeptídico. Por tanto, es posible que el descenso observado en AIF en el hígado de ratones EOD pueda contribuir al menor contenido en el complejo I observado en esos animales.

Como se ha comentado previamente, uno de los efectos más relevantes de los radicales libres es su capacidad para atacar a macromoléculas biológicas, entre las que destaca el ADN mitocondrial en relación con el envejecimiento. Investigaciones previas han demostrado que existe una cercana relación entre los niveles de generación mitocondrial de ROS y los de daño oxidativo al ADN mitocondrial, tanto en estudios clásicos de RD como en estudios comparativos entre especies animales que presentan longevidades diferentes (Barja, 2004; Pamplona and Barja, 2006). Una posible explicación podría ser la cercana proximidad entre la membrana mitocondrial interna y el ADN mitocondrial. Así pues, y de acuerdo con el descenso observado en la producción mitocondrial de radicales libres, el daño oxidativo al ADN mitocondrial, estimado como los niveles de 8-oxodG, descendió en el hígado de los ratones restringidos EOD.

El tratamiento EOD también descendió los niveles de todos los marcadores de oxidación proteica, glicooxidación, y lipooxidación analizados, de acuerdo con el descenso en la generación mitocondrial de radicales libres. Cambios similares han sido observados previamente en estudios clásicos de RD (Pamplona et al., 2002b, c).

El descenso observado en los niveles de lipooxidación proteica no fue debido a cambios en el grado de insaturación de los ácidos grasos (que influye fuertemente en la sensibilidad a la peroxidación lipídica) puesto que tanto el número total de dobles enlaces de los ácidos grasos como el índice de peroxidizabilidad fueron similares en los ratones EOD y en sus controles. Hubo un descenso en los ácidos grasos PUFAn-6, compensado con un incremento en los ácidos grasos monoinsaturados, lo que sugiere modificaciones inducidas por la dieta en las actividades de las enzimas desaturasas. Sin embargo, los descensos en la lipooxidación proteica parecen estar relacionados, al igual que los descensos en la oxidación proteica y glicooxidación, a las menores tasas de generación de radicales libres en el hígado de ratones EOD, y no a la insaturación de los ácidos grasos de sus membranas hepáticas.

Tanto la producción mitocondrial de radicales libres (Gredilla and Barja, 2005) como la vía de señalización de la insulina (Masoro et al., 1992) descienden en los modelos clásicos de RD, y constituyen dos mecanismos principales con el potencial suficiente para contribuir a explicar el efecto de la RD en la extensión de la longevidad; sin embargo, en la actualidad se desconoce si ambos mecanismos trabajan en paralelo o si, por el contrario, están

## Discusión

mecanísticamente relacionados. Existen algunos estudios que apoyan esta última posibilidad (Lambert and Merry, 2004), aunque otros la descartan (Sanz et al., 2005b). Además, la RD extiende la longevidad de los ratones mutantes enanos *Ames* (Bartke et al., 2001) que, como se ha comentado en el apartado de introducción, presentan menores niveles de GH e IGF-1, y viven aproximadamente un 50% más que los ratones no mutantes (Brown-Borg et al., 1996), lo que sugiere que la RD y la vía de señalización de la insulina podrían actuar de forma independientemente.

Por otro lado, se ha encontrado que el modelo EOD de RD en ratones C57BL/6 no sólo no disminuye los niveles plasmáticos de IGF-1, sino que los incrementa (Anson et al., 2003), mientras que en el presente trabajo se encontró que la alimentación EOD descendía la producción mitocondrial de radicales libres en la misma cepa de ratón. Así pues, estos resultados permiten disociar el descenso en la generación mitocondrial de ROS de la señalización de la vía de la insulina / IGF-1, pues la menor tasa de producción de radicales libres no puede ser consecuencia de descensos en los niveles de IGF-1.

Otro aspecto interesante del modelo de RD EOD es su capacidad parcial para disociar los efectos beneficiosos que conlleva este régimen dietético sobre la salud de la reducción en la ingesta de calorías. Una serie de estudios previos han descrito que la RD por el método EOD conduce a numerosos cambios en beneficio de la salud, entre los que se incluyen descensos en los niveles de homocisteína plasmática, colesterol total y triglicéridos, así como de la presión sanguínea, tasa cardiaca, proliferación celular, diabetes e incidencia de cánceres, mientras que por otro lado incrementa los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la resistencia al estrés, mejora la respuesta cardiaca al infarto de miocardio, es neuroprotector, y contrarresta los descensos dependientes de la edad de los niveles de las proteínas de choque térmico (Anson et al., 2003; Descamps et al., 2005; Martin et al., 2006; Masternak et al., 2005; Varady and Hellerstein, 2007). Gran parte de estos cambios subyacentes al modelo de alimentación en días alternos o EOD los comparte con el modelo clásico de RD, esto es, restricción de calorías al 40%.

Además, el modelo EOD incrementa la longevidad máxima en las cepas A/J, C57BL/6 y B6AF/J de ratón así como en ratas de laboratorio (Goodrick et al., 1983, 1990). Sin embargo, las curvas de supervivencia reflejan que el efecto que ejerce la alimentación EOD sobre la longevidad máxima es sustancialmente menor que el ejercido por la RD clásica en roedores (cerca de un 40% de incremento).

Como se ha comentado en el anterior apartado de esta discusión, tanto estudios previos como los resultados anteriormente expuestos en la presente tesis doctoral indican que el descenso en la producción mitocondrial de radicales libres en distintos tejidos de rata se debe a la restricción de proteínas o de metionina de la dieta, y que bien la restricción de

proteínas o la de metionina podría ser la responsable también de parte (alrededor del 50%) del incremento en la longevidad máxima inducido por la RD clásica en roedores de laboratorio, mientras que el resto se debería a otros factores desconocidos (Pamplona and Barja, 2006). Por tanto, el descenso en la generación mitocondrial de ROS observado en este trabajo podría ser el responsable del incremento en la longevidad máxima en los ratones sometidos al régimen dietético EOD, mientras que en los modelos de RD clásica, el incremento en la longevidad podría ser mayor ya que, junto con el descenso en la generación de ROS, existirían mecanismos adicionales capaces de incrementar la longevidad por encima de lo que lo haría el descenso en la producción de radicales libres. Anson y sus colaboradores describieron que los ratones de la cepa C57BL/6, cuando son sometidos a un régimen de alimentación en días alternos, compensaban la ausencia de alimento el día de que les correspondía ayuno con un incremento en el consumo de calorías por encima de los valores normales el día que recibían alimento y, por tanto, sus niveles de consumo de calorías fueron sustancialmente mayores que los de los roedores sometidos a modelos clásicos de RD; sin embargo, el consumo de alimento en los cuatro periodos de tiempo que midieron, entre 5 y 14 semanas de restricción, seguía siendo menor que el de los ratones controles alimentados *ad libitum* (Anson et al., 2003). Una situación similar se encontró posteriormente en un estudio realizado con ratas Sprague Dawley (Colotti et al., 2005), en el cual se observó, además, que el régimen EOD era capaz de contrarrestar parte del descenso asociado al envejecimiento en los niveles de expresión de las proteínas de choque térmico (Hsps) en corazón, así como de contrarrestar también la tendencia al incremento en los niveles de carbonilos proteicos en proteínas cardíacas.

Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, pues se observó un 20% de descenso en el consumo de alimento en los ratones sometidos al régimen EOD tras 7 semanas de restricción en relación con los controles alimentados *ad libitum*. Además, los ratones EOD presentaron un menor incremento en el peso corporal a lo largo del periodo experimental, y un menor peso del bazo y riñones al finalizar de dicho periodo. Este descenso en la toma de comida (y por tanto, en la ingesta de proteínas y de metionina) podría ser el responsable del descenso en la generación mitocondrial de radicales libres observado en la presente tesis.

Finalmente, aunque los resultados de esta investigación son consistentes con la posibilidad de que el descenso observado en la producción de radicales libres de origen mitocondrial y el consiguiente descenso en el estrés oxidativo macromolecular estén implicados en el efecto que el método de RD EOD ejerce sobre la extensión de la longevidad en ratones C57BL/6, esto no excluye el posible funcionamiento simultáneo de otros mecanismos antienvjecimiento en este modelo animal. Varios trabajos han demostrado que el modelo de alimentación EOD en ratones C57BL/6 incrementa la resistencia de las neuronas al estrés excitotóxico, mejora la respuesta celular al estrés, y protege las neuronas frente a factores genéticos y ambientales a los cuales, de otra forma, sucumbirían durante el envejecimiento

## Discusión

(Anson et al., 2003; Lee et al., 2002). Los mecanismos implicados pueden ser múltiples y podrían incluir, por ejemplo, factores de transcripción FoxO, sirtuinas, proteínas chaperonas y factores neurotróficos (Martin et al., 2006).

# Conclusiones

## Conclusiones

- La restricción de metionina disminuye la producción mitocondrial de ROS y la fuga de radicales libres en hígado, cerebro y riñón de rata, de forma similar a lo observado previamente bajo restricción de calorías y de proteínas al 40%; además, también disminuye la cantidad de los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial, AIF y la insaturación de los ácidos grasos, mientras que aumenta los niveles de UCP4 y PGC-1 $\alpha$ .
- Los niveles de daño oxidativo al ADN mitocondrial, valorados como niveles de 8-oxodG, así como los de oxidación proteica, lipoxidación y glicoxidación disminuyen durante la restricción de metionina, y reflejan los cambios observados en la tasa mitocondrial de radicales libres sugiriendo la existencia de una relación de causalidad entre ambos.
- La restricción de metionina ejerce una función neuroprotectora, y es el factor clave de la dieta responsable del descenso en la tasa de producción mitocondrial de radicales libres y en el estrés oxidativo en diferentes tejidos de rata, así como de cerca de la mitad del incremento en la longevidad máxima que tiene lugar durante la restricción de dieta.
- El hecho de que prácticamente todos los efectos sobre el estrés oxidativo se observen a un nivel de restricción de metionina del 40%, sin necesidad de llegar al 80% de restricción, refuerza la idea de que la menor ingesta de metionina sea la responsable de los cambios beneficiosos que se observan durante la restricción de dieta estándar (40%).
- La restricción al 40% de todos los aminoácidos de la dieta, excepto metionina, no altera el consumo de oxígeno mitocondrial, la tasa de producción mitocondrial de ROS, los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial, la cantidad relativa de ninguno de los cuatro complejos de la cadena respiratoria ni la de los indicadores de biogénesis mitocondrial. Esto, junto con estudios previos de restricción de dieta, de proteínas y de metionina, indica que la restricción de metionina es la responsable del descenso de producción mitocondrial de ROS y daño oxidativo al ADN mitocondrial.
- La restricción al 40% de todos los aminoácidos de la dieta, excepto metionina, disminuye los niveles de las proteínas modificadas oxidativamente, la peroxidación lipídica *in vivo* y la cantidad de AIF, e incrementa los niveles de SIRT1. Por tanto, al menos debido a estas acciones, podría colaborar a extender la longevidad de los mamíferos durante la restricción de calorías y de proteínas.

## Conclusiones

- El método de alimentación en días alternos (EOD) disminuye la producción de radicales libres en el complejo I sin cambios en el consumo de oxígeno y, como consecuencia, también disminuye la fuga de radicales libres en este complejo respiratorio. El daño oxidativo al ADN mitocondrial y a proteínas, así como los niveles de AIF, PGC-1 $\alpha$  y UCP2 también descienden, mientras que el grado de insaturación de los ácidos grasos no se altera en hígado de ratones C57BL/6 sometidos al régimen EOD. Estos resultados también indican que el descenso en producción mitocondrial de ROS y daño oxidativo al ADN mitocondrial es independiente de IGF-1.
- El menor consumo de alimento de cerca de un 20% y, por tanto, de proteínas y metionina en ratones C57BL/6 sometidos a un régimen EOD, podría ser el responsable del descenso en la generación mitocondrial de radicales libres en hígado.
- La menor tasa de producción mitocondrial de radicales libres y el consiguiente descenso en el estrés oxidativo macromolecular podrían estar implicados en el efecto de extensión de longevidad que ejerce el régimen EOD en ratones C57BL/6, pero esto no excluye la posible operación simultánea de otros mecanismos antienvjecimiento en este modelo animal.

# Bibliografía

## Bibliografía

- Ahmed, M.U., Brinkmann Frye, E., Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (1997) N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J* **324**, 565-570.
- Anson, R.M., Guo, Z., de Cabo, R., Iyun, T., Rios, M., Hagepanos, A., Ingram, D.K., Lane, M.A. and Mattson, M.P. (2003) Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 6216-6220.
- Antunes, F., Boveris, A. and Cadenas, E. (2004) On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 16774-16779.
- Archer, V.E. (2003) Does dietary sugar and fat influence longevity? *Med Hypotheses* **60**, 924-929.
- Ayala, V., Naudi, A., Sanz, A., Caro, P., Portero-Otin, M., Barja, G. and Pamplona, R. (2007) Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **62**, 352-60.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. and Finkel, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495.
- Barger, J.L., Walford, R.L. and Weindruch, R. (2003) The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. *Exp Gerontol* **38**, 1343-1351.
- Barja, G. (1999a) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 347-366.
- Barja G (1999b). Kinetic measurement of mitochondrial oxygen radical production. En: *Methods in aging research*. B.P. Yu editor. CRC Press. Boca Ratón. Capítulo 23. pp 533-548.
- Barja, G. (2002) The quantitative measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **34**, 227-233.
- Barja, G. (2004) Free radicals and aging. *Trends Neurosci* **27**, 595-600.

## Bibliografía

- Barja, G. (2007) Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Res* **10**, 215-224.
- Barja, G., Cadenas, S., Rojas, C., Lopez-Torres, M. and Perez-Campo, R. (1994) A decrease of free radical production near critical targets as a cause of maximum longevity in animals. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* **108**, 501-512.
- Barja, G. and Herrero, A. (1998) Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J Bioenerg Biomembr* **30**, 235-243.
- Barja, G. and Herrero, A. (2000) Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J* **14**, 312-318.
- Barja, G., Portero-Otin, M. and Pamplona, R. (2005) Regulation of longevity by mitochondria: Role of free radical production and membrane unsaturation. A comparative approach. *New Front. Mitoch. Biogene. Disease*. 155-187.
- Bartke, A., Wright, J.C., Mattison, J.A., Ingram, D.K., Miller, R.A. and Roth, G.S. (2001) Extending the lifespan of long-lived mice. *Nature* **414**, 412.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R. and Sinclair, D.A. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**, 337-342.
- Beckman, K.B. and Ames, B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**, 547-581.
- Bertrand, H.A., Lynd, F.T., Masoro, E.J. and Yu, B.P. (1980) Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum or a life-prolonging restricted diet. *J Gerontol* **35**, 827-835.
- Bjelland, S. and Seeberg, E. (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* **531**, 37-80.
- Bohr, V.A. (2002) Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* **32**, 804-812.

## Bibliografia

- Boily, G., Seifert, E.L., Bevilacqua, L., He, X.H., Sabourin, G., Estey, C., Moffat, C., Crawford, S., Saliba, S., Jardine, K., Xuan, J., Evans, M., Harper, M.E. and McBurney, M.W. (2008) SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice. *PLoS ONE* **3**, e1759.
- Bokov, A., Chaudhuri, A. and Richardson, A. (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev* **125**, 811-826.
- Boveris, A., Cadenas, E. and Stoppani, A.O. (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* **156**, 435-444.
- Boveris, A., Costa, L.E., Cadenas, E. and Poderoso, J.J. (1999) Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide. *Methods Enzymol* **301**, 188-198.
- Boveris, A. and Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**, 707-716.
- Brandt, U. (1997) Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta* **1318**, 79-91.
- Brown-Borg, H.M., Borg, K.E., Meliska, C.J. and Bartke, A. (1996) Dwarf mice and the ageing process. *Nature* **384**, 33.
- Bunn, H.F. and Higgins, P.J. (1981) Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* **213**, 222-224.
- Carp, H., Miller, F., Hoidal, J.R. and Janoff, A. (1982) Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 2041-2045.
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Runswick, M.J., Shannon, R.J., Hirst, J. and Walker, J.E. (2005) The post-translational modifications of the nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* **4**, 693-699.

## Bibliografia

- Cecchini, G., Maklashina, E., Yankovskaya, V., Iverson, T.M. and Iwata, S. (2003) Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases. *FEBS Lett* **545**, 31-38.
- Ciorba, M.A., Heinemann, S.H., Weissbach, H., Brot, N. and Hoshi, T. (1997) Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 9932-7.
- Clementi, E., Brown, G.C., Foxwell, N. and Moncada, S. (1999) On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 1559-1562.
- Colotti, C., Cavallini, G., Vitale, R.L., Donati, A., Maltinti, M., Del Ry, S., Bergamini, E. and Giannessi, D. (2005) Effects of aging and anti-aging caloric restrictions on carbonyl and heat shock protein levels and expression. *Biogerontology* **6**, 397-406.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* **17**, 1195-1214.
- Crott, J.W., Choi, S.W., Branda, R.F. and Mason, J.B. (2005) Accumulation of mitochondrial DNA deletions is age, tissue and folate-dependent in rats. *Mutat Res* **570**, 63-70.
- Curran, S.P. and Ruvkun, G. (2007) Lifespan regulation by evolutionarily conserved genes essential for viability. *PLoS Genet* **3**, e56.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**, 527-605.
- Chance, B. and Williams, G.R. (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **17**, 65-134.
- Chen, D. and Guarente, L. (2007) SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics. *Trends Mol Med* **13**, 64-71.
- Cho, H.P., Nakamura, M. and Clarke, S.D. (1999a) Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem* **274**, 37335-37339.
- Cho, H.P., Nakamura, M.T. and Clarke, S.D. (1999b) Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase. *J Biol Chem* **274**, 471-477.

## Bibliografia

- Dasgupta, B. and Milbrandt, J. (2007) Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 7217-7222.
- de Grey, A.D. (1999) *The mitochondrial free radical theory of aging*. Molecular Biology Intelligence Unit. R.G. Landes Company. Austin, Texas USA.
- de Grey, A.D. (2001) A proposed mechanism for the lowering of mitochondrial electron leak by caloric restriction. *Mitochondrion* **1**, 129-139.
- de Grey, A.D. (2002) The reductive hotspot hypothesis of mammalian aging: membrane metabolism magnifies mutant mitochondrial mischief. *Eur J Biochem* **269**, 2003-2009.
- de la Asuncion, J.G., Millan, A., Pla, R., Bruseghini, L., Esteras, A., Pallardo, F.V., Sastre, J. and Vina, J. (1996) Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* **10**, 333-338.
- Desai, V.G., Weindruch, R., Hart, R.W. and Feuers, R.J. (1996) Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys* **333**, 145-151.
- Descamps, O., Riondel, J., Ducros, V. and Roussel, A.M. (2005) Mitochondrial production of reactive oxygen species and incidence of age-associated lymphoma in OF1 mice: effect of alternate-day fasting. *Mech Ageing Dev* **126**, 1185-1191.
- Devlin, A.M., Arning, E., Bottiglieri, T., Faraci, F.M., Rozen, R. and Lentz, S.R. (2004) Effect of Mthfr genotype on diet-induced hyperhomocysteinemia and vascular function in mice. *Blood* **103**, 2624-2629.
- Dillin, A., Hsu, A.L., Arantes-Oliveira, N., Lehrer-Graiwer, J., Hsin, H., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J. and Kenyon, C. (2002) Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science* **298**, 2398-2401.
- Dizdaroglu, M. (1992) Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* **275**, 331-342.
- Dufour, E. and Larsson, N.G. (2004) Understanding aging: revealing order out of chaos. *Biochim Biophys Acta* **1658**, 122-132.
- Echtay, K.S. (2007) Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med* **43**, 1351-1371.

## Bibliografia

- Echtay, K.S. and Brand, M.D. (2007) 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production. *Redox Rep* **12**, 26-29.
- Echtay, K.S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J.C. and Brand, M.D. (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96-99.
- Everitt, A.V., Roth, G.S., Le Couteur, D.G. et al. (2005). Caloric restriction versus drug therapy to delay the onset of aging diseases and extend life. *Age* **27**, 39–48.
- Finkelstein, J.D. and Martin, J.J. (1986) Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. *J Biol Chem* **261**, 1582-7.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
- Frye, R.A. (2000) Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 793-798.
- Garrow, T.A. (2001) Betaine-dependent remethylation. En: Carmel R, Jacobsen DW, eds. *Homocysteine in health and disease*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, pp 145-152.
- Gems, D. and Partridge, L. (2001) Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 287-292.
- Genova, M.L., Ventura, B., Giuliano, G., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti Castelli, G. and Lenaz, G. (2001) The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett* **505**, 364-368.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P. and Fenn, W.O. (1954a) Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* **119**, 623-626.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W. and Fenn, W.O. (1954b) Influence of x-irradiation on oxygen poisoning in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* **86**, 27-29.

## Bibliografía

- Gerstbrein, B., Stamatatos, G., Kollias, N. and Driscoll, M. (2005) In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **4**, 127-137.
- Goffart, S. and Wiesner, R.J. (2003) Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol* **88**, 33-40.
- Golden, T.R. and Melov, S. (2001) Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and aging. *Mech Ageing Dev* **122**, 1577-1589.
- Gomez, J., Caro, P., Naudi, A., Portero-Otin, M., Pamplona, R. and Barja, G. (2007) Effect of 8.5% and 25% caloric restriction on mitochondrial free radical production and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* **8**, 555-566.
- Goodrick, C.L., Ingram, D.K., Reynolds, M.A., Freeman, J.R. and Cider, N. (1990) Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. *Mech Ageing Dev* **55**, 69-87.
- Goodrick, C.L., Ingram, D.K., Reynolds, M.A., Freeman, J.R. and Cider, N.L. (1983) Differential effects of intermittent feeding and voluntary exercise on body weight and lifespan in adult rats. *J Gerontol* **38**, 36-45.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* **177**, 751-766.
- Goukassian, D., Gad, F., Yaar, M., Eller, M.S., Nehal, U.S. and Gilchrest, B.A. (2000) Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J* **14**, 1325-1334.
- Gredilla, R. and Barja, G. (2005) Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* **146**, 3713-3717.
- Gredilla, R., Barja, G. and Lopez-Torres, M. (2001a) Effect of short-term caloric restriction on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembr* **33**, 279-287.
- Gredilla, R., Sanz, A., Lopez-Torres, M. and Barja, G. (2001b) Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J* **15**, 1589-1591.

## Bibliografia

- Green, D.E. and Vande Zande, H. (1982) On the enzymic mechanism of oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 1064-1068.
- Gutteridge, J.M. and Halliwell, B. (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* **15**, 129-135.
- Halliwell, B.H. and Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press.
- Hamilton, M.L., Van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A. and Richardson, A. (2001) Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10469-10474.
- Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.
- Harman, D. (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* **20**, 145-147.
- Harman, D. (1986) Free Radical theory of aging: role of free radical reactions in the origination and evolution of life, aging and disease processes. *Mod Trends Aging Research* **147**, 77-83.
- Herrero, A. and Barja, G. (1997) Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev* **98**, 95-111.
- Herrero, A. and Barja, G. (2000) Localization of the Site of Oxygen Radical Generation inside the Complex I of Heart and Nonsynaptic Brain Mammalian Mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **32**, 609-615.
- Hidiroglou, N., Gilani, G.S., Long, L., Zhao, X., Madere, R., Cockell, K., Belonge, B., Ratnayake, W.M. and Peace, R. (2004) The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil. *J Nutr Biochem* **15**, 730-740.
- Hinchliffe, P. and Sazanov, L.A. (2005) Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* **309**, 771-774.
- Hipkiss, A.R. (2008) On methionine restriction, suppression of mitochondrial dysfunction and aging. *Rejuvenation Res* **11**, 685-688.

## Bibliografia

- Hirst, J., King, M.S. and Pryde, K.R. (2008) The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem Soc Trans* **36**, 976-980.
- Hofer, T., Seo, A.Y., Prudencio, M. and Leeuwenburgh, C. (2006) A method to determine RNA and DNA oxidation simultaneously by HPLC-ECD: greater RNA than DNA oxidation in rat liver after doxorubicin administration. *Biol Chem* **387**, 103-111.
- Hoffman, D.L., Salter, J.D. and Brookes, P.S. (2007) Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H101-108.
- Hoshi, T. and Heinemann, S. (2001) Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol* **531**, 1-11.
- Hulbert, A.J. (2005) On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* **234**, 277-288.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R. and Buttemer, W.A. (2007) Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev* **87**, 1175-1213.
- Hyun, D.H., Emerson, S.S., Jo, D.G., Mattson, M.P. and de Cabo, R. (2006) Calorie restriction up-regulates the plasma membrane redox system in brain cells and suppresses oxidative stress during aging. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 19908-19912.
- Ingram, D.K. and Reynolds, M.A. (1987) The relationship of body weight to longevity within laboratory rodent species. *Basic Life Sci* **42**, 247-282.
- Iwasaki, K., Gleiser, C.A., Masoro, E.J., McMahan, C.A., Seo, E.J. and Yu, B.P. (1988) Influence of the restriction of individual dietary components on longevity and age-related disease of Fischer rats: the fat component and the mineral component. *J Gerontol* **43**, B13-21.
- Johnson, J.B., Laub, D.R. and John, S. (2006) The effect on health of alternate day calorie restriction: eating less and more than needed on alternate days prolongs life. *Med Hypotheses* **67**, 209-211.

## Bibliografia

- Khorakova, M., Deil, Z., Khausman, D. and Matsek, K. (1990) [Effect of carbohydrate-enriched diet and subsequent food restriction on life prolongation in Fischer 344 male rats]. *Fiziol Zh* **36**, 16-21.
- Kilberg, M.S., Pan, Y.X., Chen, H. and Leung-Pineda, V. (2005) Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu Rev Nutr* **25**, 59-85.
- Kim, S.R., Matsui, K., Yamada, M., Kohno, T., Kasai, H., Yokota, J. and Nohmi, T. (2004) Suppression of chemically induced and spontaneously occurring oxidative mutagenesis by three alleles of human OGG1 gene encoding 8-hydroxyguanine DNA glycosylase. *Mutat Res* **554**, 365-374.
- Knecht, K.J., Dunn, J.A., McFarland, K.F., McCance, D.R., Lyons, T.J., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (1991) Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. *Diabetes* **40**, 190-196.
- Komninou, D., Leutzinger, Y., Reddy, B.S. and Richie, J.P., Jr. (2006) Methionine restriction inhibits colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* **54**, 202-208.
- Kregel, K.C. and Zhang, H.J. (2007) An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R18-36.
- Kruman, II, Culmsee, C., Chan, S.L., Kruman, Y., Guo, Z., Penix, L. and Mattson, M.P. (2000) Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* **20**, 6920-6926.
- Kruman, II, Kumaravel, T.S., Lohani, A., Pedersen, W.A., Cutler, R.G., Kruman, Y., Haughey, N., Lee, J., Evans, M. and Mattson, M.P. (2002) Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **22**, 1752-1762.
- Kudin, A.P., Debska-Vielhaber, G. and Kunz, W.S. (2005) Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomed Pharmacother* **59**, 163-168.
- Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., Morrow, J.D., Van Remmen, H., Sedivy, J.M., Yamasoba, T., Tanokura, M., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C. and Prolla, T.A. (2005)

## Bibliografia

- Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**, 481-484.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N. and Andreyev, A. (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem J* **368**, 545-553.
  - Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P. and Auwerx, J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* **127**, 1109-1122.
  - Lai, J.C. and Clark, J.B. (1979) Preparation of synaptic and nonsynaptic mitochondria from mammalian brain. *Methods Enzymol* **55**, 51-60.
  - Lambert, A.J., Boysen, H.M., Buckingham, J.A., Yang, T., Podlutzky, A., Austad, S.N., Kunz, T.H., Buffenstein, R. and Brand, M.D. (2007) Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell* **6**, 607-618.
  - Lambert, A.J. and Merry, B.J. (2004) Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: reversal by insulin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R71-79.
  - Lambert, A.J., Portero-Otin, M., Pamplona, R. and Merry, B.J. (2004) Effect of ageing and caloric restriction on specific markers of protein oxidative damage and membrane peroxidizability in rat liver mitochondria. *Mech Ageing Dev* **125**, 529-538.
  - Latorre, A., Moya, A. and Ayala, F.J. (1986) Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 8649-8653.
  - Lee, J., Duan, W. and Mattson, M.P. (2002) Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* **82**, 1367-1375.
  - Levi, B. and Werman, M.J. (2001) Fructose triggers DNA modification and damage in an *Escherichia coli* plasmid. *J Nutr Biochem* **12**, 235-241.

## Bibliografia

- Lopez-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhu, M., Jamieson, H., Hilmer, S., Cascajo, M.V., Allard, J., Ingram, D.K., Navas, P. and de Cabo, R. (2006) Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 1768-1773.
- Lopez-Lluch, G., Irueta, P.M., Navas, P. and de Cabo, R. (2008) Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol* **43**, 813-819.
- Lopez-Torres, M. and Barja, G. (2008) Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction Possible implications for humans. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 1337-1347.
- Lopez-Torres, M., Gredilla, R., Sanz, A. and Barja, G. (2002) Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* **32**, 882-889.
- Loschen, G., Flohe, L. and Chance, B. (1971) Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett* **18**, 261-264.
- Mair, W., Piper, M.D. and Partridge, L. (2005) Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLoS Biol* **3**, e223.
- Malloy, V.L., Krajcik, R.A., Bailey, S.J., Hristopoulos, G., Plummer, J.D. and Orentreich, N. (2006) Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell* **5**, 305-314.
- Mander, P., Borutaite, V., Moncada, S. and Brown, G.C. (2005) Nitric oxide from inflammatory-activated glia synergizes with hypoxia to induce neuronal death. *J Neurosci Res* **79**, 208-215.
- Margulis, L. (1970) *Origin of eukaryotic cells*. New Haven: Yale University Press.
- Martin, B., Mattson, M.P. and Maudsley, S. (2006) Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res Rev* **5**, 332-353.
- Masoro, E.J., Iwasaki, K., Gleiser, C.A., McMahan, C.A., Seo, E.J. and Yu, B.P. (1989) Dietary modulation of the progression of nephropathy in aging rats: an evaluation of the importance of protein. *Am J Clin Nutr* **49**, 1217-1227.
- Masoro, E.J., McCarter, R.J., Katz, M.S. and McMahan, C.A. (1992) Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use. *J Gerontol* **47**, B202-208.

## Bibliografia

- Masternak, M.M., Al-Regaiey, K.A., Bonkowski, M.S., Panici, J.A. and Bartke, A. (2005) Effect of every other day feeding diet on gene expression in normal and in long-lived Ames dwarf mice. *Exp Gerontol* **40**, 491-497.
- Matthias, D., Becker, C.H., Riezler, R. and Kindling, P.H. (1996) Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. *Atherosclerosis* **122**, 201-216.
- Mattison, J.A., Roth, G.S., Lane, M.A. and Ingram, D.K. (2007) Dietary restriction in aging nonhuman primates. *Interdiscip Top Gerontol* **35**, 137-158.
- Mattson, M.P., Chan, S.L. and Duan, W. (2002) Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol Rev* **82**, 637-672.
- Mattson, M.P. and Magnus, T. (2006) Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* **7**, 278-294.
- McCarter, R., Masoro, E.J. and Yu, B.P. (1985) Does food restriction retard aging by reducing the metabolic rate? *Am J Physiol* **248**, E488-490.
- McCay, C.M., Crowell, M.F., Maynard, L.A. (1935) The effect of retarded growth upon the length of life-span and upon the ultimate body size. *J Nutr* **10**, 63-79.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**, 6049-6055.
- Medvedev, Z.A. (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* **65**, 375-398.
- Melse-Boonstra, A., Holm, P.I., Ueland, P.M., Olthof, M., Clarke, R. and Verhoef, P. (2005) Betaine concentration as a determinant of fasting total homocysteine concentrations and the effect of folic acid supplementation on betaine concentrations. *Am J Clin Nutr* **81**, 1378-1382.
- Miller, R.A., Buehner, G., Chang, Y., Harper, J.M., Sigler, R. and Smith-Wheelock, M. (2005) Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* **4**, 119-125.

## Bibliografia

- Min, K.J. and Tatar, M. (2006) Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* **127**, 643-646.
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J. and Johnson, J.E., Jr. (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* **15**, 575-591.
- Mitchell, P. (1975) Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* **56**, 1-6.
- Mitsui, A., Hamuro, J., Nakamura, H., Kondo, N., Hirabayashi, Y., Ishizaki-Koizumi, S., Hirakawa, T., Inoue, T. and Yodoi, J. (2002) Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxid Redox Signal* **4**, 693-696.
- Miwa, S. and Brand, M.D. (2005) The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1709**, 214-219.
- Mobbs, C.V., Bray, G.A., Atkinson, R.L., Bartke, A., Finch, C.E., Maratos-Flier, E., Crawley, J.N. and Nelson, J.F. (2001) Neuroendocrine and pharmacological manipulations to assess how caloric restriction increases life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56**, 34-44.
- Mori, N. and Hirayama, K. (2000) Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. *J Nutr* **130**, 2349-2355.
- Moriya, M. (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1122-1126.
- Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W.M., Requena, J., Berlett, B.S. and Stadtman, E.R. (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 12920-12925.
- Muller, F. (2000) The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: its relevance to aging. *J. Amer. Aging Assoc.* **23**, 227-253.
- Muller, F.L., Liu, Y., Abdul-Ghani, M.A., Lustgarten, M.S., Bhattacharya, A., Jang, Y.C. and Van Remmen, H. (2008) High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochem J* **409**, 491-499.

## Bibliografia

- Muller, F.L., Liu, Y. and Van Remmen, H. (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **279**, 49064-49073.
- Murtagh-Mark, C.M., Reiser, K.M., Harris, R., Jr. and McDonald, R.B. (1995) Source of dietary carbohydrate affects life span of Fischer 344 rats independent of caloric restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **50**, B148-154.
- Nakamura, H., Mitsui, A. and Yodoi, J. (2002) Thioredoxin overexpression in transgenic mice. *Methods Enzymol* **347**, 436-440.
- Navarro, A. and Boveris, A. (2007) The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C670-686.
- Naudi, A., Caro, P., Jove, M., Gomez, J., Boada, J., Ayala, V., Portero-Otin, M., Barja, G. and Pamplona, R. (2007) Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation Res* **10**, 473-484.
- Nemoto, S., Fergusson, M.M. and Finkel, T. (2005) SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}. *J Biol Chem* **280**, 16456-16460.
- Nisoli, E. and Carruba, M.O. (2006) Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci* **119**, 2855-2862.
- Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Falcone, S., Valerio, A., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S. and Carruba, M.O. (2005) Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* **310**, 314-317.
- Orentreich, N., Matias, J.R., DeFelice, A. and Zimmerman, J.A. (1993) Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr* **123**, 269-274.
- Pamplona, R. and Barja, G. (2003) Aging rate, mitochondrial free radical production, and constitutive sensitivity to lipid peroxidation: insights from comparative studies. En: *Aging at the Molecular Level*. T. Von Zglinicki (ed.) Kluwer Acad. Publishers. pp 47-64.
- Pamplona, R. and Barja, G. (2006) Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 496-508.

## Bibliografia

- Pamplona, R. and Barja, G. (2007) Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res Rev* **6**, 189-210.
- Pamplona, R., Barja, G. and Portero-Otin, M. (2002a) Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Ann N Y Acad Sci* **959**, 475-490.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Bellmun, M.J., Gredilla, R. and Barja, G. (2002b) Aging increases Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and caloric restriction decreases Nepsilon-(carboxyethyl)lysine and Nepsilon-(malondialdehyde)lysine in rat heart mitochondrial proteins. *Free Radic Res* **36**, 47-54.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Requena, J., Gredilla, R. and Barja, G. (2002c) Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls. *Mech Ageing Dev* **123**, 1437-1446.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Requena, J.R., Thorpe, S.R., Herrero, A. and Barja, G. (1999a) A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech Ageing Dev* **106**, 283-296.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Riba, D., Ledo, F., Gredilla, R., Herrero, A. and Barja, G. (1999b) Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the canary and the parakeet than in the mouse. *Ageing Clin Exp Res* **11**, 44-49.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Riba, D., Requena, J.R., Thorpe, S.R., Lopez-Torres, M. and Barja, G. (2000) Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**, B286-291.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Riba, D., Ruiz, C., Prat, J., Bellmunt, M.J. and Barja, G. (1998) Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J Lipid Res* **39**, 1989-1994.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Sanz, A., Requena, J. and Barja, G. (2004) Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exp Gerontol* **39**, 725-733.

## Bibliografia

- Pavillard, V., Nicolaou, A., Double, J.A. and Phillips, R.M. (2006) Methionine dependence of tumours: a biochemical strategy for optimizing paclitaxel chemosensitivity in vitro. *Biochem Pharmacol* **71**, 772-778.
- Piper, M.D. and Bartke, A. (2008) Diet and aging. *Cell Metab* **8**, 99-104.
- Poderoso, J.J., Carreras, M.C., Lisdero, C., Riobo, N., Schopfer, F. and Boveris, A. (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* **328**, 85-92.
- Porter, A.G. and Urbano, A.G. (2006) Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioessays* **28**, 834-843.
- Portero-Otín, M. and Pamplona, R. Is endogenous oxidative protein damage involved in the aging process? En: Pietzsch J, (ed.): *Recent Research Developments in Pathological Biochemistry. Vol 1 Protein oxidation and Disease*. Kerala, India: Research Signpost, 2006, pp. 91-142.
- Portero-Otin, M., Requena, J.R., Bellmunt, M.J., Ayala, V. and Pamplona, R. (2004) Protein nonenzymatic modifications and proteasome activity in skeletal muscle from the short-lived rat and long-lived pigeon. *Exp Gerontol* **39**, 1527-1535.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B.M. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839.
- Ramsey, J.J., Hagopian, K., Kenny, T.M., Koomson, E.K., Bevilacqua, L., Weindruch, R. and Harper, M.E. (2004) Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E31-40.
- Rao, A.M., Drake, M.R. and Stipanuk, M.H. (1990) Role of the transsulfuration pathway and of gamma-cystathionase activity in the formation of cysteine and sulfate from methionine in rat hepatocytes. *J Nutr* **120**, 837-845.
- Refsgaard, H.H., Tsai, L. and Stadtman, E.R. (2000) Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 611-616.
- Regina, M., Korhonen, V.P., Smith, T.K., Alakuijala, L. and Eloranta, T.O. (1993) Methionine toxicity in the rat in relation to hepatic accumulation of S-adenosylmethionine: prevention by

## Bibliografia

- dietary stimulation of the hepatic transsulfuration pathway. *Arch Biochem Biophys* **300**, 598-607.
- Requena, J.R., Chao, C.C., Levine, R.L. and Stadtman, E.R. (2001) Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 69-74.
  - Requena, J.R., Fu, M.X., Ahmed, M.U., Jenkins, A.J., Lyons, T.J., Baynes, J.W. and Thorpe, S.R. (1997) Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. *Biochem J* **322**, 317-325.
  - Richie, J.P., Jr., Leutzinger, Y., Parthasarathy, S., Malloy, V., Orentreich, N. and Zimmerman, J.A. (1994) Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J* **8**, 1302-1307.
  - Richter, C. (1987) Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids* **44**, 175-189.
  - Robert, K.A., Brunet-Rossini, A. and Bronikowski, A.M. (2007) Testing the 'free radical theory of aging' hypothesis: physiological differences in long-lived and short-lived colubrid snakes. *Aging Cell* **6**, 395-404.
  - Rodgers, J.T., Lerin, C., Gerhart-Hines, Z. and Puigserver, P. (2008) Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett* **582**, 46-53.
  - Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M. and Puigserver, P. (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* **434**, 113-118.
  - Rogina, B. and Helfand, S.L. (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15998-16003.
  - Ross, M.H. (1976) Nutrition and longevity in experimental animals. En: M. Winick (Ed.), *Nutrition and Aging*, Wiley, New York. pp 43-57.
  - Roth, G.S., Mattison, J.A., Ottinger, M.A., Chachich, M.E., Lane, M.A. and Ingram, D.K. (2004) Aging in rhesus monkeys: relevance to human health interventions. *Science* **305**, 1423-1426.

## Bibliografía

- Rotsaert, F.A., Ding, M.G. and Trumpower, B.L. (2008) Differential efficacy of inhibition of mitochondrial and bacterial cytochrome bc1 complexes by center N inhibitors antimycin, illicicolin H and funiculosin. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 211-219.
- Ruan, H., Tang, X.D., Chen, M.L., Joiner, M.L., Sun, G., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S.H., Iverson, L., Wu, C.F. and Hoshi, T. (2002) High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 2748-2753.
- Ruch, W., Cooper, P.H. and Baggiolini, M. (1983) Assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horse-radish peroxidase. *J Immunol Methods* **63**, 347-357.
- Ruiz, M.C., Ayala, V., Portero-Otin, M., Requena, J.R., Barja, G. and Pamplona, R. (2005) Protein methionine content and MDA-lysine adducts are inversely related to maximum life span in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* **126**, 1106-1114.
- Ryan, M.T. and Hoogenraad, N.J. (2007) Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* **76**, 701-722.
- Saborido, A., Soblechero, L. and Megias, A. (2005) Isolated respiring heart mitochondria release reactive oxygen species in states 4 and 3. *Free Radic Res* **39**, 921-931.
- Samuels, D.C. (2005) Life span is related to the free energy of mitochondrial DNA. *Mech Ageing Dev* **126**, 1123-1129.
- Sanz, A., Caro, P., Ayala, V., Portero-Otin, M., Pamplona, R. and Barja, G. (2006a) Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J* **20**, 1064-1073.
- Sanz, A., Caro, P. and Barja, G. (2004) Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 545-552.
- Sanz, A., Caro, P., Ibanez, J., Gomez, J., Gredilla, R. and Barja, G. (2005a) Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *J Bioenerg Biomembr* **37**, 83-90.
- Sanz, A., Caro, P., Sanchez, J.G. and Barja, G. (2006b) Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. *Ann N Y Acad Sci* **1067**, 200-209.

## Bibliografía

- Sanz, A., Gomez, J., Caro, P. and Barja, G. (2006c) Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J Bioenerg Biomembr* **38**, 327-333.
- Sanz, A., Gredilla, R., Pamplona, R., Portero-Otin, M., Vara, E., Tresguerres, J.A. and Barja, G. (2005b) Effect of insulin and growth hormone on rat heart and liver oxidative stress in control and caloric restricted animals. *Biogerontology* **6**, 15-26.
- Sanz, A., Pamplona, R. and Barja, G. (2006d) Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid Redox Signal* **8**, 582-599.
- Sazanov, L.A. and Hinchliffe, P. (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* **311**, 1430-1436.
- Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A. and Vonck, J. (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* **281**, 15370-15375.
- Segall, P. (1977) Long-term tryptophan restriction and aging in the rat. *Aktuelle Gerontol* **7**, 535-538.
- Seshadri, S. (2006) Elevated plasma homocysteine levels: risk factor or risk marker for the development of dementia and Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* **9**, 393-398.
- Shimokawa, I., Higami, Y., Yu, B.P., Masoro, E.J. and Ikeda, T. (1996) Influence of dietary components on occurrence of and mortality due to neoplasms in male F344 rats. *Aging Clin Exp Res* **8**, 254-262.
- Short, K.R., Bigelow, M.L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S. and Nair, K.S. (2005) Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 5618-5623.
- Skulachev, V.P. (2004) Mitochondria, reactive oxygen species and longevity: some lessons from the Barja group. *Aging Cell* **3**, 17-19.
- Sohal, R.S., Ku, H.H., Agarwal, S., Forster, M.J. and Lal, H. (1994) Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev* **74**, 121-133.

## Bibliografia

- Sohal, R.S. and Weindruch, R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**, 59-63.
- Srere, P.A. (1969) Citrate syntase. *Methods Enzymol* **13**, 3-11.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J. and Brand, M.D. (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* **277**, 44784-44790.
- Stadtman, E.R., Van Remmen, H., Richardson, A., Wehr, N.B. and Levine, R.L. (2005) Methionine oxidation and aging. *Biochim Biophys Acta* **1703**, 135-140.
- Stefanello, F.M., Chiarani, F., Kurek, A.G., Wannmacher, C.M., Wajner, M. and Wyse, A.T. (2005) Methionine alters Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci* **23**, 651-656.
- Stipanuk, M.H. (2004) Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* **24**, 539-577.
- Stocchi, V., Cucchiaroni, L., Magnani, M., Chiarantini, L., Palma, P. and Crescentini, G. (1985) Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Anal Biochem* **146**, 118-124.
- Strehler, B.L. (1962) *Time, cells, and aging*. Academic Press, New York. pp 1-456.
- Stuart, J.A., Karahalil, B., Hogue, B.A., Souza-Pinto, N.C. and Bohr, V.A. (2004) Mitochondrial and nuclear DNA base excision repair are affected differently by caloric restriction. *FASEB J* **18**, 595-597.
- Stuart, J.A., Mayard, S., Hashiguchi, K., Souza-Pinto, N.C. and Bohr, V.A. (2005) Localization of mitochondrial DNA base excision repair to an inner membrane-associated particulate fraction. *Nucleic Acids Res* **33**, 3722-3732.
- Szczesny, B., Hazra, T.K., Papaconstantinou, J., Mitra, S. and Boldogh, I. (2003) Age-dependent deficiency in import of mitochondrial DNA glycosylases required for repair of oxidatively damaged bases. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 10670-10675.

## Bibliografía

- Taylor, E.R., Hurrell, F., Shannon, R.J., Lin, T.K., Hirst, J. and Murphy, M.P. (2003) Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *J Biol Chem* **278**, 19603-19610.
- Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (2003) Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids* **25**, 275-281.
- Tretter, L. and Adam-Vizi, V. (2005) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 2335-2345.
- Tretter, L., Takacs, K., Hegedus, V. and Adam-Vizi, V. (2007) Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in brain mitochondria. *J Neurochem* **100**, 650-663.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly, Y.M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., Tornell, J., Jacobs, H.T. and Larsson, N.G. (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417-423.
- Troen, A.M., French, E.E., Roberts, J.F., Selhub, J., Ordovas, J.M., Parnell L.D. and Lain, C.Q. (2007) Lifespan modification by glucose and methionine in *Drosophila melanogaster* fed a chemically defined diet, *Age* **29**, 29-39.
- Trumpower, B.L. (1990) The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *J Biol Chem* **265**, 11409-11412.
- Turrens, J.F., Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1982) Hyperoxia increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by lung mitochondria and microsomes. *Arch Biochem Biophys* **217**, 411-421.
- Tyler, D. (1992) *The mitochondrion in health and disease*. VHC Publishers, INC.
- Vahsen, N., Cande, C., Briere, J.J., Benit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P.G., Pequignot, M.O., Casares, N., Lazar, V., Feraud, O., Debili, N., Wissing, S., Engelhardt, S., Madeo, F., Piacentini, M., Penninger, J.M., Schagger, H., Rustin, P. and Kroemer, G. (2004) AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* **23**, 4679-89.
- Vallejo, E.A. (1956) La dieta de hambre a días alternos en la alimentación de los viejos. *Rev Clin Esp* **63**, 25-27.

## Bibliografía

- Varady, K.A. and Hellerstein, M.K. (2007) Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. *Am J Clin Nutr* **86**, 7-13.
- Vargas, F., Rivas, C., Nursamaa, A. and Zoltan, T. (2007) Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química* **2**, 3-15.
- Velez-Carrasco, W., Merkel, M., Twiss, C.O. and Smith, J.D. (2008) Dietary methionine effects on plasma homocysteine and HDL metabolism in mice. *J Nutr Biochem* **19**, 362-370.
- Verhoef, P., van Vliet, T., Olthof, M.R. and Katan, M.B. (2005) A high-protein diet increases postprandial but not fasting plasma total homocysteine concentrations: a dietary controlled, crossover trial in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* **82**, 553-558.
- Wang, W., Kramer, P.M., Yang, S., Pereira, M.A. and Tao, L. (2001) Reversed-phase high-performance liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in mouse liver and the effect of methionine on their concentrations. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **762**, 59-65.
- Wang, E., Wong, A. and Cortopassi, G. (1997) The rate of mitochondrial mutagenesis is faster in mice than humans. *Mutat Res* **377**, 157-166.
- Weibel, E.R. (2002) Physiology: the pitfalls of power laws. *Nature* **417**, 131-132.
- Weindruch, R. (2003) Caloric restriction, gene expression, and aging. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **17**, S58-59.
- Willcox, B., Willcox, C. and Suzuki, M. (2000) *The Okinawa Way*. Penguin Books. London.
- Yagi, T. and Matsuno-Yagi, A. (2003) The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry* **42**, 2266-2274.
- Yui, R., Ohno, Y. and Matsuura, E.T. (2003) Accumulation of deleted mitochondrial DNA in aging *Drosophila melanogaster*. *Genes Genet Syst* **78**, 245-251.
- Zara, V., Conte, L. and Trumpower, B.L. (2009) Biogenesis of the yeast cytochrome bc(1) complex. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 89-96.
- Zeisel, S.H., Mar, M.H., Howe, J.C. and Holden, J.M. (2003) Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J Nutr* **133**, 1302-1307.

## Bibliografia

- Zimmerman, J.A., Malloy, V., Krajcik, R. and Orentreich, N. (2003) Nutritional control of aging. *Exp Gerontol* **38**, 47-52.

# Anexo

Gran parte del trabajo expuesto en la presente tesis doctoral ha sido publicado en revistas científicas de prestigio nacional e internacional, en los siguientes artículos de investigación:

- **Caro P**, Gómez J, López-Torres M, Sánchez I, Naudí A, Jove M, Pamplona R & Barja G. (2008) 40% and 80% methionine restriction without changing other dietary components decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 9(3):183-196.
- Naudí A, **Caro P**, Jove M, Gomez J, Boada J, Ayala V, Portero-Otín M, Barja G & Pamplona R. (2007) Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation Research* 10(4):473-484.
- **Caro P**, Gómez J, Sánchez I, Garcia R, Naudí Pamplona R & Barja G. Effect of restriction of dietary aminoacids except methionine on mitochondrial ROS production, oxidative damage, and mitochondrial biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology*, 2009. doi 10.1007/s10522-008-9200-4.
- **Caro P**, Gómez J, Sánchez I, López-Torres M & Barja G. Efecto de la restricción de aminoácidos excepto la metionina sobre el estrés oxidativo mitocondrial. *Rev. Esp. Geriatr. y Gerontol (En prensa)*.
- **Caro P**, Gómez J, López-Torres M, Sánchez I, Naudí A, Portero-Otín M, Pamplona R & Barja G. (2008) Effect of Every Other Day Feeding on mitochondrial free radical production and oxidative stress in mouse liver. *Rejuvenation Research* 11(3):621-629.

