

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

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



**EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE  
METIONINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y  
DE LA EDAD SOBRE LA PRESENCIA DE ADN  
MITOCONDRIAL EN EL ADN NUCLEAR, EN  
RATA WISTAR.**

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

**José Gómez Sánchez**

Bajo la dirección de los doctores

Gustavo Barja de Quiroga Losada  
Mónica López Torres

**Madrid, 2010**

**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Biología**



**Efecto de la suplementación de metionina  
sobre el estrés oxidativo y de la edad sobre la  
presencia de ADN mitocondrial en el ADN  
nuclear, en rata Wistar**

**Memoria presentada por José Gómez Sánchez  
para obtener el Grado de Doctor en Biología**

**Madrid, 2010**

**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Biología**



**Efecto de la suplementación de metionina  
sobre el estrés oxidativo y de la edad sobre la  
presencia de ADN mitocondrial en el ADN  
nuclear, en rata Wistar**

VºBº

VºBº

Dr. Gustavo Barja  
de Quiroga Losada

Dra. Mónica López Torres

José Gómez Sánchez

**Memoria presentada por José Gómez Sánchez  
para obtener el Grado de Doctor en Biología**

**Madrid, 2010**

**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 Losada y la Dra. Mónica López Torres.**

El presente trabajo se ha llevado a cabo con el apoyo económico prestado por los proyectos de I+D del Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2006-14495/BFI y BFU2008-00335/BFI) y BSCH-UCM (2009) para el Dr. Gustavo Barja; del el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-14495/BFI) y de la Generalitat de Catalunya (2005SGR00101) para el Dr. Reinald Pamplona; del Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2006-12433) y de la Fundación “La Caixa” para el Dr. Manel Portero; del Ministerio de Industria (Programa CENIT-METDEVFUN) para el Dr. Reinald Pamplona y el Dr. Manel Portero; del Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-06963) para el Dr. Juan Sastre; y del Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-05104) para la Dra. Maria Jesús Puertas. José Gómez recibió una beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

*En los momentos de crisis, sólo la imaginación  
es más importante que el conocimiento.*

**Albert Einstein**

*Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión,  
de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores.*

**Julius Robert Oppenheimer**

*En lo tocante a la ciencia, la autoridad de un millar no es  
superior al humilde razonamiento de una sola persona.*

**Galileo Galilei**

Llegó el momento de escribir los agradecimientos de la tesis que curiosamente componen una de las partes más leídas, aún siendo la menos relevante científicamente. Espero no dejarme a nadie en el tintero aunque es difícil por la cantidad de personas con las que he compartido camino en este gran viaje que ha sido la realización de la tesis doctoral.

En primer lugar he de agradecer al Dr. Gustavo Barja la oportunidad que me concedió para participar en el estudio del envejecimiento, una empresa tan importante como complicada. Solo me queda desearle todo lo mejor, especialmente en estos momentos tan difíciles para él.

En segundo lugar he de agradecer a la Dra. Mónica López toda la ayuda que me ha prestado en la elaboración de esta tesis y los ánimos que me ha dado.

No puedo olvidar a mis compañeras del grupo: a Inés siempre tan alegre y dispuesta a prestarme su ayuda; y a Alexia la nueva incorporación te deseo lo mejor en esta carrera que comienzas. Además debo mencionar a los que ya se fueron: a Alberto, por sus enseñanzas en el laboratorio; y a Pilar por su compañerismo.

Al Dr. Reinald Pamplona y a todo su grupo: Alba, Manel, Dani, Mariona, David y a los demás; por acogerme en su laboratorio y por toda la colaboración y la ayuda prestada, ya que sin ellos esta tesis no habría sido posible.

También debo agradecer al Dr. Juan Sastre y a la Dra. Maria Jesús Puertas así como a sus respectivos grupos toda la colaboración prestada en la parte más “genética” de esta tesis.

Debo continuar agradeciendo todos los buenos momentos que hemos pasado juntos a todos los amigos y compañeros de la planta trece: Elena, con su imaginación desbordante; Clara, siempre tan alegre; Ricardo, con sus ocurrencias; Eva, gran amiga y consejera; Yurena, con su jovialidad; Andrea con su Andreísmo; y por supuesto Álvaro, Bea, Laura, Ana y los demás por el apoyo prestado.

Tengo que agradecer a mis amigos y a la par roleros Enrique, Gema, Edu, Inma, Carlos, su hermano Edu, Hugo, Marina, Pablo y su Inma, todo el apoyo y la compañía que me han brindado.

Debo mencionar a mis amigos del pueblo Antonio José, Anabel, Rodri, Agustín, Julio, Alba por todos los ratos de ocio que hemos pasado juntos.

Por último aunque no menos importante, quiero agradecer a mis padres José y Andrea todo el apoyo que me han prestado. Sin ellos no habría podido llegar hasta aquí.

# Abreviaturas

- % FRL = fuga de porcentual de radicales libres.
  - 4-HNE = 4-hidroxinonenal.
  - 8-oxodG = 8-hidroxi-7,8-dihidroxi-2'-deoxiguanosina.
  - AA = antimicina A.
  - AASA = semaldehido aminoadípico.
  - ACL = longitud media de la cadena (*Average Chain Length*).
  - ADNmt = ADN mitocondrial.
  - ADNn = ADN nuclear.
  - AIF = factor de inducción de la apoptosis (*Apoptosis-Inducing Factor*).
  - BHMT = betaína-homocisteína metiltransferasa.
  - BSA = albúmina sérica bovina.
  - CEL = N<sup>ε</sup>-(Carboxietil) lisina.
  - CML = N<sup>ε</sup>-(Carboximetil) lisina.
  - COX III = citocromo c oxidasa III.
  - DBI = índice de dobles enlaces (*Double Bound Index*).
  - dG = deoxiguanosina.
  - ETS = cadena de transporte de electrones (*Electron Transport System*).
  - FISH = hibridación *in situ* con fluorescencia (*Fluorescence In Situ Hybridization*).
  - FMN = flavín mononucleótido.
  - GAPDH = gliceraldehido-3 P-dehidrogenasa.
  - GC/MS = cromatografía de gases/espectrometría de masas (*Gas Chromatography/Mass Spectrometry*)
  - Glut = glutamato.
  - GO = glucosa oxidasa.
  - GSA = semaldehido glutámico.
  - HACA = ácido 6-hidroxi-2-aminocaproico.
  - HAVA = ácido 5-hidroxi-2-aminovalérico.
  - H MV = ácido homovanílico.
  - HPLC = cromatografía líquida de alta resolución.
  - HRPx = peroxidasa de rábano.
-

- LC ESI-QTOF MS = cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo mas tiempo de vuelo con ionización por *electrospray*.
  - LEP = potencial energético vital.
  - Mal = malato.
  - MDA = malondialdehído.
  - MDAL = N<sup>ε</sup>-(Malondialdehído) lisina.
  - Metil-THF = metil-tetrahidrofolato.
  - MetSup = suplementación de metionina.
  - MYXO = mixotiazol.
  - MLSP = longevidad máxima (*Maximum Life Span Potencial*).
  - MUFA = ácidos grasos monoinsaturados (*MonoUnsaturated Fatty Acids*).
  - PI = índice de peroxidizabilidad.
  - Pir = piruvato.
  - pO<sub>2</sub> = presión parcial de oxígeno.
  - PUFA = ácidos grasos poliinsaturados (*PolyUnsaturated Fatty Acids*).
  - PUFAn-3 = ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3.
  - PUFAn-6 = ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 6.
  - RCI = índice de control respiratorio (*Respiratory Control Index*)
  - RD = restricción dietética.
  - RNAr 16S = RNA ribosómico 16S.
  - ROS = especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*).
  - Rot = rotenona.
  - RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*Real Time – Polymerase Chain Reaction*).
  - SAM = S-Adenosilmetionina
  - SAH = S-Adenosilhomocisteína.
  - SEM = error estandar de la media (*Standard Error of the Mean*)
  - SFA = ácidos grasos saturados (*Saturated Fatty Acids*).
  - SOD = superóxido dismutasa.
  - Succ = succinato.
  - TTFA = tenoiltrifluoracetona.
  - UFA = ácidos grasos insaturados (*Unsaturated Fatty Acids*).
  - VO<sub>2</sub> = consumo de oxígeno.
-

---

**ÍNDICE**

INTRODUCCIÓN.....	1
1.-ENVEJECIMIENTO.....	2
2.-TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO.....	5
3.-ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES.....	9
3.1.-Toxicidad del oxígeno.....	9
3.2.-Radicales libres.....	10
3.3.-Antioxidantes biológicos.....	14
4.-MITOCONDRIAS Y PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES.....	17
4.1.-La mitocondria.....	17
4.2.-Cadena de transporte de electrones mitocondrial.....	19
4.3.-Regulación de la tasa de consumo de oxígeno y de la producción de ATP mitocondrial.....	26
4.4.-Producción de radicales libres en la cadena de transporte de electrones mitocondrial.....	26
5.-DAÑO OXIDATIVO.....	30
5.1.-Daño oxidativo al ADN.....	30
5.2.-Daño oxidativo a lípidos.....	35
5.3.-Daño oxidativo a proteínas.....	39
6.-RESTRICCIÓN DIETÉTICA, ESTRÉS OXIDATIVO Y ENVEJECIMIENTO.....	41
7.-LA METIONINA Y SUS METABOLITOS.....	44
OBJETIVOS.....	48
MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
1.-DISEÑO EXPERIMENTAL.....	52
1.1.-Suplementación de metionina.....	52
1.1.1.-Suplementación de metionina en la dieta a largo plazo.....	52
1.1.2.-Suplementación de metionina y sus metabolitos <i>in vitro</i> .....	55
1.2.-Detección de secuencias de ADN mitocondrial en el ADN nuclear.....	57

---

---

2.-MATERIALES.....	58
2.1.-Equipo instrumental.....	58
2.2.-Productos químicos.....	60
2.3.-Animales de experimentación.....	63
3.-MÉTODOS.....	63
3.1.-Aislamiento de mitocondrias funcionales.....	63
3.1.1.-Hígado.....	63
3.1.2.-Corazón.....	65
3.1.3.-Cerebro.....	67
3.1.4.-Riñón.....	69
3.2.-Valoración de proteína mitocondrial.....	69
3.3.-Consumo de oxígeno.....	70
3.4.-Producción de radicales libres de oxígeno.....	73
3.5.-Fuga de radicales libres en porcentaje.....	75
3.6.-Determinación del daño oxidativo al ADN mitocondrial.....	75
3.6.1.-Aislamiento de ADN mitocondrial.....	76
3.6.2.-Determinación de la concentración de ADN de la muestra.....	78
3.6.3.-Digestión del ADN.....	78
3.6.4.-Condiciones cromatográficas.....	78
3.6.5.-Cálculo de las concentraciones de dG y 8-oxodG.....	79
3.7.-Composición de los ácidos grasos procedentes de los lípidos totales.....	80
3.7.1.-Preparación de las muestras.....	80
3.7.2.-Extracción de lípidos.....	80
3.7.3.-Condiciones cromatográficas.....	81
3.7.4.-Cálculo de los índices relacionados con la composición lipídica.....	81
3.8.-Determinación del daño oxidativo a proteínas.....	82
3.8.1.-Extracción de proteínas.....	82
3.8.2.-Síntesis de los estándares internos.....	83
3.8.3.-Análisis de AASA, CEL, CML, MDAL y GSA.....	84
3.8.4.-Condiciones cromatográficas.....	85
3.9.-Determinación de la concentración de los complejos I, II, III y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y de AIF.....	86
3.10.-Determinación de la concentración de metionina, S-adenosilmetionina y S-adenosilhomocisteína por LC ESI-QTOF MS.....	86

---

---

3.11.-Ensayos <i>in vitro</i> de metionina, S- adenosilmetionina, S-adenosilhomocisteína y homocisteína.....	88
3.12.-Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	89
3.12.1.-Aislamiento de núcleos.....	89
3.12.2.-PCR en tiempo real.....	91
3.13.-Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia .....	91
3.13.1.-Aislamiento de hepatocitos de rata.....	91
3.13.2.-FISH cuantitativo.....	92
3.14.-Métodos estadísticos.....	94
3.14.1.-Características muestrales.....	94
3.14.2.-Análisis estadísticos.....	95
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>96</b>
<b>1.-SUPLEMENTACIÓN DE METIONINA.....</b>	<b>97</b>
1.1.-Suplementación de metionina en la dieta a largo plazo.....	97
1.1.1.-Pesos de los animales.....	97
1.1.2.-Consumo mitocondrial de oxígeno.....	97
1.1.3.-Producción mitocondrial de radicales libres de oxígeno.....	102
1.1.4.-Fuga de radicales libres de oxígeno.....	109
1.1.5.-Daño oxidativo al ADN mitocondrial.....	111
1.1.6.-Composición de ácidos grasos de lípidos totales y parámetros globales.....	114
1.1.7.-Daño oxidativo a proteínas.....	124
1.1.8.-Concentración de metionina, SAM y SAH en tejido.....	128
1.1.9.-Concentración de los complejos I, II, III y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y de AIF.....	132
1.2.-Suplementación de metionina y sus metabolitos <i>in vitro</i> .....	135
1.2.1.-Consumo mitocondrial de oxígeno.....	135
1.2.2.-Producción mitocondrial de ROS.....	145
<b>2.-DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE ADN MITOCONDRIAL     EN EL ADN NUCLEAR.....</b>	<b>153</b>
2.1.-PCR en tiempo real.....	153
2.2.-Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia.....	154

---

DISCUSIÓN.....	157
1.-SUPLEMENTACIÓN DE METIONINA.....	158
2.-DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE ADN MITOCONDRIAL EN EL ADN NUCLEAR.....	178
CONCLUSIONES.....	183
BIBLIOGRAFÍA.....	186

---

# Introducción

## 1.- ENVEJECIMIENTO

Una de las primeras preocupaciones del hombre es la supervivencia y dado que el envejecimiento nos conduce a todos de una forma irremediable hacia la muerte, éste ha sido objeto de numerosos estudios desde diversos puntos de vista.

El envejecimiento es un fenómeno extraordinariamente complejo en el que se ven implicados gran variedad de procesos. Quizá por esta razón se han propuesto numerosas definiciones. En la presente tesis lo definiremos como la **acumulación progresiva de cambios con el tiempo, que hacen a los organismos más susceptibles al daño, disminuyendo sus posibilidades de supervivencia** (Harman, 1986; Masoro, 1996) **y su fertilidad** (Kirkwood & Austad, 2000).

El gerontólogo americano Strehler enunció en 1962 una serie de reglas para definir el fenómeno del envejecimiento. Según Strehler el envejecimiento es un fenómeno universal, intrínseco, progresivo y deletéreo.

La **universalidad** del envejecimiento hace referencia a la incidencia de dicho proceso en todos los individuos de una especie (Hayflick, 1998). Todos los individuos envejecen en la mayoría de las especies multicelulares, especialmente en aquellas que dejan de crecer al alcanzar el desarrollo adulto.

El envejecimiento es un fenómeno **intrínseco** porque las causas de este proceso tienen un origen interno. La velocidad de envejecimiento y por lo tanto la longevidad máxima de una especie están determinadas principalmente por factores internos y no por el ambiente. Aunque se proteja a un individuo de toda fuente de daño externa, éste seguirá envejeciendo. La prueba de esta regla se encuentra en la existencia de diferentes especies con distintas longevidades máximas que viven en el mismo ambiente.

El hecho de que el envejecimiento sea un fenómeno **progresivo** supone que las causas del proceso están presentes en los individuos a lo largo de toda su vida. Los procesos que causan el envejecimiento se desarrollan con una velocidad más o menos constante a lo largo de toda la vida de los individuos, desde etapas tempranas como la juventud, hasta etapas tardías como la senescencia. Un ejemplo de esta característica del

envejecimiento es el deterioro de ciertas capacidades fisiológicas máximas con la edad (la coordinación motora, el gasto cardíaco, la capacidad vital, entre otras), y por lo tanto el declive progresivo de la capacidad de responder frente al estrés, ya sea térmico, infeccioso o medioambiental (Kirkwood, 1997).

Por último, el envejecimiento es un proceso **deletéreo**, con un marcado carácter perjudicial para los organismos. Los efectos deletéreos se aprecian más claramente en células postmitóticas, como neuronas o cardiomiocitos (Miquel, 1980), que en aquellas que se dividen continuamente, como ocurre con los enterocitos intestinales.

En la actualidad poseemos un conocimiento profundo del funcionamiento molecular y fisiológico de los seres vivos. Sabemos que algunos individuos envejecen a mayor velocidad que sus congéneres y que algunas especies presentan una mayor longevidad que otras. Sin embargo, no hemos sido capaces de desentrañar los mecanismos que causan y regulan el envejecimiento y que por lo tanto determinan la longevidad.

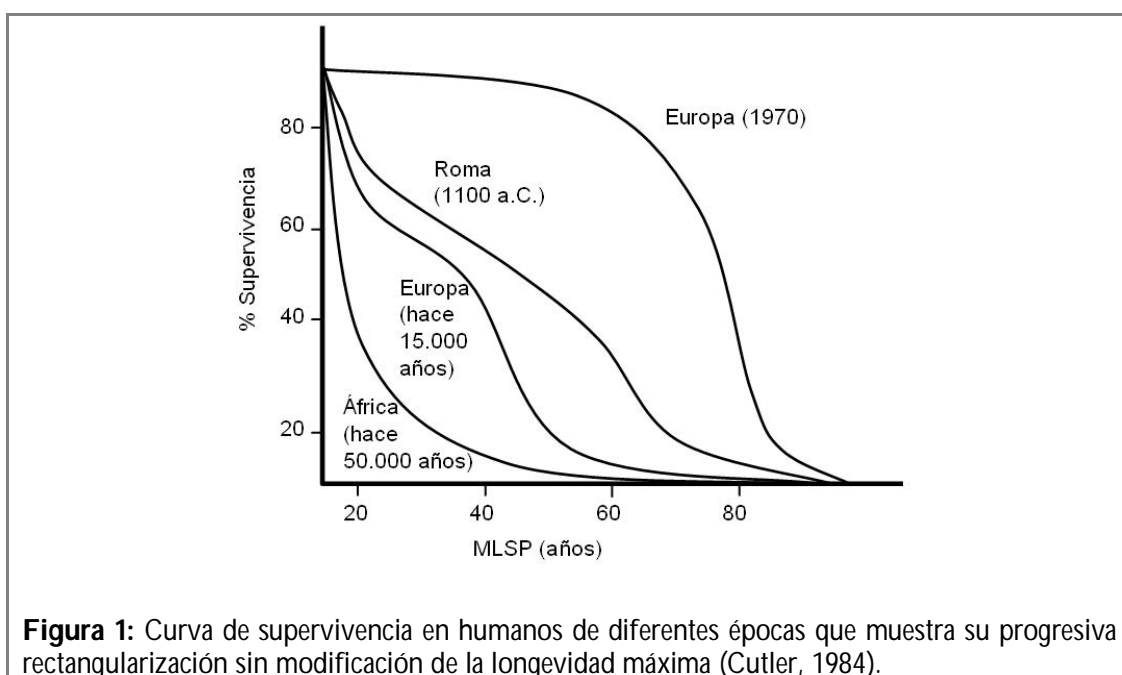
Existen dos conceptos relacionados con el envejecimiento que en ocasiones se confunden. La longevidad media y longevidad máxima son términos ligados, pero diferentes (Barja, 1996; 2000).

La **longevidad media** o **esperanza de vida** se refiere al número promedio de años que un individuo puede llegar a vivir por pertenecer a una población específica. La longevidad media va a estar determinada en gran medida por factores externos, va a depender del ambiente en el que vive dicha población. Es esta longevidad media la que en el caso de los seres humanos se ha incrementado notablemente a lo largo de la Historia en los países desarrollados, y por ello, no tiene la misma esperanza de vida un individuo nacido en Europa que uno nacido en países subdesarrollados.

La **longevidad máxima (MLSP, *Maximum Life Span Potential*)** representa el número máximo de años que puede vivir un individuo por pertenecer a una especie determinada. La longevidad máxima viene determinada por el genoma, por lo que es constante y característica de cada especie. De este modo, la longevidad máxima de los individuos nacidos en Europa y África es la misma (unos 120 años) por pertenecer a la misma especie, mientras que la longevidad máxima de la rata (unos 4 años) es distinta

porque pertenece a una especie diferente. La longevidad máxima correlaciona con la resistencia a los procesos generales de envejecimiento y es inversamente proporcional a la velocidad máxima de envejecimiento de las especies (Cutler, 1984).

En el caso concreto de la especie humana, se puede observar que las mejoras en las condiciones de vida desde los tiempos de nuestros antepasados han propiciado un incremento de la longevidad media, y por tanto una rectangularización de las curvas de supervivencia en los países desarrollados (figura 1). Sin embargo, el aumento de la supervivencia proporcionado por las mejoras sanitarias y en la alimentación no ha modificado la longevidad máxima. Durante la Edad Media también había individuos centenarios, aunque el porcentaje de los mismos respecto a la población general era mucho menor que el actual. Irónicamente esta rectangularización de la curva de supervivencia es la responsable de que en las sociedades occidentales desarrolladas haya cambiado la proporción de individuos jóvenes frente a individuos ancianos generando una serie de problemas sanitarios y socioeconómicos, causados por la inversión de la pirámide poblacional. Estos problemas han surgido porque al incrementarse la longevidad media y no la máxima, han aumentado solo los años de vida en los que el individuo presenta unas funciones físicas y fisiológicas reducidas y/o deterioradas.



## 2.- TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento ha sido objeto de numerosos estudios desde distintos puntos de vista que han desembocado en la generación de diversas teorías que tratan de explicar este fenómeno. Clasificar estas teorías resulta difícil porque además algunas solapan entre sí.

Englobaremos las teorías que tratan de explicar el envejecimiento en dos grandes grupos: **teorías de envejecimiento genéticamente programado** y **teorías de envejecimiento por acumulación de errores o daño (teorías estocásticas)**.

Las **teorías de envejecimiento genéticamente programado** proponen que el proceso de envejecimiento, al igual que el desarrollo, es un programa de sucesos codificados en el genoma que conducen a un determinado fin a una velocidad determinada en cada especie, que en el caso del envejecimiento sería el deterioro de las capacidades fisiológicas y en último extremo la muerte.

Estas teorías se apoyan en la existencia de determinadas poblaciones con una longevidad específica, que además es hereditaria y de animales modificados genéticamente que presentan un incremento en su longevidad, como por ejemplo los animales *knockout* para la adenilato ciclasa 5 (Yan *et al*, 2007) o para la hormona de crecimiento (Flurkey *et al*, 2001). También son avaladas por la existencia de enfermedades genéticas, como el síndrome de Werner y el síndrome de Hutchinson-Gilford, que producen un envejecimiento acelerado y que prueban que la alteración de ciertos genes puede conducir a un envejecimiento prematuro (Knight, 1995; Goto, 1997; Martin & Oshima, 2000; Puzianowska-Kuznicka & Kuznicki, 2005). Sin embargo, estas enfermedades genéticas mimetizan un envejecimiento acelerado que parece estar más cercano a la autodegradación que se produce en algunas especies de salmones tras el desove, que a un envejecimiento progresivo.

Las teorías que se centran en la reducción progresiva de la longitud de los telómeros también se engloban en este grupo. La **teoría telomérica** (Olovnikov, 1971) postula que el acortamiento de los telómeros en el ADN nuclear tras cada periodo de replicación del ADN, es el causante del proceso de envejecimiento. Dicho acortamiento podría producir el cese de la división celular. Sin embargo, esta teoría sólo explicaría el envejecimiento de

los tejidos mitóticos, dejando sin explicar el envejecimiento de los tejidos postmitóticos, como el nervioso y el muscular.

Las **teorías de envejecimiento por acumulación de errores o daño (teorías estocásticas)** proponen que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de errores o daño a lo largo de la vida, debido a que los sistemas de reparación y mantenimiento no poseen una eficacia del 100 %. Esta acumulación de daño sería responsable de la disminución de las capacidades fisiológicas, que en último extremo conduciría a la muerte.

Dentro de este grupo de teorías tenemos, por ejemplo, la **teoría del error catastrófico** (Orgel, 1963), que propone que errores en el proceso de transcripción y traducción del material genético producirían la generación de proteínas erróneas, que a su vez producirían más errores en la síntesis de proteínas. Así pues, se entraría en un círculo vicioso que conduciría a la degeneración de las funciones celulares y al final a la muerte. Aunque actualmente esta teoría se encuentra descartada por falta de evidencias, fue la primera teoría que centró el origen del envejecimiento en el metabolismo.

En 1954 Rebeca Gershan relacionó por primera vez la toxicidad del oxígeno con los radicales libres. Apoyándose en este descubrimiento Denham Harman formuló en 1956 la **teoría de envejecimiento por radicales libres**, que en la actualidad es la más aceptada por la comunidad científica. Esta teoría postula que los radicales libres producidos durante la respiración aerobia a una tensión normal de oxígeno son los responsables de la acumulación de daño que se produce durante el envejecimiento, y que en último término conduce a la muerte del individuo.

Originariamente esta teoría pertenecía al grupo de las teorías estocásticas, ya que los radicales libres serían los responsables de la generación del daño que se acumula durante el envejecimiento. Sin embargo, actualmente se encuentra entre ambos grupos de teorías, debido a que los datos que manejamos parecen indicar que el ritmo de acumulación de daño estaría determinado genéticamente.

En 1969 se produjo el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD) por McCord y Fridovich, lo que constituyó el primer apoyo experimental importante para la teoría.

La teoría de envejecimiento por radicales libres fue completada por el propio Harman en 1972, afirmando que la generación de los radicales libres de oxígeno responsables del envejecimiento ocurría *in vivo* como subproducto del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Existiría una fuga porcentual de radicales libres (% FRL, *percent Free Radical Leak*) en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Barja *et al*, 1994a), de forma que una pequeña proporción de los electrones que entran en la cadena de transporte acaba produciendo la reducción incompleta del oxígeno molecular, y por lo tanto generando radicales libres (Boveris & Chance, 1973).

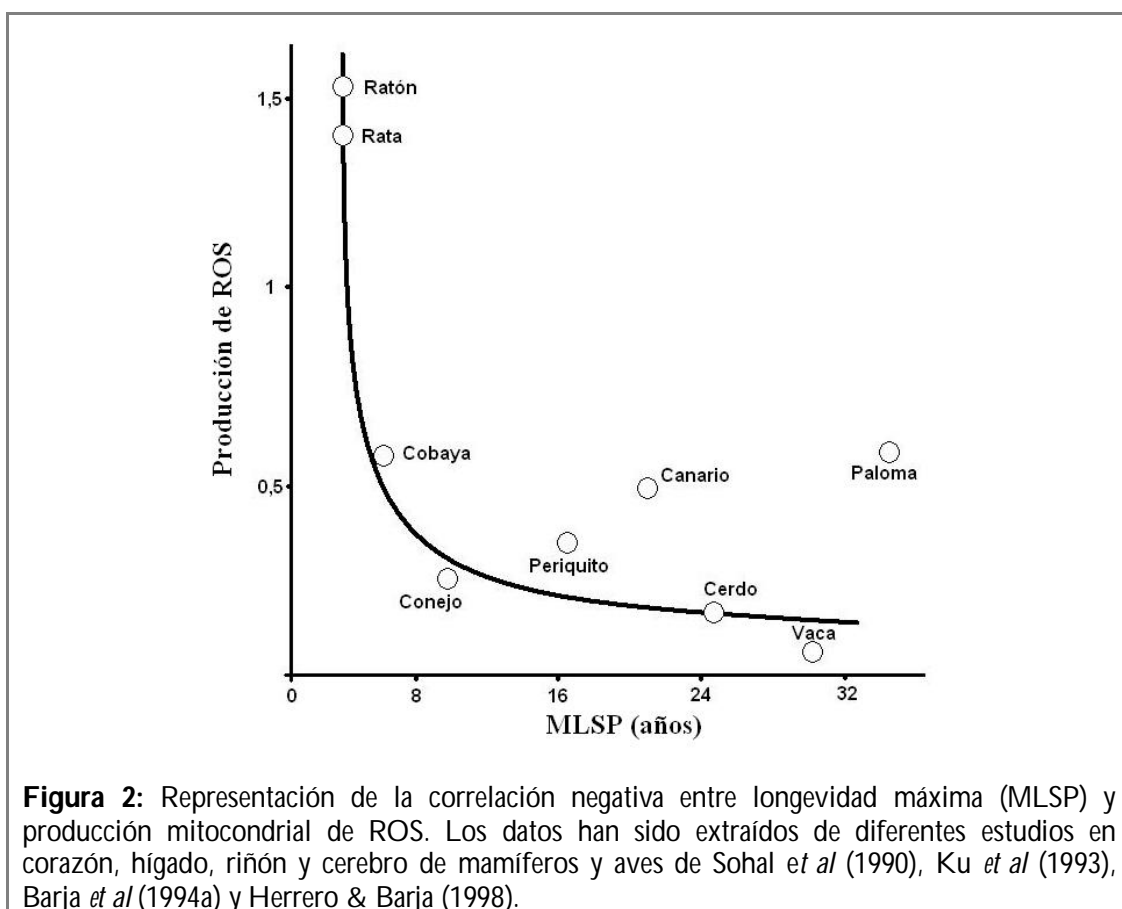
Por otro lado, en los años 20 y después de la descripción inicial de Rubner (Rubner, 1908) relacionando la tasa metabólica con la longevidad máxima, se propuso la **teoría de la velocidad de vida (*rate of living theory*)** según la cual, existiría una correlación inversa entre la tasa metabólica y la longevidad máxima (Pearl, 1928); cuanto mayor sea la tasa metabólica de un animal, menor será su longevidad máxima. La mayor parte de los mamíferos procesan la misma cantidad total de energía por gramo de tejido durante toda su vida. Esta cantidad es lo que se ha llamado su potencial energético vital (LEP) (Cutler, 1984) y al ir disminuyendo se produciría el envejecimiento. Las especies con una tasa metabólica mayor “vivirían más rápido”, consumirían más rápido su LEP, por lo que tendrían una longevidad máxima menor.

La generación de radicales libres por parte de las células aerobias parece confirmar esta teoría y relaciona la tasa metabólica con la longevidad máxima. Sin embargo, dicha teoría no es válida para el conjunto de animales homeotermos ya que, las aves, los primates y los murciélagos, entre otros, presentan longevidades máximas mayores de las esperadas por su tasa metabólica y tamaño corporal y son capaces de combinar tasas metabólicas altas con longevidades máximas elevadas.

Los estudios en diversos órganos de paloma y de rata demostraron que la paloma presenta una menor producción y fuga porcentual de radicales libres en sus mitocondrias que la rata (Barja *et al*, 1994a; Herrero & Barja, 1997a,b). Dado que son especies con un tamaño corporal y una tasa metabólica similar, pero con una longevidad máxima 9 veces superior en el caso de la paloma (35 años frente a 4), estos estudios demostraron la importancia de los radicales libres en el proceso de envejecimiento y que la producción y la

fuga porcentual de radicales libres de oxígeno en la mitocondria son factores más importantes a la hora de determinar la longevidad máxima que el tamaño corporal y la tasa metabólica. Investigaciones posteriores en periquito, canario y ratón confirmaron que la producción mitocondrial de radicales libres y su fuga son mayores en mamíferos que en aves de similar tamaño y tasa metabólica y esto se relacionaría con su menor longevidad máxima (Herrero & Barja, 1998).

Existen numerosos estudios que demuestran que existe una relación entre la producción de radicales libres y la longevidad máxima (figura 2). Actualmente sabemos que la tasa de producción de radicales libres es propia de cada especie, independiente de la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial y constante a lo largo de la vida (Lopez-Torres & Barja, 2008a). Además, la tasa de producción de radicales libres correlaciona de forma inversa con la longevidad máxima de las especies, de forma que esta tasa es mayor en especies de vida corta que en especies longevas (Barja *et al*, 1994b; Lambert *et al*, 2007; Robert *et al*, 2007).



Todos estos estudios apoyarían la teoría de envejecimiento por radicales libres ya que, demostrarían que el principal determinante del envejecimiento sería la producción mitocondrial de radicales libres y no la tasa metabólica. De este modo, **los animales que presentan tasas de producción de radicales libres menores serán más longevos que aquellos que presentan tasas mayores, independientemente de la tasa metabólica.**

Actualmente se considera que los radicales libres son una de las principales causas del envejecimiento por su capacidad para dañar los tejidos, por su producción en los sistemas biológicos, y por la relación existente entre dicha producción y la longevidad máxima (Harman, 1972; Sohal & Weindruch, 1996; Barja, 2004a,b).

### **3.- ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES**

#### **3.1.- Toxicidad del oxígeno**

El oxígeno fue descubierto a finales del siglo XVIII (Priestley, 1775; Scheele, 1777) y prácticamente desde entonces pueden encontrarse referencias a su toxicidad. Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XIX cuando Paul Bert demostró de forma inequívoca la toxicidad del oxígeno y la universalidad de estos efectos tóxicos. Posteriormente, durante el siglo XX se realizaron diversos estudios sobre este tema comprobándose que esta toxicidad es particularmente intensa en los animales homeotermos, mientras que en los poiquilotermos esta toxicidad aumenta en paralelo a la temperatura ambiente. Estos trabajos parecían apoyar la existencia de una relación entre la toxicidad asociada al oxígeno y la tasa metabólica (Barja *et al*, 2005).

La inactivación de enzimas fue el primer mecanismo general propuesto para explicar la toxicidad del oxígeno. Se basaba en la capacidad que tendría el oxígeno, cuando se encuentra a altas presiones parciales, para oxidar los grupos tiólicos reducidos de las proteínas. De esta forma, se inactivarían las enzimas que dependieran de estos grupos para su función (Stadie & Haugaard, 1945). Sin embargo, aunque el mecanismo de inactivación enzimática se ha demostrado experimentalmente para algunas enzimas, no parece suficiente para explicar todas las alteraciones que genera el oxígeno en hiperbaria (Tjoe & Haugaard, 1972).

La teoría de los radicales libres fue propuesta por Rebeca Gershman en 1954. Esta teoría postula que la toxicidad del oxígeno se debe a la formación de radicales libres generados por la reducción parcial o incompleta de la propia molécula de oxígeno (Gershman *et al*, 1954). Posteriormente se implicaría a la mitocondria como principal fuente de generación de radicales *in vivo*, relacionándola con el proceso de envejecimiento (Harman, 1956).

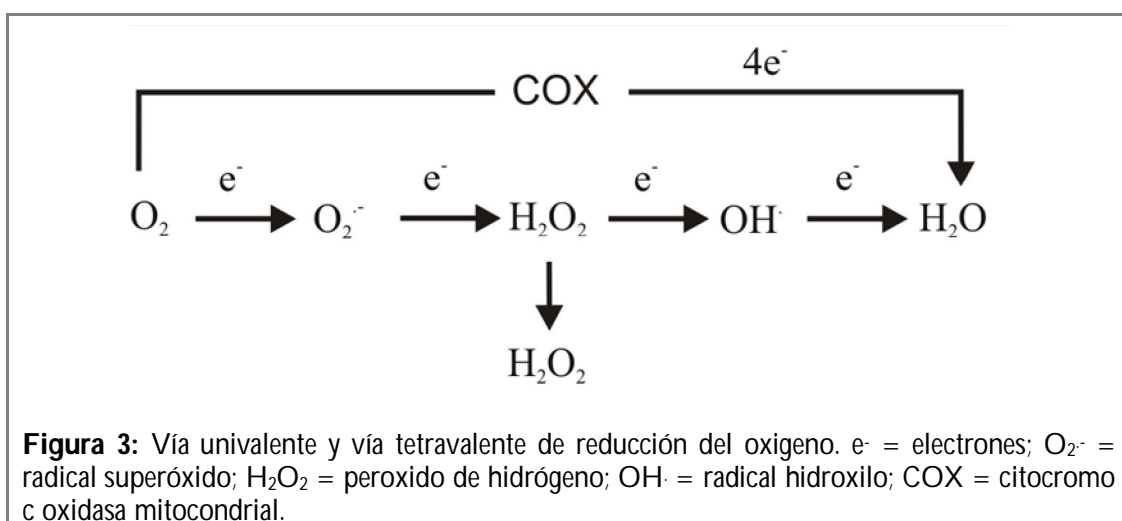
### 3.2.- Radicales libres

Un radical libre es un átomo o molécula que presenta al menos un electrón desapareado en su orbital más externo. Esta característica confiere a los radicales libres una capacidad electrófila muy acusada, por lo que reaccionarán fácilmente con grupos moleculares que presenten alta densidad electrónica, como los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados o los átomos de nitrógeno de los ácidos nucleicos y las proteínas.

A los radicales libres de oxígeno se les denomina también, especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Los radicales libres de oxígeno incluyen especies reactivas como el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ) o el radical peróxilo ( $HO_2\cdot$ ), así como otras moléculas que no son propiamente radicales libres como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

El oxígeno en estado basal presenta dos electrones desapareados con espines paralelos en su orbital más externo. Esta característica limita su capacidad para reaccionar con cualquier otro átomo o molécula pues precisa que ésta tenga dos electrones desapareados con espines paralelos entre sí y antiparalelos a los del oxígeno, lo que es poco frecuente. Por ello, el oxígeno acepta los electrones preferentemente de uno en uno, en lo que se denomina vía univalente de reducción del oxígeno (Figura 3).

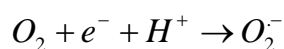
Los radicales libres de oxígeno producidos en los sistemas biológicos proceden del metabolismo del oxígeno por vía univalente (Boveris & Chance, 1972). De este modo, se genera el radical superóxido cuando el oxígeno recibe un electrón, el peróxido de hidrógeno cuando recibe dos y el radical hidroxilo cuando recibe tres electrones.



Aunque existen otras fuentes importantes de radicales libres de oxígeno, entre las que se encuentran el metabolismo peroxisomal de los ácidos grasos, las reacciones del citocromo P-450 y las células fagocíticas. Las mitocondrias son la principal fuente de radicales libres en los tejidos sanos, ya que consumen más del 90 % del oxígeno que utiliza la célula. En la cadena de transporte electrónico mitocondrial se produce la reducción tetravalente del oxígeno a agua catalizada por la enzima citocromo c oxidasa. Durante dicho transporte de electrones mitocondrial un pequeño porcentaje de oxígeno es reducido incompletamente (figura 3), generándose especies reactivas de oxígeno (ROS). Aproximadamente entre el 1 - 2 % del oxígeno consumido en las células se transforma en radicales superóxido por la autooxidación de transportadores electrónicos de la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris & Chance, 1973).

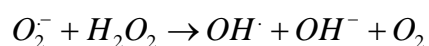
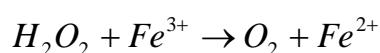
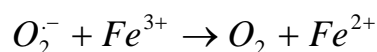
El propio oxígeno molecular en su forma triplete puede comportarse como radical libre, ya que tiene dos electrones desapareados con espines paralelos en su orbital más externo. Si se le proporciona suficiente energía, uno de estos electrones puede invertir su espín, generando el **oxígeno singlete** que posee una reactividad muy alta. Este oxígeno singlete es muy inestable y su vida media es muy corta cuando está en medios hidrofílicos, sin embargo, su vida media se incrementa en medios hidrofóbicos, lo que le permite participar en procesos de peroxidación lipídica.

Cuando el oxígeno acepta el primer electrón en la vía de reducción univalente se genera el **radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )**:



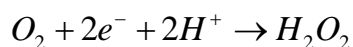
Esta reacción está catalizada por varias enzimas como por ejemplo, la xantina oxidasa, las peroxidasas y por los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. La autooxidación de formas reducidas de algunas biomoléculas presentes *in vivo* como la hemoglobina, la mioglobina, los citocromos, las catecolaminas, entre otras, puede generar también este radical.

El comportamiento químico del radical superóxido depende de las características del medio en el que se encuentre. Incluso se ha llegado a proponer que pudiera ser un mensajero intracelular (Saran & Bors, 1990). El radical superóxido no posee reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas, sin embargo, en presencia de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, y en combinación con el peróxido de hidrógeno, se produce el radical hidroxilo, que es mucho más dañino que el radical superóxido, por la **reacción de Haber-Weiss**:



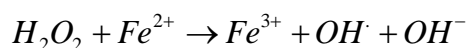
Por la protonación del radical superóxido se genera el **radical perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ )**. Aunque presenta gran capacidad para aproximarse a las macromoléculas por carecer de carga neta y tiene suficiente reactividad como para iniciar procesos de peroxidación lipídica (de Grey, 1999), su papel en el daño oxidativo no ha sido estudiado en profundidad (de Grey, 2002).

El **peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** se genera cuando el oxígeno acepta dos electrones (reducción divalente del oxígeno):



Existen varias enzimas capaces de reducir el oxígeno de forma divalente como, la urato oxidasa, acil-CoA oxidasa, NADH oxidasa, glutatión oxidasa y el sistema xantina/xantina oxidasa, entre otras (Sies & Cadenas, 1983).

El peróxido de hidrógeno no es en realidad un radical libre y aunque puede inactivar enzimas directamente oxidando grupos tiólicos esenciales, es muy estable y poco reactivo. Sin embargo, al igual que sucede con el radical superóxido, en presencia de metales de transición, el peróxido de hidrógeno se descompone generando el radical hidroxilo de elevada reactividad, en la que se conoce como **reacción de Fenton**:



El **radical hidroxilo (OH·)** se genera principalmente por la reacción de Fenton y de Haber-Weiss. Ambas reacciones necesitan la presencia de metales de transición como el hierro y el cobre para producirse. Por ello, estos metales que además son los más abundantes en los sistemas biológicos, van a ser importantes moduladores del daño oxidativo (Barja *et al*, 2005).

El radical hidroxilo es altamente reactivo, puede reaccionar de forma inespecífica con cualquier molécula a una distancia de hasta 2 ó 3 diámetros moleculares de su lugar de formación y no es capaz de difundir muy lejos de su punto de generación.

Sin embargo, el radical superóxido y especialmente el peróxido de hidrógeno por su menor reactividad y gran estabilidad son capaces de difundir lejos de su lugar de formación y generar el radical hidroxilo en cualquier localización celular mediante las reacciones ya comentadas. De esta forma, el radical hidroxilo puede atacar a casi cualquier molécula celular, provocar la aparición de mutaciones (Ames *et al.*, 1982), dañar las membranas celulares o inactivar gran variedad de enzimas.

### 3.3.- Antioxidantes biológicos

La continua producción de radicales libres de oxígeno por el metabolismo aerobio celular hace necesaria la existencia de mecanismos antioxidantes endógenos para proteger a las células del estrés oxidativo y mantener la homeostasis celular. Estas defensas antioxidantes se han seleccionado y conservado durante la evolución.

De los tres tipos principales de especies reactivas de oxígeno, radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, sólo existen enzimas detoxificadoras para neutralizar los dos primeros. Sin embargo, eliminando estos dos radicales libres se limita la formación del radical hidroxilo.

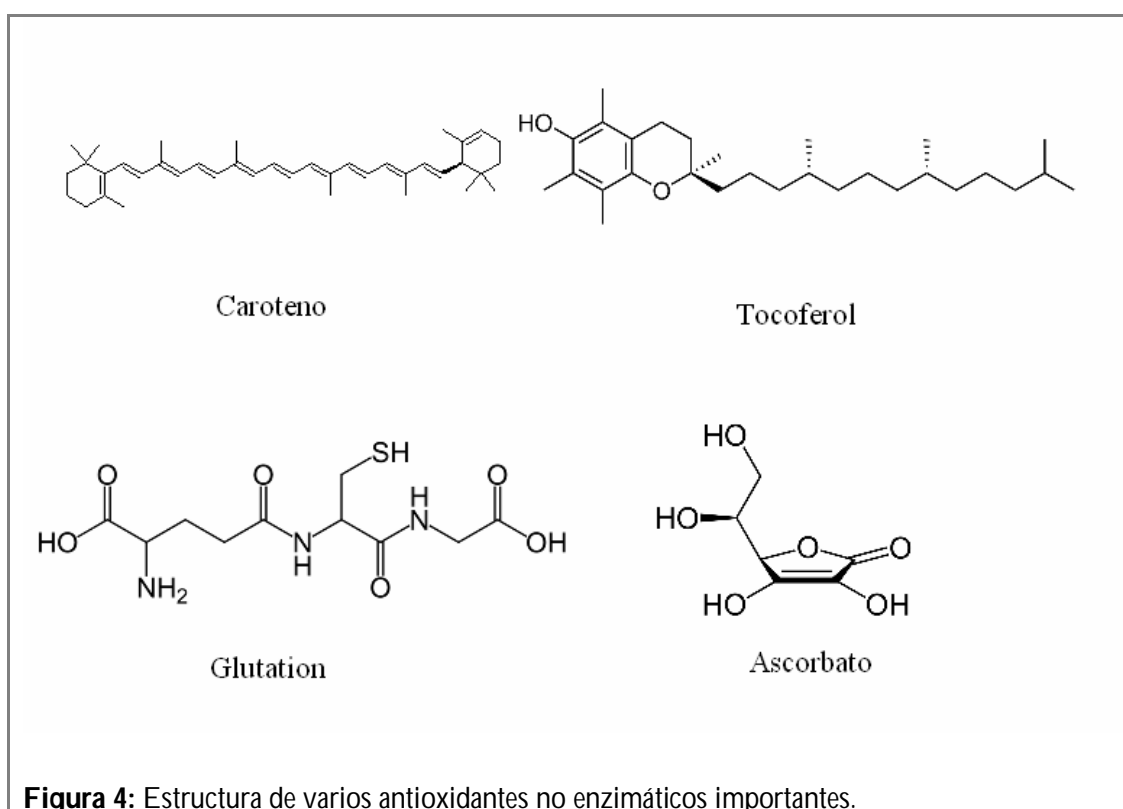
La **superóxido dismutasa (SOD)** descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969, es una enzima que presenta varias isoformas repartidas por los diferentes compartimentos celulares y que se encarga de eliminar el radical superóxido catalizando su dismutación para generar peróxido de hidrógeno y oxígeno.

La **catalasa** es una enzima encargada de eliminar el peróxido de hidrógeno. La velocidad de descomposición del peróxido de hidrógeno por la catalasa es alta cuando la concentración del mismo es elevada. Por el contrario, cuando la concentración de peróxido de hidrógeno es baja, la catalasa es poco efectiva al poseer una  $K_m$  muy alta y, por tanto, una baja afinidad por su sustrato.

La **glutation peroxidasa** ejerce una función complementaria a la de la catalasa, elimina el peróxido de hidrógeno producido regularmente por la célula, pero lo hace a baja velocidad y con una alta afinidad pues posee una  $K_m$  muy baja por sus sustrato, eliminando el peróxido de hidrógeno cuando éste se encuentra a baja concentración. Existen numerosos tipos de glutacion peroxidasa repartidos por los distintos compartimentos celulares, algunos de los cuales son dependientes de selenio (Behne & Kyriapoulos, 2001). En el transcurso de la reacción catalizada por esta enzima el glutacion reducido (GSH) se transforma en glutacion oxidado (GSSG). Este glutacion oxidado es reducido de nuevo por la actividad de la **glutation reductasa**, utilizando NADPH en el proceso.

Además de los antioxidantes enzimáticos, existen otros antioxidantes endógenos no enzimáticos. Estos últimos se consumen cuando neutralizan los radicales libres, sin embargo, al ser de bajo peso molecular pueden actuar en lugares donde no pueden acceder las enzimas. Los antioxidantes no enzimáticos más abundantes en la célula son el glutatión, el ascorbato, el tocoferol y los carotenoides (figura 4).

El **glutatión** es un antioxidante no enzimático hidrosoluble particularmente abundante en numerosos tejidos (Sies, 1999), y juega un papel central en el mantenimiento del balance redox en la célula al constituir una fuente principal de poder reductor de la misma.



El **ascorbato** es una molécula hidrosoluble sintetizada por la mayoría de los vertebrados. Algunas especies, el ser humano entre ellas, no son capaces de sintetizar esta molécula, por lo que deben ingerirla en la dieta. El ascorbato tras neutralizar los radicales libres, oxidándose en el proceso, puede recuperarse volviendo a reducirse por la actividad de las dehidroascorbato reductasas (Navas *et al*, 1994).

El **tocoferol** es el antioxidante lipofílico más abundante en células animales. Sus propiedades antioxidantes se basan en la capacidad reductora del grupo hidroxilo del anillo de cromanol. Como es liposoluble puede acceder a los grupos alcoxilos reduciéndolos a alcoholes lipídicos, y a los grupos peroxilos de los lípidos reduciéndolos a hidroperoxilos e inhibiendo de este modo la propagación de la peroxidación lipídica en cadena.

Los **carotenoides** son antioxidantes no enzimáticos lipofílicos de los que existen cientos de variedades diferentes, sin embargo sólo unos pocos están en concentraciones relevantes en tejidos y en plasma (Krinsky, 1993). Estos carotenoides tienen actividad antiinflamatoria (Schweigert, 2001), antimutagénica y anticarcinogénica, propiedades que pueden estar relacionadas con su capacidad antioxidante (Barja *et al*, 2005).

En el pasado se sugirió que los niveles de antioxidantes descendían con la edad, de forma que esta reducción determinaría el proceso de envejecimiento; sin embargo la idea fue descartada porque los estudios sobre la variación de los niveles de antioxidantes endógenos con la edad no encontraban un patrón claro y en muchos casos este descenso no se producía (Barja *et al*, 1992; Benzi & Moretti, 1995).

Los animales *knockout* para genes que codifican enzimas antioxidantes presentan diferentes patologías pero su longevidad máxima no parece estar afectada (Muller *et al*, 2004a; Sanz *et al*, 2006d). Por otro lado, el aumento de los niveles de antioxidantes mediante suplementación en dieta (Harris *et al*, 1990), inducción farmacológica (Lopez-Torres *et al*, 1993a) o mediante técnicas transgénicas (Mockett *et al*, 1999; Jaarsma *et al*, 2000; Huang *et al*, 2000) no incrementa dicha longevidad máxima. Sin embargo, es frecuente que estos incrementos en los niveles de antioxidantes aumenten la longevidad media, mostrándose eficientes en la prevención de la muerte prematura, y por lo tanto incrementando la supervivencia. Así pues, las enzimas antioxidantes son importantes para evitar la muerte prematura de los individuos, sobre todo en poblaciones que viven en condiciones subóptimas y que no poseen curvas de supervivencia rectangularizadas (Barja *et al*, 2005).

Por otro lado se sabe que los niveles de antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como no enzimáticos, correlacionan negativamente con la longevidad máxima (Perez-Campo *et al*, 1998). Los animales más longevos presentan niveles más bajos de

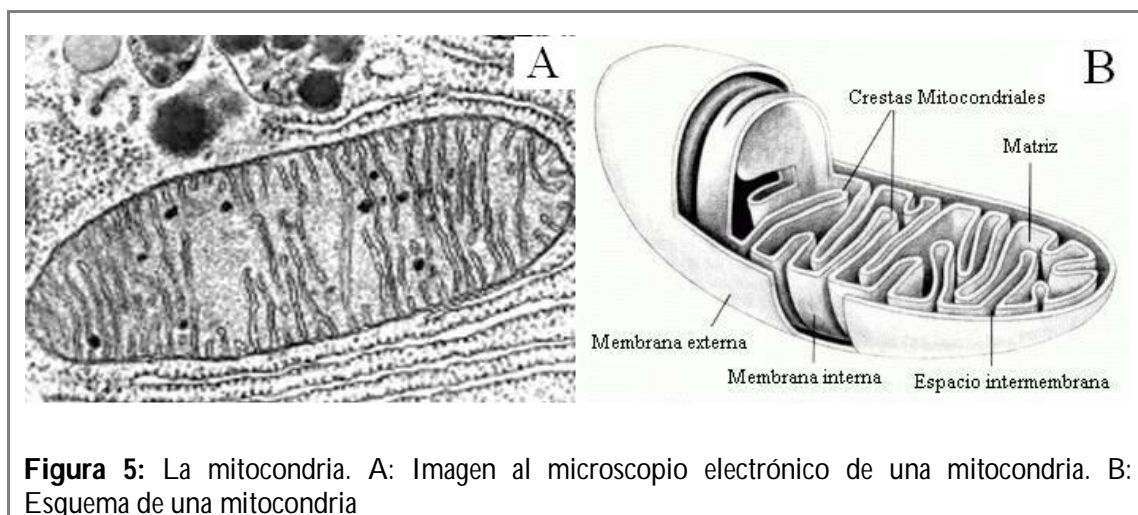
antioxidantes que los animales de vida corta porque su producción de radicales libres es menor. Así pues, la reducción de la producción de radicales libres representaría un método mucho más eficiente para reducir el daño oxidativo que el incremento en los niveles de antioxidantes. (Pamplona & Barja, 2007). Esta correlación negativa es una evidencia importante, aunque indirecta, de que la producción de radicales libres *in vivo* en condiciones basales debe de ser menor en especies animales longevas que en las de vida corta (Lopez-Torres *et al*, 1993b; Barja *et al*, 1994a, Perez-Campo *et al*, 1998).

## **4.- MITOCONDRIAS Y PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES**

La teoría más aceptada sobre el origen de la mitocondria es la teoría endosimbiótica (Margulis, 1970) según la cual, en algún momento en el pasado, una célula procariota que sería capaz de obtener energía de los nutrientes orgánicos empleando el oxígeno molecular como oxidante, fue fagocitada o entró en otra célula que habría desarrollado algunas de las características de las células eucariotas. Al no ser digerida inmediatamente, la célula procariota fue capaz de formar una simbiosis permanente con la célula hospedadora ofreciéndole un suministro de energía en forma de ATP, mientras que recibía un medio estable y rico en nutrientes de su célula hospedadora. Con el tiempo, esta célula procariota pasó a formar parte de la que llegaría a ser la célula eucariota convirtiéndose en la mitocondria.

### **4.1.- La mitocondria**

Las mitocondrias son estructuras muy plásticas que se dividen y fusionan constantemente, aunque normalmente presentan una forma alargada con un tamaño que oscila entre 0,5 y 7  $\mu\text{m}$  (figura 5). Se las conoce como los “generadores de energía” de la célula debido a que producen la mayor parte del suministro de ATP de la misma. Sin embargo estos orgánulos también están implicados en otros procesos importantes para la célula como la apoptosis o muerte celular programada, la señalización y la diferenciación de la célula, así como el control del ciclo y del crecimiento celular (McBride *et al*, 2006).



**Figura 5:** La mitocondria. A: Imagen al microscopio electrónico de una mitocondria. B: Esquema de una mitocondria

Las mitocondrias presentan dos membranas (membrana externa e interna) que a su vez delimitan dos compartimentos (espacio intermembrana y matriz mitocondrial).

La **membrana externa** es una bicapa lipídica que rodea toda la mitocondria y es permeable a iones, metabolitos y muchos polipéptidos gracias a unas proteínas denominadas porinas que permiten el paso a favor de gradiente de grandes moléculas de hasta 10 kDa.

Por su parte la **membrana interna** es una bicapa lipídica impermeable a la mayoría de las moléculas, especialmente a los iones. Sin embargo, contiene muchos sistemas de transporte transmembrana que permiten el paso de distintas moléculas como, ácidos grasos, piruvato, ADP, ATP, e incluso agua. La membrana interna presenta además numerosas invaginaciones denominadas crestas mitocondriales, por lo que el área de su superficie es mucho mayor que la de la membrana externa. La membrana interna contiene numerosas proteínas, como las integrantes de los complejos de la cadena de transporte electrónico.

El **espacio intermembrana** es el espacio que queda delimitado entre la membrana interna y la membrana externa. Cuando la cadena de transporte de electrones está funcionando se produce un bombeo de protones que genera un gradiente electroquímico entre esta cavidad y la matriz mitocondrial, el cual será aprovechado por la ATP-sintasa para generar ATP a partir de ADP.

La **matriz mitocondrial** es el espacio rodeado por la membrana interna. En ella tienen lugar numerosas reacciones de rutas metabólicas importantes como, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (o ciclo de Krebs), la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, el ciclo de la urea y el catabolismo de los aminoácidos. Además contiene el ADN y la maquinaria de biosíntesis proteica mitocondrial.

Aunque parte de las proteínas mitocondriales se codifican en el ADN del núcleo de la célula, la mitocondria tiene su propio genoma que muestra muchas semejanzas con los genomas bacterianos (Andersson *et al*, 2003).

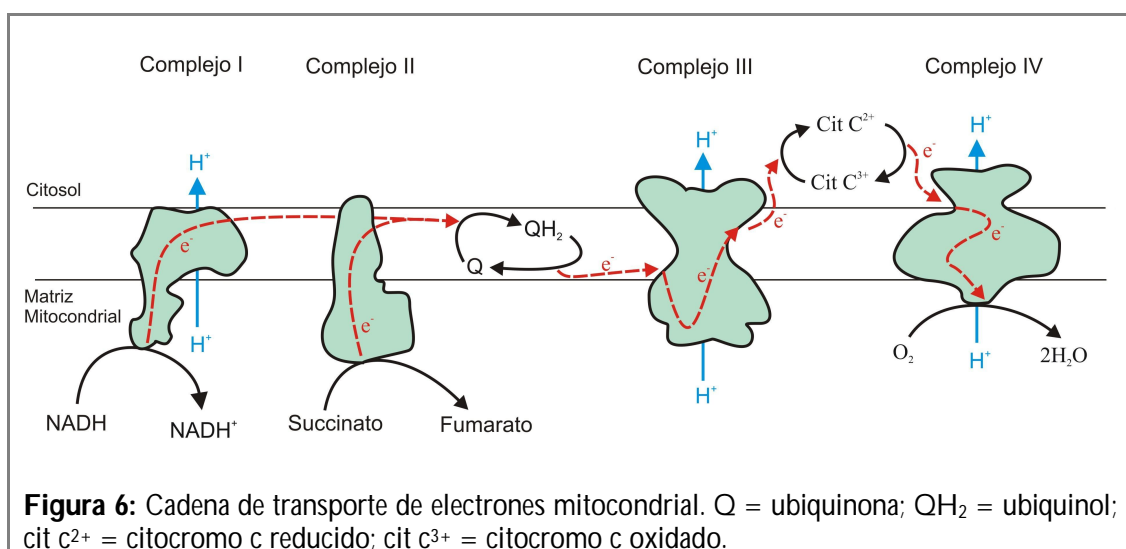
Al conjunto de las mitocondrias de la célula se le denomina condrioma celular. El número de mitocondrias por célula varía dependiendo de las necesidades energéticas de la misma, distintos tipos celulares tendrán distinto número de mitocondrias en función del papel que desempeñen. Del mismo modo, las mitocondrias no presentan una distribución uniforme en el citosol, parece que se sitúan en las zonas donde el requerimiento energético es mayor, de forma que el ATP llegue más rápidamente a donde sea necesario.

## **4.2.- Cadena de transporte de electrones mitocondrial**

La principal fuente de radicales libres en células sanas es la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Está formada por 4 complejos multiproteicos: el complejo I o NADH deshidrogenasa, el complejo II o succinato deshidrogenasa, el complejo III o ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa, y el complejo IV o citocromo c oxidasa. La coenzima Q y el citocromo c también forman parte de esta cadena de transporte de electrones conectando los complejos multiproteicos entre sí (figura 6). Todos estos elementos de la cadena de transporte de electrones se localizan en la membrana mitocondrial interna y están compuestos por cuatro tipos de moléculas: citocromos, centros ferro-sulfurados, quinonas y flavinas.

Tanto los transportadores electrónicos como los complejos multiproteicos están organizados en "ensamblajes" con interacciones específicas proteína-proteína, que permiten la transferencia rápida de electrones gracias a las reducidas distancias intermoleculares entre ellas (Chance & Williams, 1956). Los complejos I, III y IV

interaccionan para formar supercomplejos con una composición estequiométrica definida tanto en mitocondrias de levaduras y plantas superiores como de mamíferos.



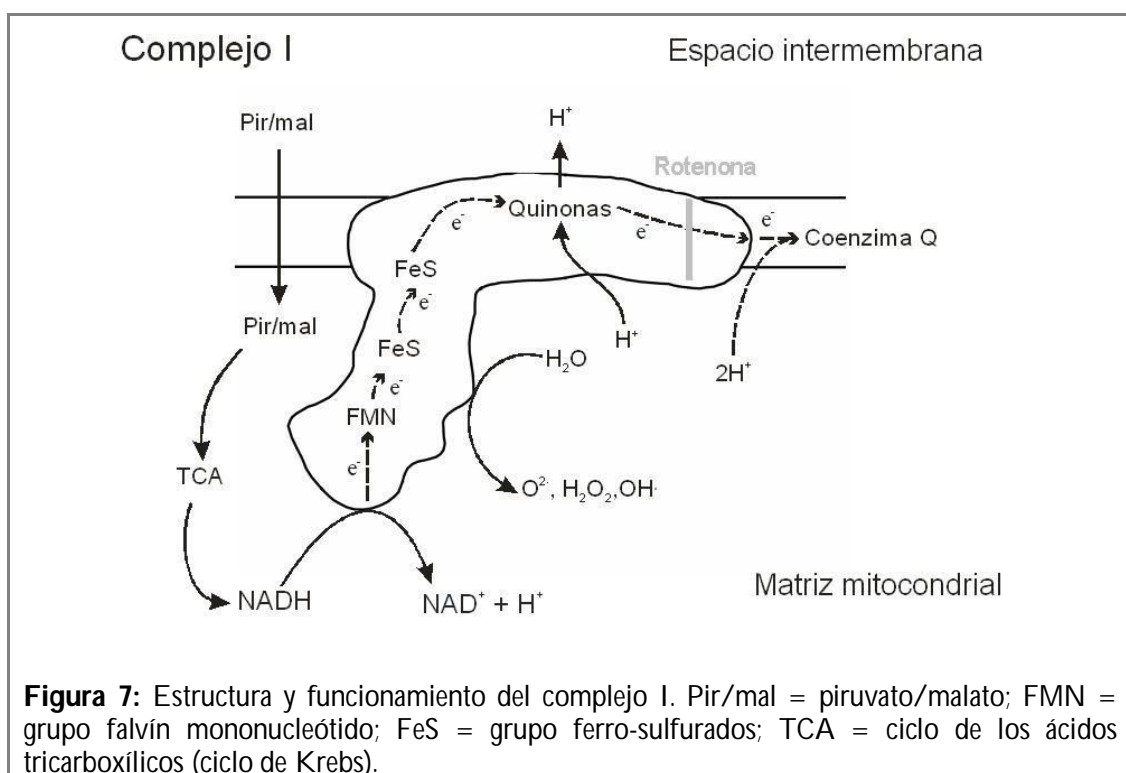
La cadena de transporte de electrones se inicia con la cesión de electrones por parte del NADH al complejo I o del succinato al complejo II, y termina con la cesión de estos electrones al oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) por parte del complejo IV. Tanto el NADH como el succinato son generados en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que tiene lugar en la matriz mitocondrial.

Existen otros elementos de la cadena de transporte de electrones, a parte del complejo IV, capaces de ceder electrones al oxígeno molecular. Esta fuga de electrones puede producir la reducción incompleta del oxígeno molecular generando radicales libres (Muller, 2000).

El **complejo I o NADH deshidrogenasa** con sus 800-900 kDa (Speakman, 2003) es el complejo multiproteico más grande de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Está formado por unos 46 polipéptidos, de los cuales 7 están codificados por el ADN mitocondrial (Carroll *et al*, 2003, 2005). Estos polipéptidos se agrupan en dos brazos de tamaño desigual que forman una L (figura 7).

El brazo corto está 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 NADH deshidrogenasa. Dicho centro activo está constituido por un grupo flavín mononucleótido (FMN) y 9 centros ferro-sulfurados.

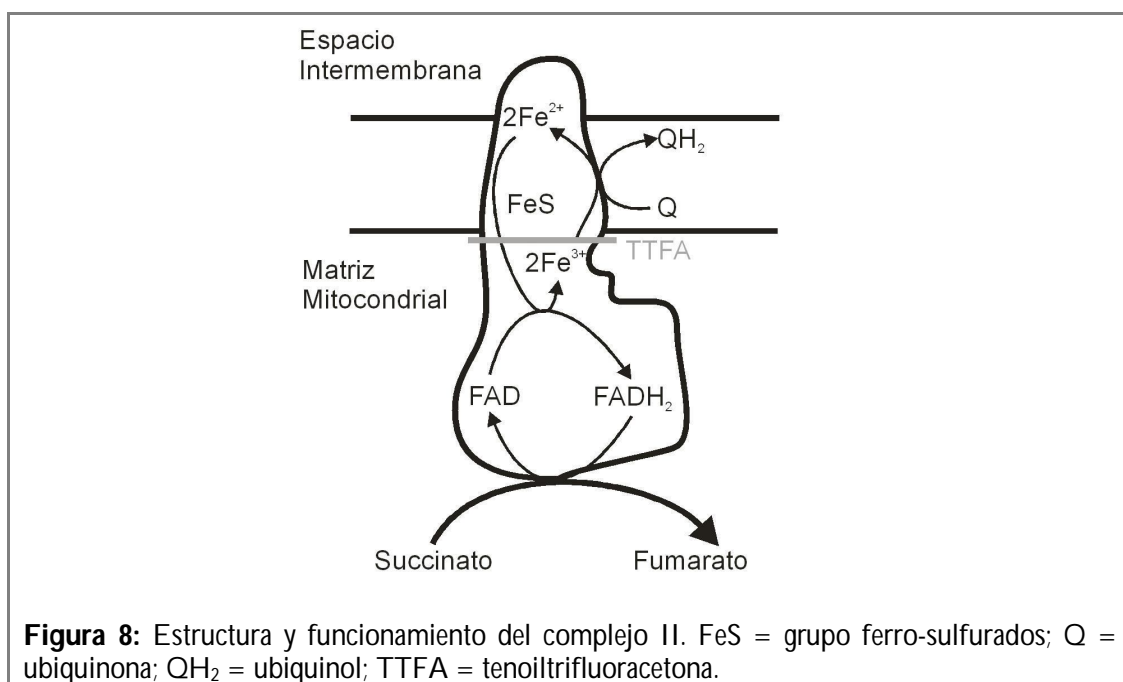


El brazo largo posee carácter hidrofóbico, está integrado en la membrana mitocondrial interna, y es donde se encuentra la maquinaria de bombeo de protones. Dicha maquinaria de bombeo constituye el centro I de acoplamiento energético y está formada por varias quinonas (Robinson, 1998) y por un centro ferrosulfurado. Este centro de acoplamiento bombea protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana y es por donde el complejo I cede electrones a la ubiquinona (Sazanov & Hinchliffe, 2006).

En la biogénesis y mantenimiento del complejo I participa el factor inductor de la apoptosis (AIF, *Apoptosis-Inducing Factor*), ya que las células deficientes en este factor presentan un menor contenido de complejo I (Vahsen *et al*, 2004). El factor inductor de la apoptosis es una proteína mitocondrial que, además de tener un papel importante en la apoptosis, se requiere para la fosforilación oxidativa en la mitocondria (Porter & Urbano, 2006).

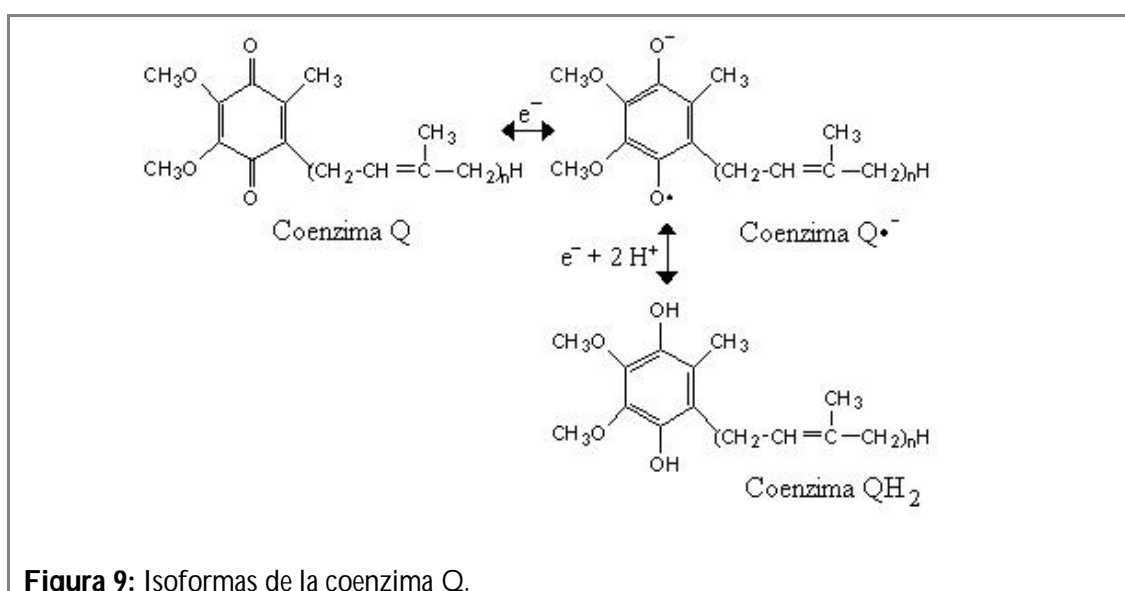
Existen varios inhibidores que pueden bloquear el flujo de electrones entre los diferentes transportadores electrónicos del complejo I (Herrero & Barja, 2000). Entre estos inhibidores destacaremos la **rotenona**, que bloquea la transferencia de electrones desde el último centro ferro-sulfurado a la ubiquinona, posiblemente actuando como análogo de la misma.

El **complejo II o succinato deshidrogenasa** es un gran complejo multiproteico cuyas cadenas polipeptídicas están codificadas en el ADN nuclear y se reparten en 4 grandes subdivisiones. Dos de estas subdivisiones forman la enzima succinato deshidrogenasa del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y las otras dos anclan el complejo a la membrana mitocondrial interna (Speakman, 2003). Este complejo interviene en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos transfiriendo electrones desde el succinato hasta el FAD, que se transformará en el  $\text{FADH}_2$  (figura 8). Estos electrones que recibe el  $\text{FADH}_2$  se transfieren posteriormente a la ubiquinona. El FAD está integrado en el complejo II, por lo que no difunde a la matriz mitocondrial.



Entre los inhibidores del flujo de electrones en el complejo II cabe destacar la **tenoiltrifluoracetona (TTFa)** que actúa mediante interacciones débiles con el hierro del último centro ferro-sulfurado del complejo (Tyler, 1992).

La **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 adaptada para transportar electrones desde los complejos I y II hasta el complejo III (Hinchliffe & Sazanov, 2005). Existen tres formas de la coenzima (figura 9) en la membrana interna mitocondrial: Ubiquinona (Q), semiquinona ( $Q\cdot^-$ ) y ubiquinol ( $QH_2$ ). La semiquinona posee un electrón desapareado y por ello puede cederlo con mucha facilidad. Si dicho electrón es cedido al oxígeno molecular se generarán radicales superóxido. La coenzima Q está en la forma transitoria de semiquinona cuando se encuentra unida al complejo I o especialmente cuando se encuentra ensamblada al complejo III (Mitchell, 1975; Brandt, 1997) durante el ciclo Q (Turrens *et al*, 1985).



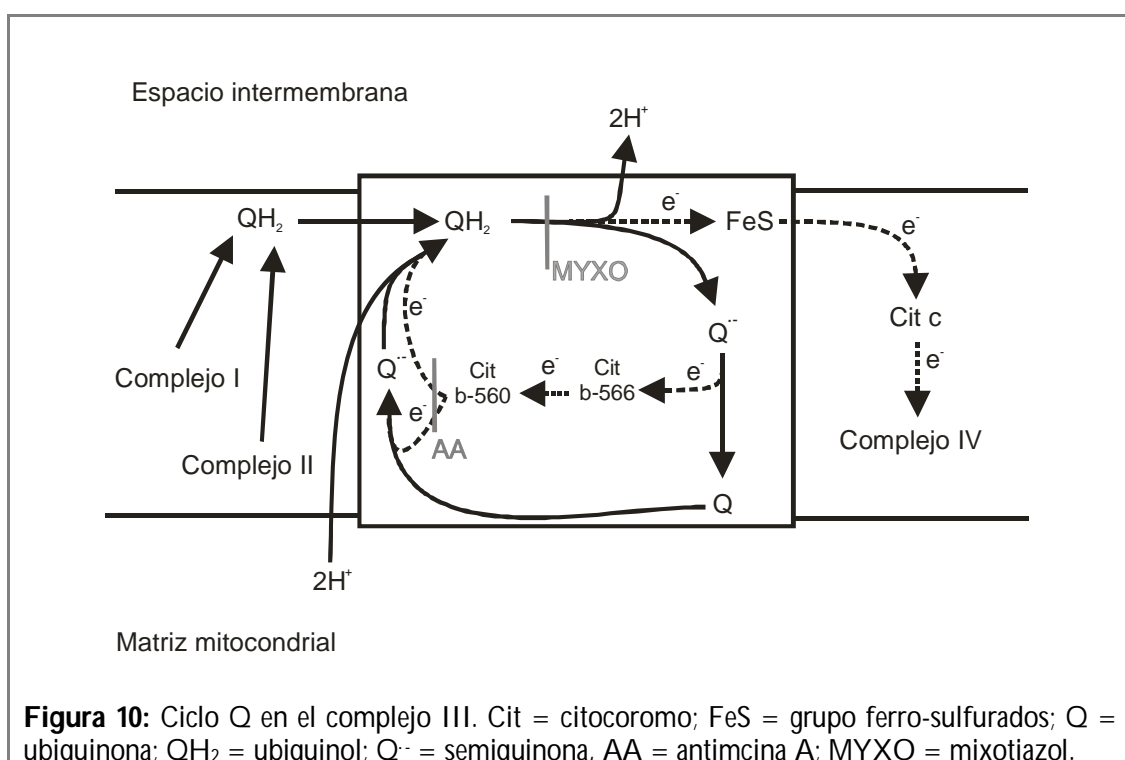
**Figura 9:** Isoformas de la coenzima Q.

El **complejo III o ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa** está compuesto por un centro ferro-sulfurado, denominado centro de Rieske, y por los citocromos  $c_1$  y  $b$ . Tanto el centro de Rieske como el citocromo  $c_1$  se codifican en el ADN nuclear, mientras que el citocromo  $b$  se codifica en el ADN mitocondrial (Zara *et al*, 2009).

En este complejo multiproteico tiene lugar el denominado ciclo Q, en el que la coenzima Q pasa por todas sus isoformas, especialmente por la forma semiquinona (Turrens *et al*, 1985), y los protones son bombeados desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (figura 10).

En el ciclo Q, el ubiquinol ( $QH_2$ ) cede dos electrones, un electrón al centro ferro-sulfurado y otro al citocromo  $b$ -566, liberando los protones al espacio

intermembrana durante el proceso. Este citocromo cederá a su vez el electrón a la ubiquinona (Q) o a la semiquinona ( $Q^-$ ) a través del citocromo b-560 (Trumpower, 1990). De este modo cuando la coenzima Q tiene de nuevo los dos electrones, adquiere otros dos protones de la matriz mitocondrial para transformarse otra vez en ubiquinol. Esta maquinaria permite al ciclo Q bombear protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, constituyendo el centro II de acoplamiento energético. El complejo III cede los electrones al citocromo c a través del centro ferro-sulfurado (figura 10) y el citocromo c a su vez los cederá al complejo IV.

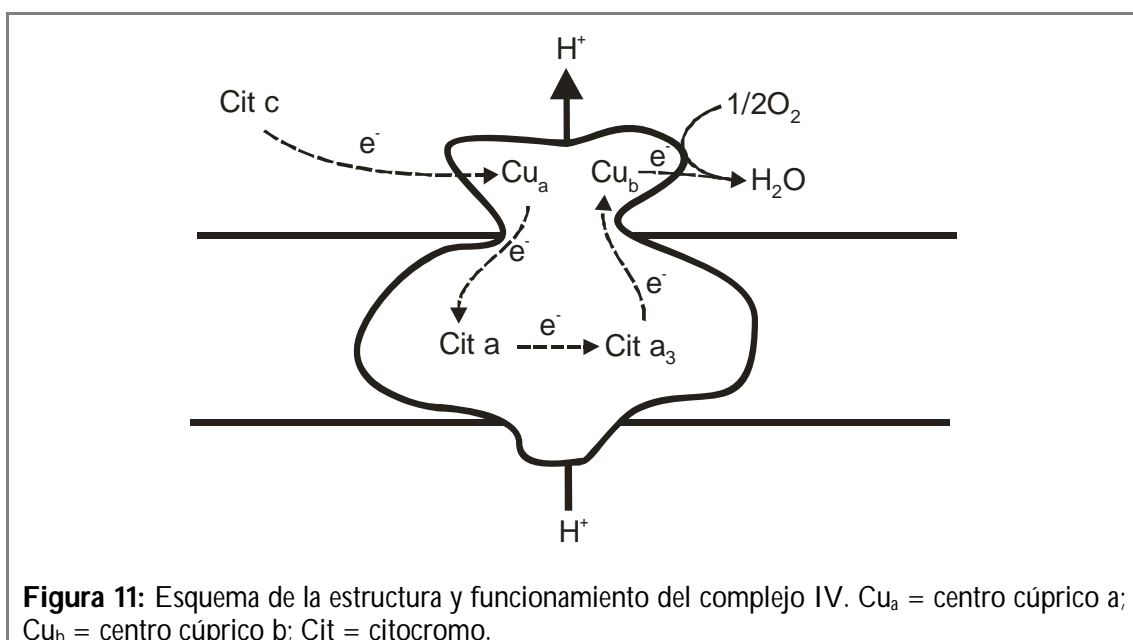


Entre los inhibidores que pueden bloquear el transporte electrónico en el complejo III se encuentran la antimicina A (AA) que impide el flujo desde el citocromo b-560 hasta la coenzima Q, y el mixotiazol (MYXO) que interrumpe el flujo desde el ubiquinol hasta el centro de Rieske (Turrens *et al*, 1985).

El **complejo IV o citocromo c oxidasa** es el último complejo multiproteico de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y se encarga de ceder los electrones al oxígeno molecular generando agua en el proceso.

Este complejo está formado por dos centros cúpricos ( $\text{Cu}_a$  y  $\text{Cu}_b$ ) y por dos citocromos (a y  $a_3$ ). Las unidades catalíticas del complejo están codificadas en el ADN mitocondrial, mientras que las estructurales lo están en el nuclear (Tyler, 1992).

El citocromo c cede los electrones al centro  $\text{Cu}_a$  del complejo IV. Este centro transfiere los electrones al citocromo a, el y de este pasan al citocromo  $a_3$ . Este último citocromo traspara los electrones al centro  $\text{Cu}_b$  que será el encargado de donarlos al oxígeno molecular (figura 11). El transporte electrónico a través de este complejo multiproteico genera un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana constituyendo el centro III de acoplamiento energético.



**Figura 11:** Esquema de la estructura y funcionamiento del complejo IV.  $\text{Cu}_a$  = centro cúprico a;  $\text{Cu}_b$  = centro cúprico b; Cit = citocromo.

El complejo IV tiene una alta afinidad por el oxígeno, por lo que es capaz de funcionar en condiciones de baja presión parcial de oxígeno ( $p\text{O}_2$ ). Además, se cree que la citocromo c oxidasa es la responsable de más del 90 % del consumo de oxígeno en los animales aerobios.

### **4.3.- Regulación de la tasa de consumo de oxígeno y de la producción de ATP mitocondrial**

Las necesidades energéticas celulares modulan tanto el consumo de oxígeno como la producción de ATP en la mitocondria. Así pues, cuando se elevan los niveles de ADP, también se eleva la tasa de ambos procesos (Navarro & Boveris, 2007).

Chance y Williams introdujeron en 1956 el concepto de estado metabólico mitocondrial. Estos investigadores definieron el **Estado 4** como “respiración controlada o en reposo”, ya que en este estado existe una disponibilidad de sustrato de la cadena de transporte electrónico pero no de ADP, y el **Estado 3** como “respiración activa”, ya que en este estado existe una disponibilidad tanto de sustrato como de ADP y en él se alcanza la tasa fisiológica máxima de consumo de oxígeno.

Considerando las tasas de consumo de oxígeno mitocondrial en ambos estados y el consumo de oxígeno de órganos perfundidos, se estimó que entre un 60 y un 70 % de las mitocondrias de mamíferos se encontraría normalmente en estado 4, mientras que el resto se encontraría en estado 3 (Boveris *et al*, 1999). Esto significa que, en condiciones basales, los tejidos de mamíferos solo utilizarían entre un 30 y un 40 % de su capacidad para producir ATP, dejando un amplio margen para satisfacer los incrementos de las necesidades energéticas.

### **4.4.- Producción de radicales libres en la cadena de transporte de electrones mitocondrial**

En la mitocondria se generan radicales libres cuando el oxígeno molecular recibe electrones de alguno de los transportadores de la cadena de transporte electrónico. Esta cesión de electrones depende de la accesibilidad del oxígeno molecular a los mismos y la tendencia del transportador a donarlos (Speakman, 2003).

El potencial redox determina la tendencia de un transportador a ceder electrones. Los valores negativos en el potencial redox indican una tendencia reductora, mientras que valores positivos indican una tendencia oxidante (Muller, 2000). Por lo tanto, cuanto

menor sea el valor del potencial redox, mayor será la tendencia de la molécula a ceder electrones. Así pues, para que se genere el radical superóxido a partir del oxígeno molecular es necesario que el donante de electrones tenga un potencial redox menor que la pareja  $O_2/O_2^{\cdot-}$ .

Según estas premisas, el complejo IV es el generador de radicales libres más probable ya que tiene una alta tendencia a donar electrones y es muy accesible al oxígeno molecular. Sin embargo, no se producen radicales libres en del complejo IV (Chance *et al*, 1979; Barja & Herrero, 1998) porque, en este complejo, el oxígeno se estabiliza en un centro de reacción bimetálico constituido por el átomo de cobre del centro  $Cu_b$  y el grupo hemo del citocromo  $a_3$ , lo que impide la formación de radicales libres (Yoshikawa *et al*, 1998). Por otro lado, el complejo II tampoco es un generador de radicales libres ya que los potenciales de oxidación de sus elementos son mayores que los del par  $O_2/O_2^{\cdot-}$ .

El complejo I (Barja, 1999a; Herrero & Barja, 2000; Gredilla *et al* 2001b; Kudin *et al*, 2005; Muller *et al*, 2008) y el complejo III (Boveris *et al*, 1976; Barja, 1999a; Kudin *et al*, 2005) serían los principales productores de radicales libres en la mitocondria. Esta conclusión se apoya en los estudios sobre generación de ROS en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y en los potenciales redox de sus elementos. Estos estudios han mostrado un marcado incremento de la producción de ROS tras el uso de inhibidores del transporte electrónico en estos dos complejos y también indican que cualquier alteración en la función de la cadena respiratoria, especialmente a nivel de estos complejos, podría ser muy dañina para la célula (Dufour & Larsson, 2004).

Nohl & Stolze (1992) propusieron que los citocromos b eran los generadores de radicales libres en el complejo III, sin embargo los estudios de Boveris *et al* (1976) y de Turrens *et al* (1985) indicaban que el responsable de la producción de radicales superóxido era la semiquinona generada en el *ciclo Q*. Actualmente, basándose en los datos experimentales, esta segunda opción es la más aceptada (Barja, 2001).

A pesar de que el complejo III es un importante generador de radicales libres, diversos estudios sugieren que **el productor de radicales libres fundamental en el proceso de envejecimiento es el complejo I** y que la importancia fisiológica de la generación de radicales libres por parte del complejo III es limitada (Hirst *et al*, 2008).

Además los datos de diversos trabajos indican que las especies de vida larga presentan menor producción de radicales libres que las de vida corta principalmente a nivel de complejo I (Barja & Herrero, 1998; Barja, 1999a). En este mismo sentido, en experimentos de restricción dietética, el descenso en la producción de radicales libres en mitocondrias de hígado y corazón se ha visto exclusivamente a nivel del complejo I (Gredilla *et al*, 2001b; Lopez-Torres *et al*, 2002).

Se han realizado diversos estudios para tratar de identificar el principal responsable de la generación de radicales libres dentro del complejo I. Algunos de estos estudios concluyen que los principales generadores de radicales libres en este complejo son las flavinas (Liu *et al*, 2002; Young *et al*, 2002; Kudin *et al*, 2004), otros que es el sitio de unión a la quinona (Lambert & Brand, 2004), y otros que son los centros ferro-sulfurados (Herrero & Barja, 2000; Genova *et al*, 2001; Kushnareva *et al*, 2002). Esta última posibilidad ha sido confirmada en cerebro de rata (Sanz *et al*, 2005) y de humanos (Kudin *et al*, 2004).

Parece que los radicales libres producidos en el complejo I se liberan hacia la matriz mitocondrial, debido a que la región hidrofílica del complejo donde se sitúan los centros ferro-sulfurados se orienta hacia dicha matriz (St-Pierre *et al*, 2002; Kudin *et al*, 2005). Sin embargo, no existe un acuerdo sobre la direccionalidad de la producción de radicales libres del complejo I. Mientras algunos estudios indican que toda la producción de radicales de este complejo multiproteico se dirige al espacio intermembrana (St-Pierre *et al*, 2002; Kudin *et al*, 2005), otros sugieren que aproximadamente la mitad de los radicales se genera hacia el espacio intermembrana y la otra mitad hacia la matriz mitocondrial (Muller *et al*, 2004b). La direccionalidad en la producción de radicales libres es relevante porque determina el grado del daño oxidativo producido a moléculas importantes. Así por ejemplo, el ADN mitocondrial se vería más afectado por los radicales libres que son generados hacia la matriz mitocondrial (complejo I). Por lo tanto, esta direccionalidad en la producción de radicales libres tendría consecuencias muy importantes para el envejecimiento (Barja, 2004a).

Por otro lado, la producción de radicales libres en la mitocondria depende en gran medida tanto del grado de reducción electrónica de los generadores de estos radicales libres como de la  $pO_2$  local (Barja, 2007). Cuando el flujo electrónico es lento, los

electrones tienden a acumularse en la cadena de transporte electrónico por lo que, los complejos respiratorios tienden a reducirse más en el estado de reposo. Sin embargo, cuando se añade ADP a la mitocondria, el flujo electrónico se incrementa, los electrones fluyen rápidamente a lo largo de la cadena de transporte electrónico y, por lo tanto, el grado de reducción electrónica de la misma, y de sus generadores de ROS, desciende abruptamente (Loschen *et al*, 1971). Dado que, cuando se incrementa el grado de reducción de los complejos de la cadena de transporte electrónico, también se incrementa en gran medida su capacidad para producir ROS (Kushnareva *et al*, 2002), la generación mitocondrial de ROS será alta en el estado 4, ya que en este estado la tasa de consumo de oxígeno es baja. Por el contrario, en estado 3, la tasa de consumo de oxígeno es más alta, por lo que el grado de reducción de los transportadores es menor y se reduce considerablemente la tasa de generación de ROS hasta valores apenas detectables.

El otro mecanismo que ayuda a disminuir la producción de ROS cuando se incrementa la respiración mitocondrial es el descenso en la  $pO_2$  local debido al mayor consumo de oxígeno mitocondrial. La  $K_m$  del complejo IV para el  $O_2$  es muy baja para asegurar la fosforilación oxidativa continua aunque haya una  $pO_2$  baja. Sin embargo la  $K_m$  para el  $O_2$  de los generadores de ROS es comparativamente mucho mayor y está situada dentro del rango fisiológico de la  $pO_2$  celular de los tejidos *in vivo*. De hecho, la generación mitocondrial de ROS es dependiente de la  $pO_2$  (Hoffman *et al*, 2007). Así pues, un descenso local en la  $pO_2$  reduce notablemente la producción mitocondrial de ROS.

Existen situaciones en las que el consumo de oxígeno aumenta abruptamente, como por ejemplo, el ejercicio, que es capaz de incrementar el consumo de oxígeno unas 10 veces en humanos, y entre 30-50 veces en caballos (Weibel, 2002). Este fuerte incremento en el consumo mitocondrial de oxígeno provoca un descenso local de la  $pO_2$  en el tejido. A esa  $pO_2$  tan baja, la producción mitocondrial de ROS desciende fuertemente ya que, la alta  $K_m$  para el oxígeno de los generadores de ROS, limita fuertemente su capacidad para reducir el oxígeno de forma univalente. De hecho, las mitocondrias conservan su capacidad de generar  $H_2O_2$  en estado 3, sólo cuando éstas se encuentran en un medio hiperóxico (Saborido *et al*, 2005); en estas condiciones el consumo de oxígeno mitocondrial en estado 3 no es suficientemente alto para hacer descender la  $pO_2$  local de los generadores mitocondriales de ROS.

El fuerte descenso en la producción mitocondrial de ROS que tiene lugar en la transición energética del estado 4 al estado 3 de la cadena respiratoria mitocondrial permite a los animales desarrollar un alto metabolismo aeróbico sin incurrir en un elevado daño oxidativo. Existen otras situaciones en las que pueden producirse variaciones independientes del consumo de oxígeno mitocondrial y de la producción mitocondrial de ROS, como sucede por ejemplo, durante incrementos crónicos de la tasa metabólica (hipertiroidismo) y durante la restricción de dieta (revisado en Barja, 2007).

## **5.- DAÑO OXIDATIVO**

Todos los tipos de macromoléculas biológicas (proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) son sensibles al ataque oxidativo y sus productos oxidados se acumulan con la edad. La magnitud final de este daño dependerá de la intensidad de producción de radicales libres, de la resistencia de estas moléculas a ser oxidadas y de la eficiencia en la reparación o reemplazo de las mismas.

### **5.1.- Daño oxidativo al ADN**

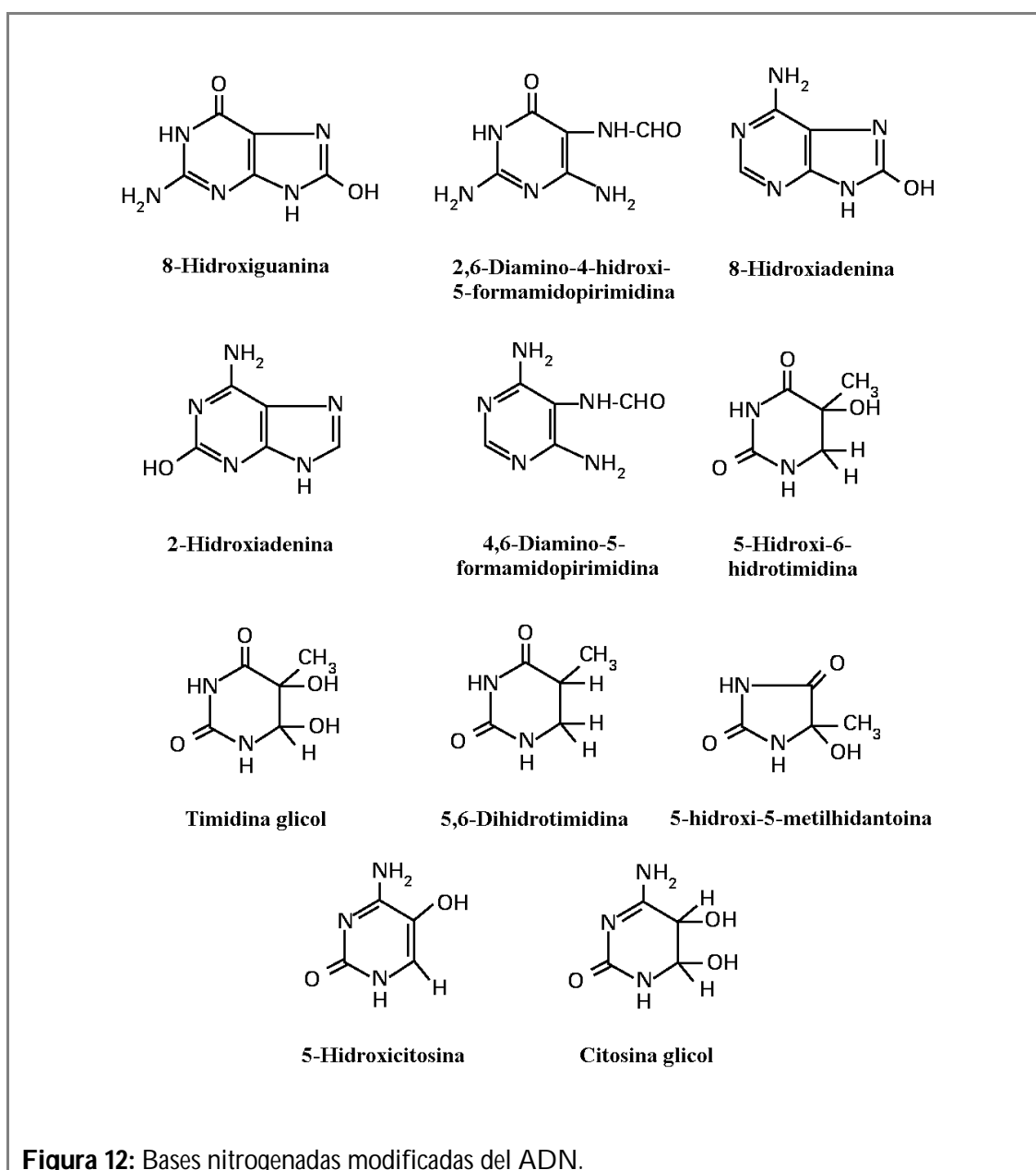
El daño oxidativo al ADN es el más importante en relación con el proceso de envejecimiento. Las alteraciones oxidativas sobre proteínas, lípidos e hidratos de carbono pueden repararse utilizando la información codificada en el propio ADN, pero cuando el daño oxidativo se produce sobre el mismo material genético la reparación resulta más complicada. Aunque existen sistemas de reparación del daño oxidativo al ADN, su eficacia no es del 100 %, lo que unido a posibles errores en la reparación, puede provocar la aparición de alteraciones genéticas, mutaciones. El número de copias de ADN es limitado y cuando todas las copias de un gen resultan dañadas, la información codificada en el mismo se pierde de manera definitiva para la célula.

Aunque el ADN no puede ser atacado directamente por el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno, en presencia de metales de transición estas especies reactivas pueden generar el radical hidroxilo, que si es capaz de atacar al ADN. El peróxido de hidrogeno va a jugar un papel fundamental pues, al carecer de carga puede llegar a pasar a

través de las membranas lipídicas, y al ser relativamente estable, difundir hasta zonas muy alejadas de su lugar de formación, donde puede reaccionar con metales de transición como los que forman parte de la cromatina y generar el radical hidroxilo que tiene la capacidad de alterar el ADN (Halliwell, 1998).

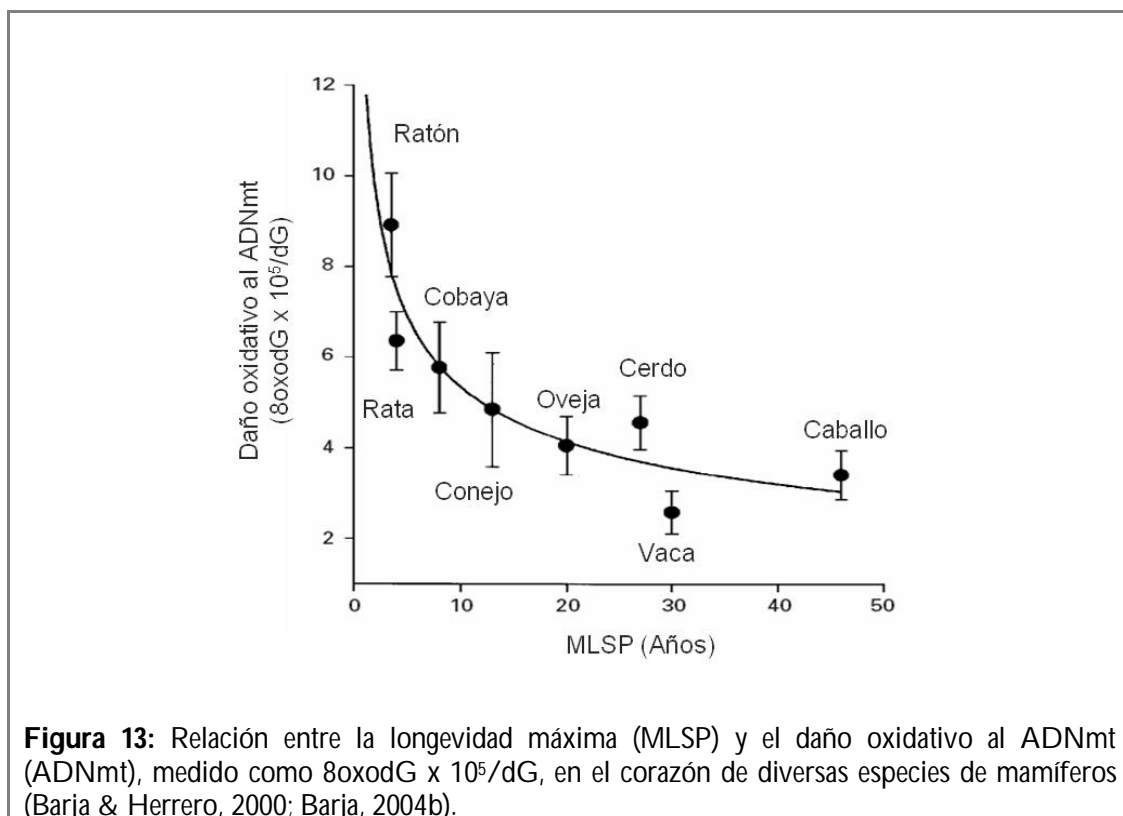
Tanto las bases púricas como pirimidínicas son susceptibles al ataque oxidativo. Las bases alteradas son mutagénicas porque pueden inducir trasversiones G-T o C-A en genes críticos durante las etapas iniciales del desarrollo de tumores (Loft & Poulsen, 1996). Existen numerosas modificaciones de bases nitrogenadas tanto púricas como pirimidínicas (figura 12) entre las que se encuentran la 8-oxoadenina, la 2-hidroxiadenina, el 5-hidroximetiluracilo, la 5-hidroxicitosina, la citosina glicol, y la timidina glicol (Loft & Poulsen, 1996). Sin embargo, la base más empleada como marcador de ataque oxidativo al ADN es la guanina. La oxidación de esta base en su carbono 8 da lugar a la formación de la base modificada 8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), es el biomarcador más utilizado para cuantificar el daño oxidativo al ADN.

La 8-oxodG es una base nitrogenada alterada y mutagénica que es reparada tanto en el núcleo como en la mitocondria, aunque de una forma más intensa en el primero (Bohr, 2002). Esta base alterada no se acumula excesivamente en el ADN de ninguno de los dos orgánulos, sin embargo los radicales libres podrían producir otros tipos de daño al ADN que no podrían ser reparados eficientemente, lo que facilitaría su acumulación durante el envejecimiento (Barja *et al*, 2005). El grado de acumulación de mutaciones que aparece en especies animales con una longevidad máxima reducida a los 2 o 3 años de vida es el que aparece en los humanos entre los 70 y 100 años (Wang *et al*, 1997). La alta tasa de producción mitocondrial de radicales libres en las especies animales de vida corta podría ser responsable de una acumulación mayor de mutaciones durante el envejecimiento. Este mismo razonamiento podría aplicarse en el caso de animales alimentados *ad libitum* frente a los restringidos dietéticamente, por lo que habría una mayor tasa de acumulación de mutaciones somáticas en el primer caso (Barja *et al*, 2005).



Existe una correlación negativa entre la longevidad máxima y los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial de corazón (figura 13) y cerebro en animales homeotermos (aves y mamíferos), que no se ha observado en el caso del ADN nuclear (Pamplona & Barja, 2003). Además los niveles de daño oxidativo en el ADN mitocondrial son mayores que en el ADN nuclear de corazón y de cerebro de 11 especies distintas de aves y mamíferos (Herrero & Barja, 1999; Barja & Herrero, 2000), así como de hígado de rata (Richter *et al*, 1988). Por último, la restricción dietética a largo plazo produce una disminución de los niveles de daño oxidativo en el ADN mitocondrial cardiaco, pero no en el ADN nuclear (Gredilla *et al*, 2001a; Lopez-Torres *et al*, 2002). Por todas estas razones, y a pesar de que tanto el ADN mitocondrial como el nuclear son sensibles al ataque oxidativo por radicales

libres, se considera que el daño al primero va a resultar determinante en el envejecimiento (Miquel, 1991). Además al carecer de intrones, este ADN posee una mayor densidad de información en su cadena, por lo que es muy probable que cualquier mutación afecte a la funcionalidad de los genes codificados en él.



El ADN mitocondrial presenta unos niveles de daño oxidativo unas 10 veces superiores a los del ADN nuclear (Richter *et al*, 1988; Barja & Herrero, 2000; Hamilton *et al*, 2001; Gredilla *et al*, 2001a). Este hecho se justifica porque el ADN mitocondrial no está protegido por histonas (Richter, 1995) y además se localiza junto a la cadena de transporte electrónico, que es la fuente más importante de radicales libres en células sanas, lo que probablemente limite mucho la acción de los antioxidantes (Perez-Campo *et al*, 1998). Por otro lado, parece que el ADN mitocondrial forma complejos con la membrana interna (Albring *et al*, 1977), que es muy rica en ácidos grasos insaturados y muy sensible al daño oxidativo, por lo que puede llegar a afectar a dicho ADN.

Los radicales libres pueden contribuir a la acumulación tanto de mutaciones puntuales como de grandes deleciones, que tiene lugar en el ADN mitocondrial durante el envejecimiento (Miquel *et al*, 1980; Crott *et al*, 2005; Sato *et al*, 2007). Esta acumulación de

mutaciones podría llevar a la deficiencia bioenergética, la cual podría ser una de las causas del envejecimiento. Según este modelo la mitocondria sería tanto la fuente del daño oxidativo como su objetivo final. La acumulación tanto de mutaciones puntuales como de grandes deleciones tiene lugar en el ADN mitocondrial a lo largo del proceso de envejecimiento (Sato *et al*, 2007). Sin embargo, parece haber numerosas dificultades para establecer una conexión entre la mutaciones en el ADN mitocondrial con el envejecimiento.

Como existen numerosas copias de ADN mitocondrial por célula, solo se comprometerían las funciones mitocondriales cuando la mayor parte de estas copias estuvieran mutadas. Se ha observado que existe una expansión clonal de las copias del ADN mitocondrial con deleciones, que puede provocar que las células lleguen a ser homoplásmicas para este ADN mitocondrial mutado (Kraytsberg *et al*, 2003). Sin embargo, parece que la proporción de células con ADN mitocondrial mutado en los tejidos vitales de animales viejos es muy baja (Falkenberg *et al*, 2007). Así pues, aunque las células deficitarias en mitocondrias tienden a concentrarse, sólo lo hacen en pequeñas áreas de tejidos como el cerebro (Soong *et al.*, 1992; Corral-Debrinski *et al*, 1992) y el músculo esquelético (Lee *et al*, 1998; Wanagat *et al*, 2001).

Como no está claro como una pequeña cantidad de células con su ADN mitocondrial mutado puede ser responsable del proceso de envejecimiento, se ha propuesto que las mutaciones en dicho ADN mitocondrial en células viejas representan sólo “la punta del iceberg” y una cantidad mucho mayor queda aún por ser descubierta (Kukat & Trifunovic, 2008), sin embargo no hay evidencias que apoyen esta posibilidad.

El problema de la conexión de las mutaciones del ADN mitocondrial con el envejecimiento podría ser resuelto, al menos parcialmente, con un cambio en el enfoque actual. Más del 99 % de los genes residen en el núcleo y, por consiguiente, es su alteración la que potencialmente puede tener una influencia más profunda en el proceso de envejecimiento. Los radicales libres producidos por la mitocondria pueden modificar las bases del ADN mitocondrial, pero también tienen la capacidad de generar fragmentos de este ADN. Este hecho se confirma con el hallazgo de fragmentos de ADN altamente oxidado en mitocondrias aisladas de hígado de rata (Suter & Richter, 1999). Se ha propuesto que estos fragmentos de ADN podrían llegar a escapar de la mitocondria para

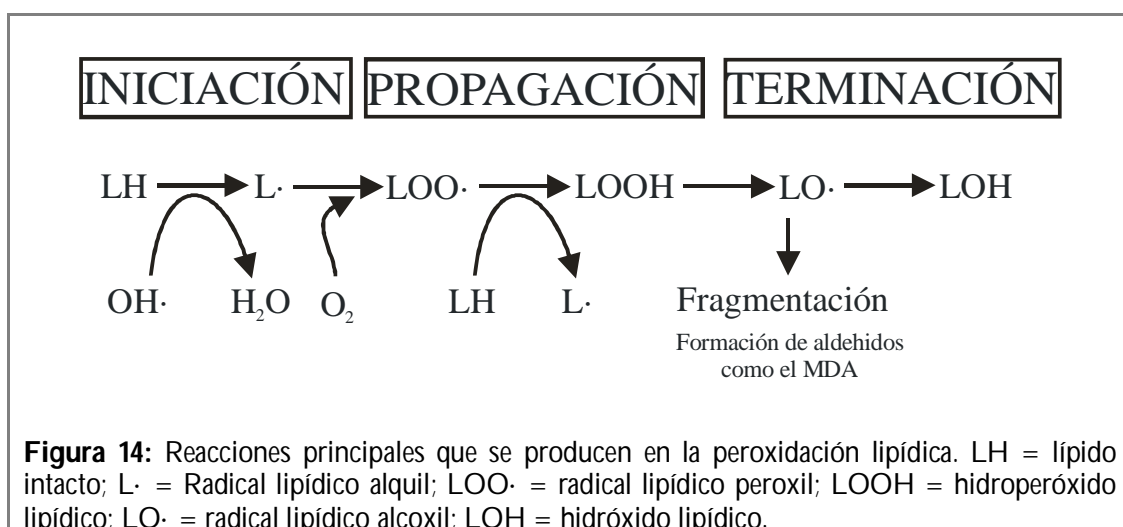
ser posteriormente integrados en el genoma nuclear (Richter, 1988). Esta acumulación de fragmentos de ADN mitocondrial en el núcleo que se produciría a lo largo del tiempo, podría cambiar la información codificada en el mismo ADN nuclear y, consecuentemente, contribuir a la formación de células tumorales y al proceso de envejecimiento (Richter, 1988).

Por otro lado, se sabe que la transferencia de secuencias de ADN mitocondrial al núcleo ha ocurrido repetidamente durante la evolución de los eucariotas (Blanchard & Lynch, 2000) y además, se han encontrado fragmentos de ADN mitocondrial dentro del genoma nuclear de diversas especies como *arabidopsis*, maíz, arroz, levadura, algunas especies de insectos o, incluso en humanos (Gellisen *et al*, 1983; Shay & Werbin, 1992; Juretic, 1995; Martin, 2003; Lough *et al*, 2008). Si un proceso similar ocurriera en células somáticas a lo largo de la vida del individuo, la acumulación de fragmentos de ADN mitocondrial en el núcleo podría alterar la información codificada en el ADN nuclear, y por consiguiente podría contribuir al proceso de envejecimiento (Richter, 1988). En este modelo las células no tendrían mutadas la mayoría de sus copias de ADN mitocondrial; sin embargo, podrían presentar mutaciones en el ADN nuclear debido a la continua inserción de fragmentos de ADN en el genoma nuclear a lo largo de la vida. Como para que tenga lugar la generación mitocondrial de radicales libres es necesaria una cadena respiratoria intacta, en este proceso participarían la gran mayoría de las células de los tejidos, lo que podría tener importantes implicaciones para el envejecimiento.

En este modelo la mitocondria sería el origen del problema porque genera los radicales libres y los fragmentos de ADN mitocondrial, mientras que el núcleo, que contiene la gran mayoría de los genes celulares, sería la diana principal.

## **5.2.- Daño oxidativo a lípidos**

El daño oxidativo a los lípidos se traduce en procesos de peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica fue el primer tipo de daño oxidativo a macromoléculas que se observó y es un proceso en el que se pueden diferenciar tres etapas: iniciación, propagación y terminación (figura 14).



En la etapa de **iniciación** se produce la extracción de un electrón de un átomo de carbono adyacente a un doble enlace, de forma que el ácido graso se transforma en un radical alquil (L·).

Los radicales alquil pueden llegar a formar enlaces cruzados intra o inter moleculares, aunque lo más habitual es que reaccionen con el oxígeno generando el radical peroxilo (LOO·). Estos radicales alquil y peroxil son los productos iniciales de la oxidación de los ácidos grasos (Marnett, 1999) que tiende a estabilizarse mediante un reordenamiento electrónico que origina un dieno conjugado. Debido a la gran cantidad de dobles enlaces que presentan los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, *PolyUnsaturated Fatty Acid*), estos ácidos grasos son los más sensibles al ataque de los radicales libres. Las membranas que contienen gran cantidad de PUFA son muy frágiles frente a la acción de los radicales libres. Existen varios radicales libres capaces de iniciar la peroxidación lipídica. La especie reactiva más importante en el inicio de la peroxidación lipídica es el radical hidroxilo (OH·), que es altamente reactivo y al carecer de carga puede difundir más fácilmente hacia el interior de las membranas biológicas (Bielski *et al*, 1983; de Grey, 2002). Tanto el radical superóxido como el peróxido de hidrogeno no son capaces de iniciar la peroxidación lipídica por si solos, pero en presencia de metales de transición, como el hierro y el cobre, pueden llegar a generar radicales hidroxilo que si son capaces de iniciar dicha peroxidación. Otras especies reactivas como el ozono, el oxígeno singlete y los radicales halogenados, también pueden participar en la iniciación de la peroxidación lipídica.

En la etapa de **propagación**, el radical peroxilo (LOO·) se transforma en un hidroperóxido lipídico (LOOH) reaccionando habitualmente con el doble enlace de un

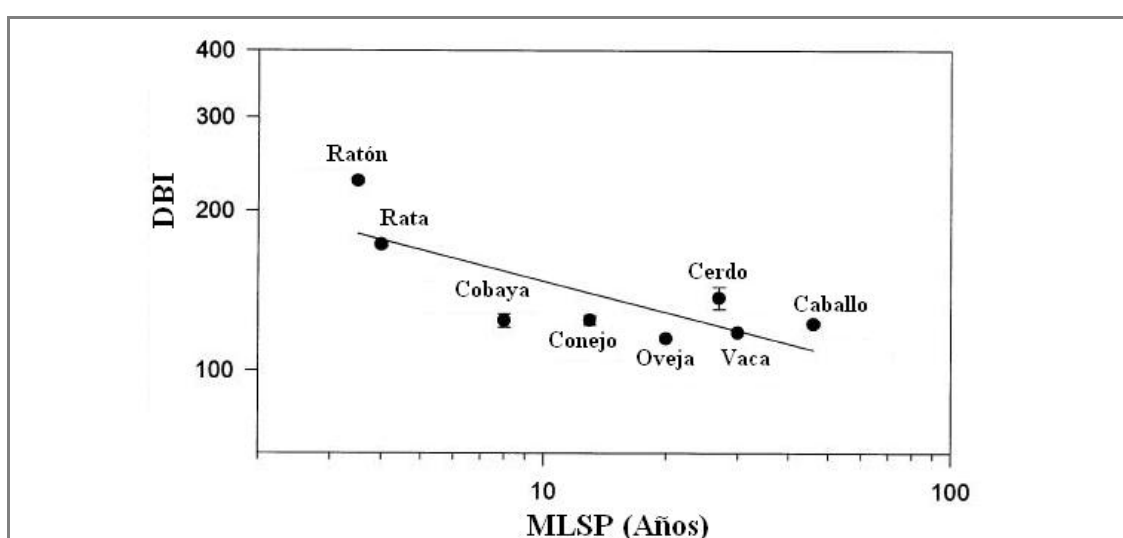
ácido graso adyacente, que a su vez se transforma en un radical alquilo (Marnett, 1999). De esta forma genera daño oxidativo en una gran cantidad de moléculas a partir de un solo ácido graso alterado en la etapa de iniciación. Los hidroperóxidos (LOOH) son relativamente estables y pueden ser eliminados mediante la acción de las glutathion peroxidasas o por su reacción con la vitamina E (Okuyama *et al*, 1997). Sin embargo, en presencia de metales de transición pueden sufrir una reacción análoga a la de Fenton que permite la formación de compuestos cíclicos denominados endoperóxidos, los cuales al descomponerse forman diferentes aldehídos, como el malondialdehído (MDA), capaces de dañar a otras macromoléculas, como proteínas y ADN. Tradicionalmente el MDA ha sido utilizado como biomarcador de peroxidación lipídica porque se valora fácilmente mediante su reacción con el ácido tiobarbitúrico para formar un compuesto que presenta absorbancia a una longitud de onda característica (Mihara & Uchiyama, 1978).

En la etapa de **finalización o terminación** la especie reactiva de ácido graso puede reaccionar con radicales contiguos dando lugar a puentes cruzados (L-L), puede reaccionar con metales de transición (como el hierro y el cobre) generando nuevas especies de radicales libres o bien puede fragmentarse originando aldehídos como el MDA o el 4-Hidroxinonenal (4-HNE), que a su vez pueden reaccionar con otras moléculas generando productos secundarios (Barja, 1997) que, pueden causar daños a otras macromoléculas, como el ADN y las proteínas.

El proceso de peroxidación lipídica puede alterar las membranas biológicas provocando un incremento del orden y viscosidad de las mismas y un descenso de su resistencia eléctrica. También facilita el intercambio de fosfolípidos entre las dos monocapas y aumenta los entrecruzamientos con proteínas, lo que disminuye la movilidad de estas últimas (Richter, 1987). Si se propagan en exceso, las reacciones de peroxidación lipídica pueden llegar a destruir las membranas biológicas.

La composición de ácidos grasos de las membranas celulares juega un papel muy importante en la peroxidación lipídica. Así, un menor grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas resultaría en una disminución de su sensibilidad a la peroxidación lipídica (Pamplona & Barja, 2007). De acuerdo con esto, se ha visto que los animales longevos, tienen un menor grado de insaturación de sus ácidos grasos que los de vida corta.

El índice de dobles enlaces (DBI, *Double Bond Index*) hace referencia al grado de insaturación de los lípidos de membrana. Se ha descrito que las aves, cuya longevidad es mayor que la de los mamíferos, presentan un índice de dobles enlaces menor que los mamíferos con un tamaño corporal semejante (Pamplona *et al*, 1996; 1999a,b). Posteriormente, se descubrió una correlación negativa entre el índice de dobles enlaces y la longevidad máxima (Pamplona *et al*, 2002a; Pamplona & Barja, 2003; Hulbert, 2005, Sanz *et al*, 2006d; Hulbert *et al*, 2007), de forma que los animales pertenecientes a especies longevas tienen un índice de dobles enlaces menor que los pertenecientes a especies de vida corta (figura 15).



**Figura 15:** Relación entre la longevidad máxima (MLSP) y el índice de dobles enlaces (DBI) en los fosfolípidos de corazón de 8 especies de mamíferos (Pamplona *et al*, 2000a).

El bajo índice de dobles enlaces que presentan los animales longevos se debe a una redistribución entre los tipos de ácidos grasos poliinsaturados y no por la reducción de la cantidad total de los mismos. Esto representa una estrategia óptima ya que puede reducir la sensibilidad de las membranas a la peroxidación lipídica alterando poco a las propiedades de fluidez y microviscosidad que afectan de forma crítica a la función de las proteínas de membrana (Pamplona & Barja, 2007).

La redistribución en los tipos de ácidos grasos poliinsaturados que genera el descenso del DBI en las especies longevas se produce por una baja actividad de las desaturasas  $\delta$ -5 y  $\delta$ -6 (Pamplona *et al* 1998; 1999a,b; 2002a), que son necesarias en las reacciones de síntesis de ácidos grasos altamente insaturados como el ácido araquidónico o el ácido docoexanóico (Cook, 1996).

### 5.3.- Daño oxidativo a proteínas

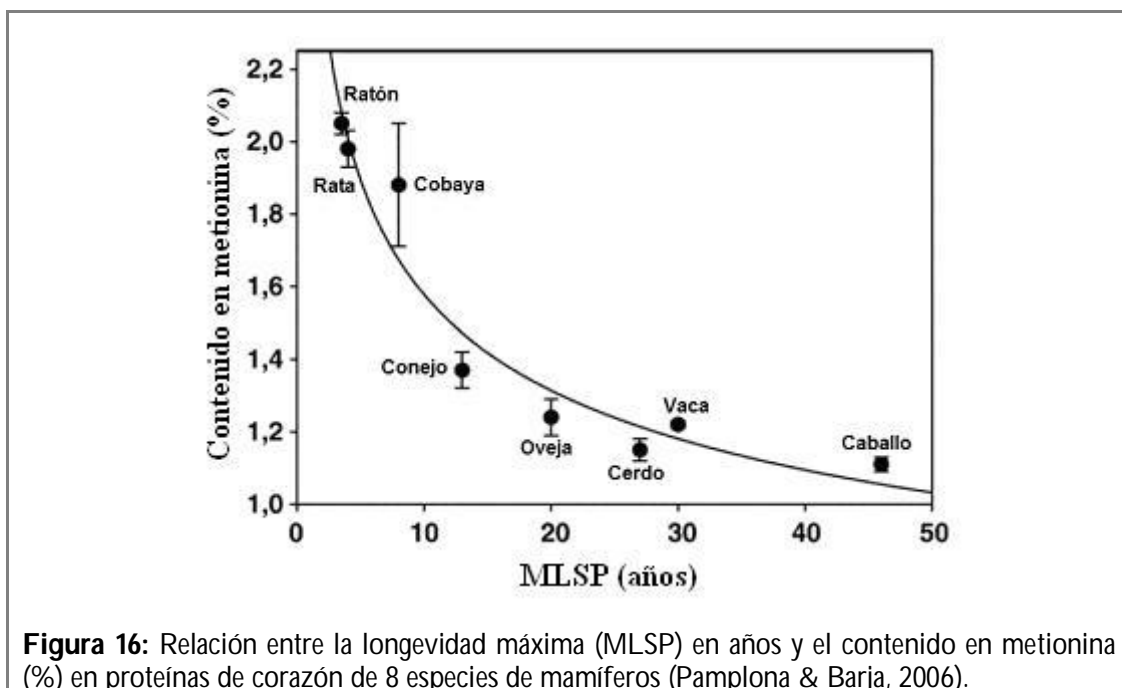
Existen diversos procesos mediante los cuales se puede generar daño oxidativo a proteínas, entre los que se encuentran la formación de grupos carbonilo, las reacciones con aldehídos, la oxidación de grupos sulfidrilo, el entrecruzamiento proteína-proteína o proteína-ADN, la fragmentación de proteínas y la conversión de unos aminoácidos en otros (Beckman & Ames, 1998).

No todas las proteínas tienen la misma susceptibilidad a ser objeto de oxidación. Ésta viene determinada por distintos factores, como el peso molecular, la velocidad a la que son degradadas, la conformación espacial que adoptan los aminoácidos, y la presencia de centros ferrosulfurados, de regiones de unión a metales, o de aminoácidos susceptibles a la oxidación (Agarwal & Sohal, 1995; Jana *et al*, 2001; Requena *et al*, 2001).

Tampoco todos los aminoácidos presentan la misma sensibilidad a la oxidación, de forma que los residuos con más tendencia a ser modificados son la cisteína, la tirosina y la metionina (Dean *et al*, 1997). **La metionina es particularmente susceptible a ser alterada por diversos intermediarios reactivos, de modo que al aumentar su presencia en las proteínas, también se incrementa la sensibilidad de las mismas al estrés oxidativo** (Stadtman *et al*, 2003).

La oxidación de la metionina puede producir la formación de metionina-sulfóxido en las proteínas, que es capaz de afectar a la actividad biológica de las mismas (Carp *et al*, 1982; Ciorba *et al*, 1997). La metionina-sulfóxido puede revertir a metionina por la acción de la enzima metionina-sulfóxido reductasa en una reacción dependiente de tiorredoxina. Los ratones *knockout* para la metionina-sulfóxido reductasa ven incrementados sus niveles de estrés oxidativo y reducida su longevidad (Moskovitz *et al*, 2001), lo que indica la gran importancia de la reparación de los residuos de metionina alterados en relación con el envejecimiento.

Se ha observado que el contenido en metionina de las proteínas de diversas especies de mamíferos correlaciona con la longevidad máxima (figura 16), por lo que las proteínas de especies longevas son menos sensibles a la modificación oxidativa que las de especies de vida corta (Ruiz *et al*, 2005; Pamplona & Barja, 2006; Lopez-Torres & Barja, 2008b).



Tradicionalmente uno de los marcadores más utilizados en la cuantificación de daño a proteínas han sido los grupos carbonilos ya que sus niveles se incrementan en el transcurso de numerosos procesos degenerativos, entre los que se encuentra el envejecimiento (Levine, 2002). Sin embargo, no debemos olvidar que estos carbonilos sólo representan una fracción de los aminoácidos dañados oxidativamente, y sus niveles pueden subestimar la extensión del daño oxidativo (Requena *et al*, 2001).

Es importante utilizar marcadores de daño a proteínas más específicos, como los semialdehídos glutámico (GSA) y aminoadípico (AASA), que resultan de la oxidación de poliarginina y poliprolina (para el caso del GSA), o de polilisina (para el caso del AASA). Estos dos marcadores constituyen la mayoría de los carbonilos proteicos generados en el hígado de roedores por la oxidación proteica catalizada por metales (Requena *et al*, 2001).

El daño oxidativo a proteínas se puede producir por la interacción de las mismas con otras macromoléculas oxidadas. Los aldehídos como el MDA y el 4-HNE, que surgen de la oxidación de lípidos, también pueden dañar las proteínas uniéndose al grupo amino de la lisina, al grupo sulfidriilo de la cisteína o al grupo imidazol de la histidina, e interaccionando con otras especies reactivas como el radical alcoxilo y el radical peroxilo (Refsgaard *et al*, 2000). Estas reacciones generan compuestos como la N<sup>ε</sup>-(Carboximetil) lisina (CML) que es un producto de procesos de lipoperoxidación o glicoxilación, la N<sup>ε</sup>-(Carboxietil) lisina (CEL) que es un producto de procesos de glicoxilación, y la N<sup>ε</sup>-(Malondialdehido) lisina

(MDAL) un producto de lipoxidación que se produce como derivado en las reacciones con MDA, que también pueden servir de indicadores específicos de daño oxidativo a proteínas *in vivo* (Pamplona *et al*, 1998).

Se han descrito unos niveles menores de MDAL y CML en proteínas mitocondriales cardíacas en aquellos mamíferos y aves que tienen también un bajo DBI y que además presentan elevadas longevidades máximas (Pamplona *et al*, 1999a). Esto puede ser debido a que la composición de fosfolípidos de membrana modula la susceptibilidad de las proteínas a sufrir daño oxidativo y lipoxidativo (Pamplona *et al*, 2004). Como existe una correlación negativa entre la longevidad máxima y el grado de insaturación de los ácidos grasos en diversas especies de mamíferos (Pamplona & Barja, 2003), los niveles de MDAL y CML serán menores en especies longevas que en especies de vida corta.

## **6.- RESTRICCIÓN DIETÉTICA, ESTRÉS OXIDATIVO Y ENVEJECIMIENTO**

En la tercera década del siglo XX se demostró que la restricción dietética a largo plazo era capaz de incrementar la longevidad en roedores de laboratorio (McCay *et al*, 1935), de forma que una reducción de la ingesta de un 40 % incrementaba su longevidad máxima entre un 25 y un 50 % (Knight, 1995; Everitt *et al*, 2005). Actualmente, la restricción dietética o restricción calórica es la manipulación experimental mejor estudiada, capaz de incrementar la longevidad máxima en los homeotermos (McCay *et al*, 1935; Masoro & Austad, 1996; Sohal & Weindruch, 1996; Yu, 1996; Lee *et al*, 2004).

Posteriormente numerosas investigaciones han demostrado que la restricción dietética es capaz de reducir la producción mitocondrial de radicales libres (Sohal *et al*, 1994; Sohal & Weindruch, 1996; Gredilla *et al*, 2001a,b; Barja, 2002a; Drew *et al*, 2003; Bevilacqua *et al*, 2004; Judge *et al*, 2004; Gredilla & Barja, 2005) indicando un incremento de la eficiencia de la cadena de transporte electrónico, lo que apoyaría la teoría de envejecimiento por radicales libres. Algunos estudios indican que esta disminución tiene lugar exclusivamente a nivel de complejo I en roedores (Gredilla *et al*, 2001b; Lopez-Torres *et al*, 2002).

La restricción dietética también es capaz de reducir el daño oxidativo al ADN mitocondrial (Qu *et al*, 2000; Gredilla *et al*, 2001a,b; Lopez-Torres *et al*, 2002; Sanz *et al*, 2005). Además el tratamiento puede disminuir los niveles de distintos marcadores de daño oxidativo (GSA y AASA), lipoxidativo (CML y CEL) y glicoxidativo (CML y MDAL) a proteínas (Pamplona *et al*, 2002b,c).

Existen pocos estudios sobre los efectos de esta manipulación en el ser humano. Esta escasez de estudios se debe a que las personas deben mantener su ritmo normal de vida, por lo que dichos estudios son muy complicados de realizar (Pamplona, 2009). Los datos que se manejan actualmente indican que la restricción dietética en humanos es beneficiosa porque reduce el riesgo de aterosclerosis (Fontana *et al*, 2004), incrementa la biogénesis mitocondrial en músculo (Civitarese *et al*, 2007), tiene efectos beneficiosos en la función cardíaca (Meyer *et al*, 2006) y disminuye tanto el daño oxidativo al ADN (Heilbronn *et al*, 2006) como los niveles plasmáticos de factores de crecimiento, hormonas anabólicas y citoquinas inflamatorias asociadas al riesgo de cáncer (Fontana *et al*, 2006; Heilbronn *et al*, 2006). Además tiene efectos beneficiosos en la memoria de ancianos (Witte *et al*, 2009), mejora la tolerancia a la glucosa y la acción de la insulina (Weiss *et al*, 2006).

Sin embargo, la aplicación de la restricción dietética a poblaciones humanas es muy problemática por la dificultad para cambiar los hábitos alimenticios, el alto riesgo de malnutrición y la disminución de la resistencia al estrés producido por las condiciones normales de vida (Pamplona & Barja, 2007). Afortunadamente existen otro tipo de manipulaciones de la dieta capaces de modificar la longevidad máxima.

La hipótesis tradicional afirma que los efectos de la restricción dietética se deben a la reducción en la ingesta de calorías (Masoro *et al*, 1991). Sin embargo, la restricción de proteínas puede incrementar de forma significativa la longevidad máxima en roedores (Leto *et al*, 1976), mientras que ni la restricción de hidratos de carbono (Khorakova *et al*, 1990) ni la restricción de lípidos (Iwasaki *et al*, 1988; Shimokawa *et al*, 1996) parecen ser capaces de modificar la longevidad de los mismos. Esta restricción de proteínas sería responsable de alrededor de un 50 % del incremento en la longevidad máxima producido por la restricción dietética (Pamplona & Barja, 2006, 2007).

Al igual que la restricción dietética, la restricción de proteínas también es capaz de disminuir la producción mitocondrial de radicales libres a nivel de complejo I y el daño oxidativo al ADN mitocondrial en hígado de rata (Sanz *et al*, 2004; Gomez *et al*, 2007). Sin embargo, ni la restricción de lípidos (Sanz *et al*, 2006b) ni de hidratos de carbono (Sanz *et al*, 2006c) son capaces de producir estos efectos.

Profundizando en estos estudios de restricción se ha comprobado que la restricción de un único aminoácido, la metionina, es capaz de incrementar la longevidad media y máxima en roedores (Orentreich *et al*, 1993; Richie *et al*, 1994; Zimmerman *et al*, 2003; Miller *et al*, 2005; Sun *et al*, 2009) e insectos (Troen *et al*, 2007). Los estudios de restricción de metionina parecen indicar que ésta es la responsable de la totalidad del incremento de longevidad máxima producido por la restricción de proteínas y alrededor de un 50 % del producido por la restricción dietética (Pamplona & Barja, 2007).

Al igual que sucede en la restricción de dieta y de proteínas, la restricción de metionina en la dieta es capaz de reducir, tanto la producción mitocondrial de radicales libres a nivel del complejo I, como el daño oxidativo sobre el ADN mitocondrial y las proteínas en hígado (Sanz *et al*, 2006a; Caro *et al*, 2008), en cerebro y en riñón de rata (Caro *et al*, 2009). El tratamiento puede producir un descenso de los niveles tanto del complejo I como del factor inductor de la apoptosis en la mitocondria, lo que explicaría el efecto sobre la producción mitocondrial de radicales libres (Sanz *et al*, 2006a; Caro *et al*, 2008; 2009).

La restricción de metionina sería responsable del 100 % de la reducción en la producción mitocondrial de radicales libres y del estrés oxidativo que ocurre durante la restricción proteica y dietética, mientras que sólo lo sería de la mitad del incremento de longevidad que se produce por dicha modificación experimental (Pamplona & Barja, 2007). Por lo tanto, la metionina parece ser el factor determinante del efecto de la restricción de dieta sobre la disminución de la generación mitocondrial de ROS y el estrés oxidativo (Gredilla & Barja, 2005; Pamplona & Barja, 2007; Lopez-Torres & Barja, 2008a).

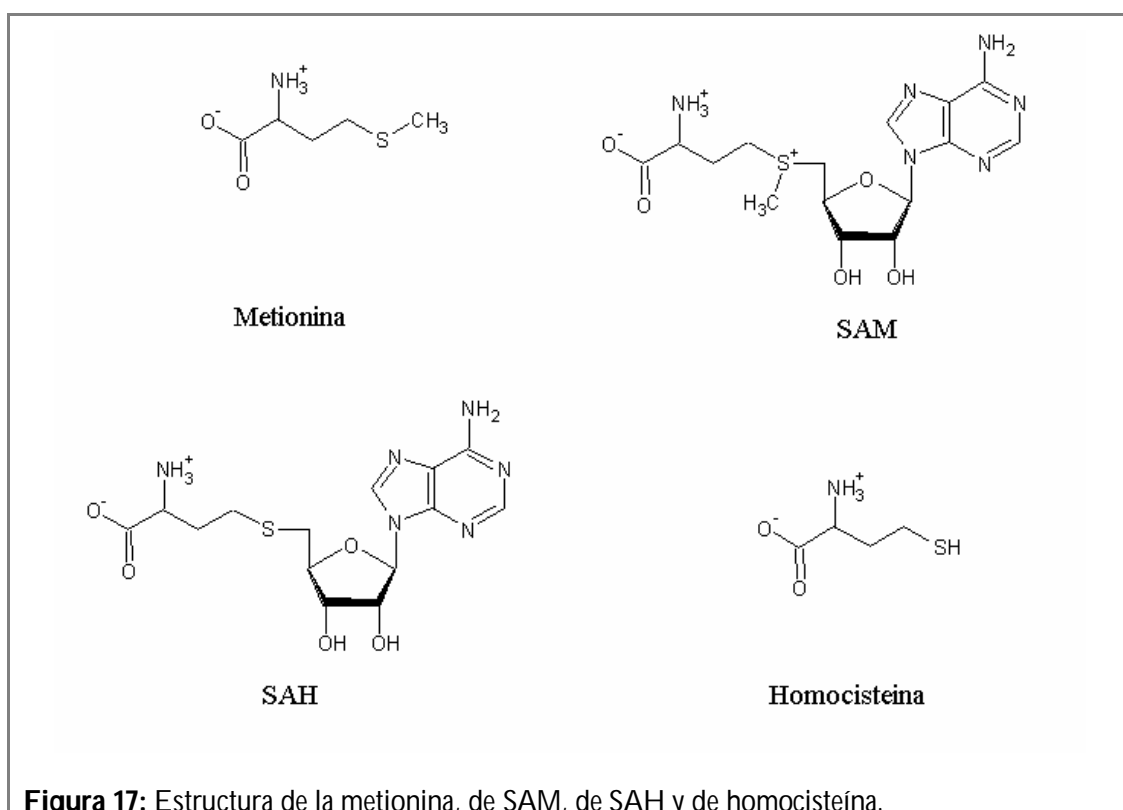
La restricción de metionina también sería capaz de producir otros efectos beneficiosos en roedores como retrasar el desarrollo de cataratas, minimizar los cambios en células T asociados a la edad, reducir los niveles de glucosa, insulina e IGF-I en plasma,

evitar total o parcialmente los incrementos de los niveles de colesterol y triglicéridos asociados a la edad, así como disminuir en un 40 % los niveles de grasa visceral en roedores (Miller *et al*, 2005; Malloy *et al*, 2006). De este modo, parece que la restricción de metionina es responsable de gran parte de los efectos beneficiosos que produce la restricción dietética.

Es posible que parte de los efectos de la restricción dietética sobre la longevidad (concretamente los mediados por daño oxidativo) se deban a la reducción del consumo de determinados componentes de la dieta como la metionina, que parece ser uno de los componentes con mayor relevancia sobre el incremento de la longevidad (Pamplona & Barja, 2007; Lopez-Torres & Barja, 2008a).

## 7.- LA METIONINA Y SUS METABOLITOS

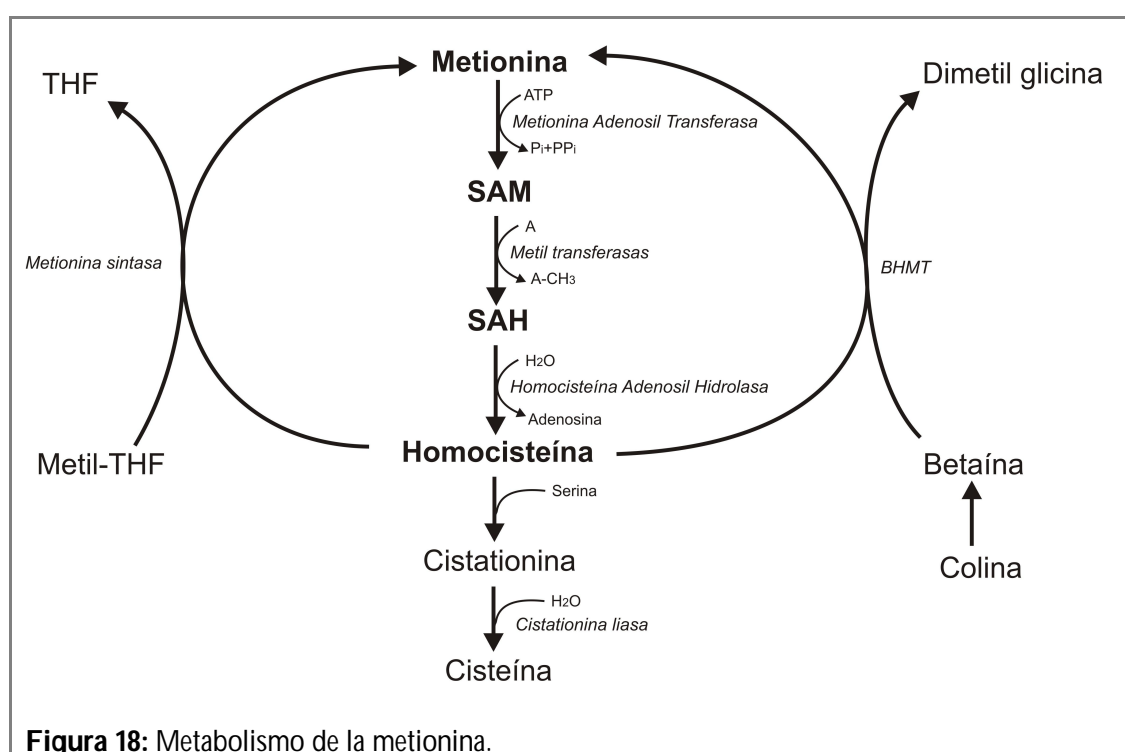
La metionina es un aminoácido neutro, sulfurado, esencial para los mamíferos, importante para las reacciones de metilación y precursor tanto de la cisteína como de la síntesis proteica (figura 17).



**Figura 17:** Estructura de la metionina, de SAM, de SAH y de homocisteína.

Bajo condiciones fisiológicas normales, la vía de transulfuración es prácticamente la única vía del catabolismo de la metionina. La transulfuración consiste en la transferencia del grupo tiol desde la metionina a la serina para formar cisteína (Rao *et al*, 1990). A continuación, esta cisteína se cataboliza generando como productos finales sulfato y taurina, que posteriormente son excretados en la orina.

Durante el catabolismo de la metionina se generan diversos metabolitos intermediarios. La metionina se combina con el ATP por la acción de la metionina adenosil transferasa para formar S-adenosilmetionina (SAM). Este metabolito dona un grupo metilo por la acción de las metil transferasas generando S-adenosilhomocisteína (SAH) en el proceso. A continuación, la SAH se hidroliza por la homocisteína adenosil hidrolasa liberando adenosina y homocisteína en el proceso (figura 17, 18). La homocisteína es el metabolito que se combinará con la serina para acabar generando cisteína. Así pues, cuando se incrementa la concentración de metionina, también pueden elevarse los niveles de estos metabolitos (Regina *et al*, 1993).



Como ya hemos indicado la metionina adenosil transferasa cataliza la primera reacción de la vía de degradación de la metionina. Esta enzima presenta varias isoformas que se pueden clasificar en específicas y no específicas del hígado (Chou, 2000). La

metionina adenosil transferasa no específica del hígado posee una baja  $K_m$  por su sustrato (metionina) y es inhibida fuertemente por su producto (SAM). Así pues, esta isoforma funcionaría a su velocidad máxima constantemente y no se vería afectada por el incremento de la concentración de metionina. Sin embargo, la metionina adenosil transferasa específica del hígado predominante presenta una  $K_m$  alta por su sustrato y una modulación positiva por su producto. De este modo, esta isoforma es capaz de reducir eficientemente los niveles de metionina cuando dicho aminoácido se encuentra en exceso. Por esta razón, se cree que el hígado juega un papel central en el metabolismo de la metionina (Stipanuk, 2004).

La SAM es un importante donador de grupos metilo y por lo tanto es necesaria para numerosas reacciones de metilación como, la síntesis de creatinina, de adrenalina, y de melatonina, entre otras. Por su parte, la homocisteína es una molécula con un grupo tiol libre que se oxida fácilmente generando puentes disulfuro intra e inter-proteicos, con lo que puede generar daño en las proteínas.

Los niveles de homocisteína y cisteína se mantienen bajos en los tejidos gracias a varios mecanismos. Existen dos vías de remetilación que vuelven a generar metionina a partir de homocisteína. La primera vía utiliza el metil-tetrahidrofolato (Metil-THF) que cede su grupo metilo a la homocisteína por la acción de la metionina sintetasa. La suplementación en la dieta con ácido fólico (vitamina B-11) o con cobalamina (vitamina B-12) es capaz de activar esta vía, que tiene lugar en todas las células del organismo y es muy efectiva para reducir la concentración de homocisteína (Melse-Boonstra *et al*, 2005). La segunda vía utiliza la betaína como donador de grupos metilos. La acción de la betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT) convierte la betaína en dimetilglicina y cede el grupo metilo resultante a la homocisteína transformándola en metionina. Así pues, el incremento de la concentración de betaína, ya sea por medios endógenos (oxidación de colina a betaína) o por medios exógenos (suplementación en la dieta), es capaz de disminuir la concentración plasmática de homocisteína (Zeisel *et al*, 2003). La betaína-homocisteína metiltransferasa sólo se expresa en hígado y en riñón, por lo que esta vía únicamente tiene lugar en estos órganos (Garrow, 2001).

El exceso de metionina en la dieta produce una toxicidad mayor que cualquier otro aminoácido (Harper *et al*, 1970). Entre los efectos adversos que produce la suplementación

de metionina se encuentran el incremento de los niveles plasmáticos de hidroperóxidos (Hidiroglou *et al*, 2004), la hipercolesterolemia (Troen *et al*, 2003; Hidiroglou *et al*, 2004), la anemia (Yokota *et al*, 1978), el retraso en el crecimiento (Benevenga *et al*, 1976) y el daño tanto renal (Kumagai *et al*, 2002) como esplénico (Benevenga *et al*, 1976). Además genera la alteración de los niveles de enzimas antioxidantes y el incremento de la peroxidación lipídica en el hígado lo que puede conducir a la hepatotoxicidad (Lynch & Strain, 1989; Toborek *et al*, 1996; Mori & Hirayama, 2000; Park *et al*, 2008).

Existen evidencias de que la propia metionina es responsable de algunos de los efectos adversos producidos por el exceso de este aminoácido en la dieta (Harper *et al*, 1970; Troen *et al*, 2007). Sin embargo, la suplementación de metionina es capaz de incrementar los niveles plasmáticos de homocisteína (Hidiroglou *et al*, 2004), lo que puede inducir tanto aterosclerosis (Matthias *et al*, 1996; Troen *et al*, 2003) como hipertensión (Robin *et al*, 2004). La elevación de los niveles de homocisteína en plasma también puede acelerar el envejecimiento del sistema vascular (Fau *et al*, 1998) y posiblemente del cerebro (Ho *et al*, 2001; Algaidi *et al*, 2006; Tyagi *et al*, 2009).

# Objetivos

La restricción dietética es la manipulación experimental mejor conocida capaz de incrementar la longevidad máxima. Esta manipulación también reduce la producción mitocondrial de radicales libres y retrasa el envejecimiento en animales. Parece que la restricción de calorías en si mismas no es responsable del incremento en longevidad máxima y de la reducción de la producción de radicales libres, ya que la restricción de ciertos componentes de la dieta (las proteínas) también es capaz de producir estos efectos. Es más, la restricción de un único aminoácido, la metionina, puede incrementar la longevidad máxima, retrasar la aparición de enfermedades asociadas al envejecimiento y reducir tanto la producción mitocondrial de radicales libres de oxígeno como el estrés oxidativo.

El contenido de metionina en las dietas occidentales excede la cantidad diaria recomendada, por lo que dichas poblaciones están sometidas a suplementación de metionina. La suplementación de metionina genera una gran toxicidad y causa daño en diferentes órganos, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual se generan los efectos adversos. Además se desconoce si la suplementación de metionina es capaz de producir los efectos contrarios a la restricción de metionina. Por todo ello, como **primer objetivo** nos propusimos determinar si la suplementación de metionina a largo plazo en la dieta incrementa la producción mitocondrial de radicales libres y el estrés oxidativo, para lo cual utilizamos una dieta suplementada con un 2,5 % de metionina durante 7 semanas. Seleccionamos como órganos de estudio el hígado, por ser un órgano muy sensible a cambios metabólicos y nutricionales, por su relevancia en el metabolismo de la metionina y por ser uno de los órganos más afectados por el exceso de este aminoácido en la dieta; el corazón, por ser un órgano postmitótico y centro del sistema vascular, el cual es afectado gravemente por la suplementación de metionina; el cerebro, porque es un órgano clave en el proceso de envejecimiento y por ser rico en células postmitóticas y especialmente sensible al estrés oxidativo; y por último el riñón, por resultar gravemente dañado por el exceso de metionina y porque el deterioro de la función renal es característico del envejecimiento.

Profundizando en este primer objetivo, analizamos además de la tasa de producción mitocondrial de radicales libres, su localización en la cadena de transporte electrónico mediante la utilización de distintos sustratos e inhibidores específicos de distintas secciones de la cadena respiratoria, el consumo de oxígeno y la fuga porcentual de radicales. El

análisis de la cantidad de los distintos complejos mitocondriales así como del factor inductor de la apoptosis nos permite aclarar los mecanismos por los que se puede alterar la producción de radicales libres.

El daño oxidativo al ADN, principalmente mitocondrial, y aunque en menor medida, también a proteínas, juega un papel relevante en relación con el envejecimiento y por esta razón estos parámetros fueron incluidos en el estudio.

El grado de instauración de los ácidos grasos es otro parámetro que correlaciona el estrés oxidativo con la longevidad y por ello decidimos comprobar si la suplementación con metionina es capaz de modificar la composición de ácidos grasos de membrana y por consiguiente su susceptibilidad al ataque oxidativo.

Además el exceso de metionina puede producir modificaciones en las vías catabólicas de este aminoácido. Esta alteración podría conducir a una variación de los niveles de metionina y sus metabolitos, que también fueron incluidos en el estudio

Con los resultados del primer objetivo y para aclarar si el efecto sobre la generación mitocondrial de radicales libres se produce por interacción directa de la metionina con la mitocondria o si es el resultado de una cadena de acontecimientos desencadenados por la acción de este aminoácido, nos planteamos como **segundo objetivo**, el estudio del efecto *in vitro* de distintas concentraciones fisiológicas de metionina, S-adenosilmetionina, S-adenosilhomocisteína y de homocisteína sobre la producción de radicales libres en las mitocondrias de los cuatro órganos estudiados en el primer objetivo.

Los radicales libres tienen la capacidad de generar fragmentos de ADN mitocondrial. Se ha propuesto que estos fragmentos serían capaces de llegar al núcleo e integrarse en el ADN de este orgánulo. Por ello, como **tercer objetivo** nos propusimos detectar secuencias de ADN mitocondrial en el ADN nuclear de hepatocitos de rata y determinar si su presencia se incrementa con la edad, ya que la acumulación de fragmentos de ADN mitocondrial en el ADN nuclear podría alterar la información codificada en este último, lo que podría contribuir a la formación de células tumorales y al proceso de envejecimiento.

# **Materiales y Métodos**

## 1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

### 1.1.- Suplementación de metionina

#### 1.1.1.- Suplementación de metionina en la dieta a largo plazo

En este estudio se utilizaron 16 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) macho de 7 semanas de edad al inicio del tratamiento y repartidas de forma aleatoria en 2 grupos (figura 19):

- a.- Grupo control** alimentado con una dieta de crecimiento para roedores AIN 93G en la que la metionina estaba presente al 0,86 % (tabla 1).
- b.- Grupo suplementado en metionina (MetSup)** alimentado con una dieta en la que la metionina estaba presente al 2,5 % (tabla 1).

**Tabla 1:** Composición detallada (g/100 g) de las dietas semipurificadas, control y suplementada en metionina (MetSup) preparadas por MP biochemicals y utilizadas en el experimento de suplementación de metionina en dieta.

Componente	Control	MetSup
L-Arginina	1,12	1,101
L-Lisina	1,44	1,416
L-Histidina	0,33	0,325
L-Leucina	1,11	1,092
L-Isoleucina	0,82	0,806
L-Valina	0,82	0,806
L-Treonina	0,82	0,806
L-Triptófano	0,18	0,177
<b>L-Metionina</b>	<b>0,86</b>	<b>2,50</b>
L-Glutamato	2,70	2,655
L-Fenilalanina	1,16	1,141
L-Glicina	2,33	2,291
Dextrina	5	4,917
Almidón de maíz	43,61	42,900
Sacarosa	20	19,670
Celulosa	5	4,917
Colina bitrato	0,2	0,197
Mezcla de vitaminas (AIN)	1	0,983
Mezcla de minerales (AIN)	3,5	3,442
Aceite de maíz	8	7,868
Total (% en peso)	100	100



a los animales del grupo control (*pair feeding*). Al final de los tratamientos se sacrificó a los animales, tras lo cual se extrajeron y pesaron los distintos órganos.

Los parámetros analizados en los 4 órganos de estudio (hígado, corazón, cerebro y riñón) fueron los siguientes:

**1) Mitochondrias funcionales.**

- **Consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) mitocondrial en estado 3, estado 4 e índice de control respiratorio (RCI, *Respiratory Control Index*)** como indicador de la funcionalidad de las mitocondrias aisladas y de su capacidad para producir ATP por fosforilación oxidativa.
- **Producción mitocondrial de radicales libres de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*)** y localización de los sitios donde varía la generación de ROS tras los tratamientos.
- **Fuga de radicales libres** en porcentaje, que indica la eficiencia de la cadena respiratoria para evitar la producción de radicales libres cuando reduce univalentemente el oxígeno.

**2) Daño oxidativo al ADN mitocondrial** mediante la cuantificación de los niveles de 8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG).

**3) Composición de ácidos grasos**, medidos en % respecto de los lípidos totales.

**4) Parámetros globales** que reflejan los diferentes tipos de ácidos grasos de los lípidos totales.

- Suma de los **ácidos grasos saturados** (SFA, *Saturated Fatty Acids*).
- Suma de los **ácidos grasos insaturados** (UFA, *Unsaturated Fatty Acids*).
- Suma de los **ácidos grasos monoinsaturados** (MUFA, *MonoUnsaturated Fatty Acids*).
- Suma de los **ácidos grasos poliinsaturados** (PUFA, *PolyUnsaturated Fatty Acids*).

- Suma de los **ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3** (PUFAn-3).
- Suma de los **ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 6** (PUFAn-6).
- **Longitud media de la cadena** de los ácidos grasos (ACL, *Average Chain Length*).
- **Índice de dobles enlaces** de los ácidos grasos (DBI, *Double Bound Index*).
- **Índice de peroxidizabilidad** de los ácidos grasos (PI, *Peroxidizability Index*).

5) **Marcadores de estrés oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo** en proteínas.

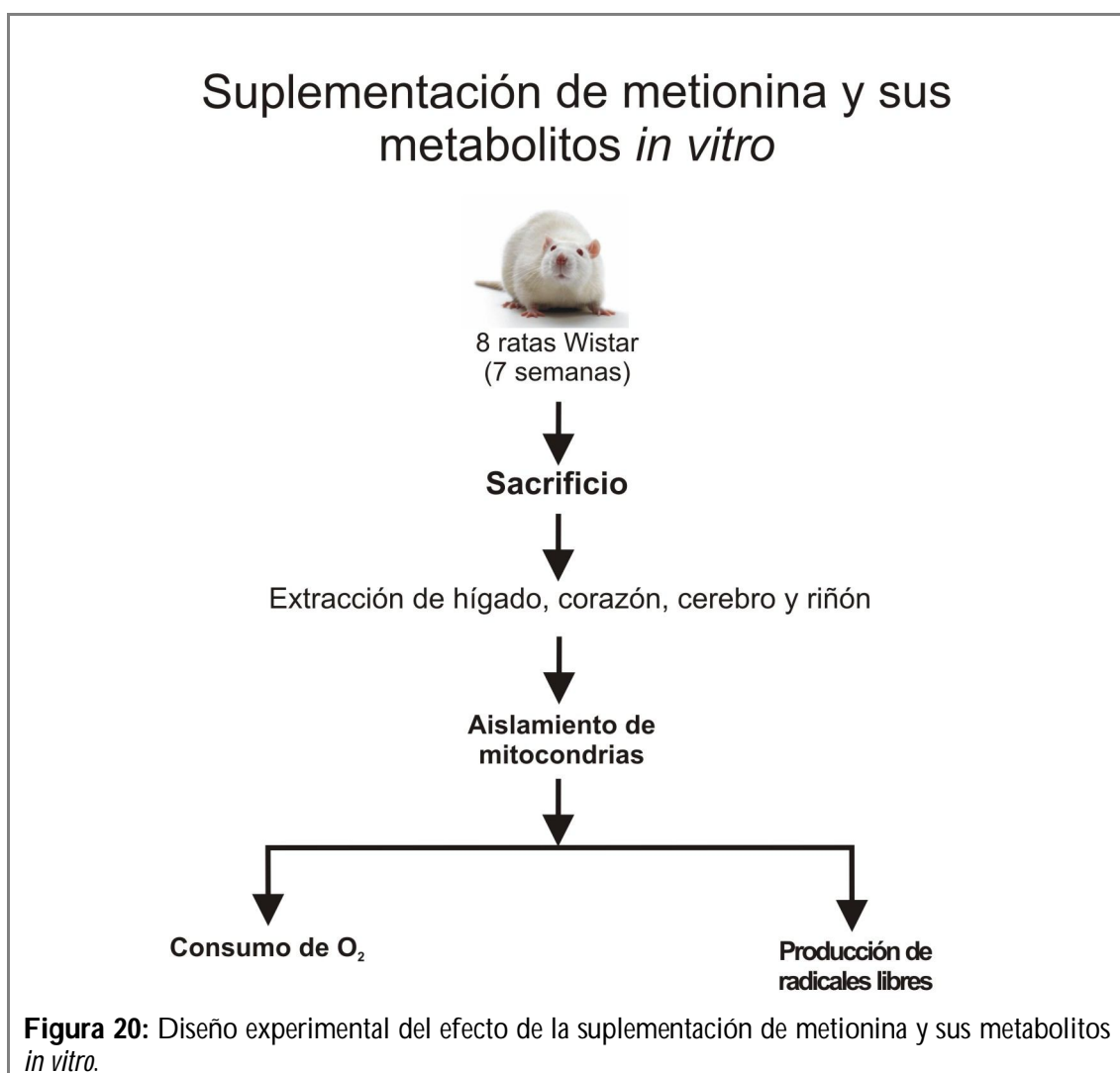
- Cuantificación del **semialdehído glutámico** (GSA).
- Cuantificación del **semialdehído aminoadípico** (AASA).
- Cuantificación de **N<sup>e</sup>-(carboximetil)-lisina** (CML).
- Cuantificación de **N<sup>e</sup>-(carboxietil)-lisina** (CEL).
- Cuantificación de **N<sup>e</sup>-(malondialdehído)-lisina** (MDAL).

6) **Niveles de los distintos complejos mitocondriales de la cadena de transporte electrónico y del factor inductor de la apoptosis (AIF, Apoptosis Inducing Factor).**

7) **Concentración de metionina, S-adenosilmetionina (SAM) y S-adenosilhomocisteína (SAH)** en tejido.

1.1.2.- **Suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro***

En este estudio se utilizaron 8 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) macho de 7 semanas de edad por cada órgano analizado (figura 20). El suministro de agua y comida fue *ad libitum*. En este experimento se utilizó una dieta de mantenimiento de roedores estándar en *pellet*, suministrada por Panlab.



En este caso, los análisis realizados en mitocondrias funcionales de los 4 órganos de estudio fueron los siguientes:

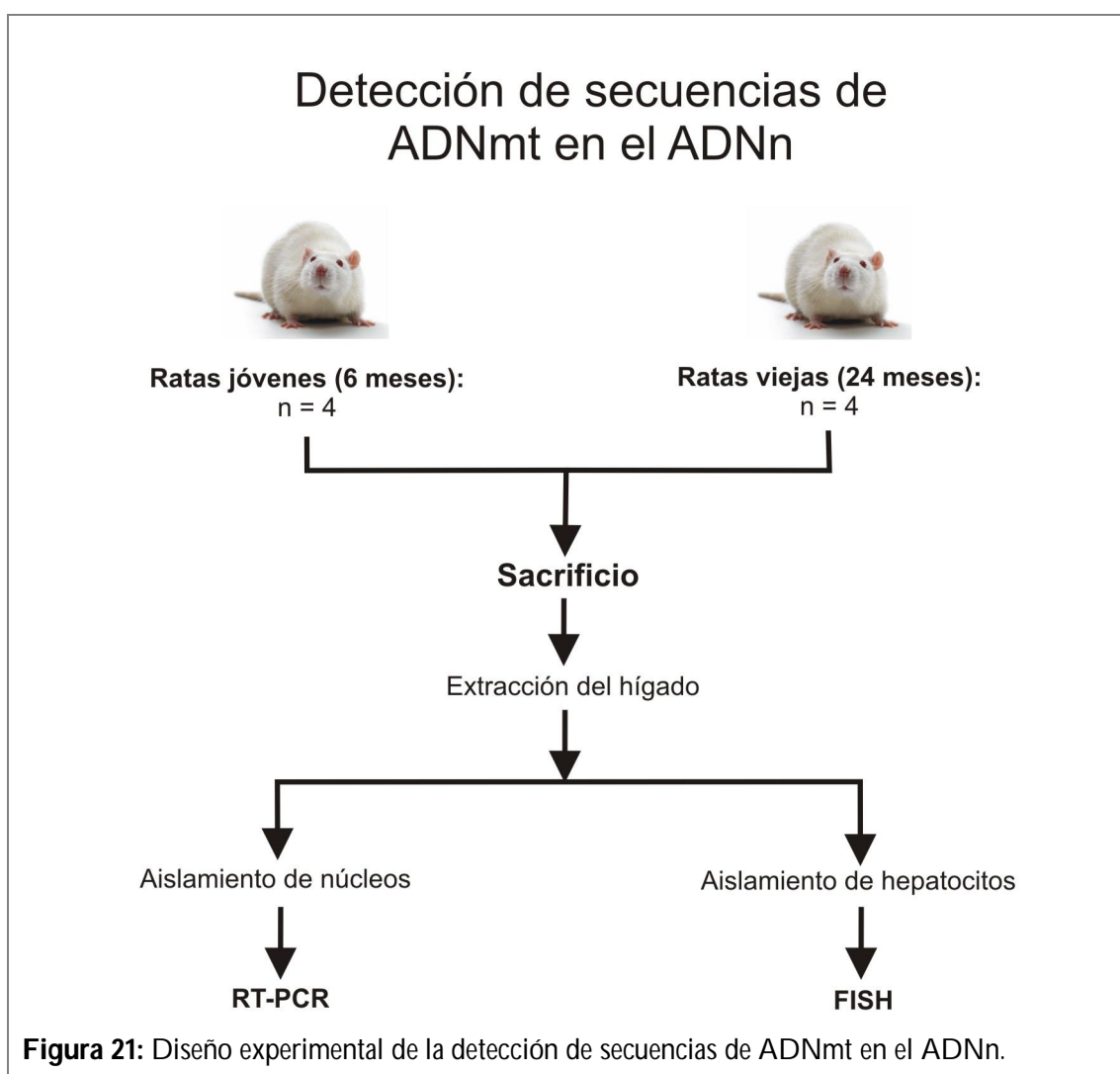
- 1) **Consumo de oxígeno mitocondrial en estado 3 y estado 4.**
- 2) **Producción mitocondrial de radicales libres de oxígeno** y localización de los sitios donde se modifica la generación de ROS.

Ambos ensayos se realizaron en presencia de distintas concentraciones de metionina, SAM, SAH y homocisteína para observar su efecto.

Para descartar posibles interacciones con el método de detección de radicales libres se realizaron ensayos sin mitocondrias usando  $H_2O_2$  directamente como sustrato de dicho sistema en presencia de metionina, SAM, SAH u homocisteína.

## 1.2.- Detección de secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) en el ADN nuclear (ADNn)

Se utilizaron 4 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) macho adultas de 6 meses (jóvenes) y 24 meses (viejas) de edad (figura 21). En este caso, el suministro de agua y comida fue *ad libitum* con dieta de mantenimiento de roedores en *pellet* suministrada por Panlab. Las ratas fueron sacrificadas, se extrajo el hígado y se aislaron los hepatocitos por un lado y los núcleos de los propios hepatocitos por otro, para realizar los siguientes estudios:



- 1) **Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, *Real Time Polymerase Chain Reaction*)** para detectar y cuantificar la cantidad de ADNmt presente en el ADNn en núcleos de hepatocitos de ratas jóvenes y viejas.
  
- 2) **Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*)** para detectar y cuantificar la cantidad de ADNmt presente en el núcleo de hepatocitos de ratas jóvenes y viejas.

## 2.- MATERIALES

### 2.1.- Equipo instrumental

- Agitador magnético P SELECTA Agimatic E 7002431.
- Agitador Vortex P SELECTA Heidolph reax 2000.
- Balanza de precisión METTLER TOLEDO AB54.
- Balanza electrónica AND EW-600<sup>a</sup>.
- Balanza electrónica Gram ST-3100.
- Bomba para HPLC Gilson 305 Pump con Modulo Manometrico 805.
- Bomba para HPLC 1200 Series G2226A.
- Cámara digital Olympus DP70.
- Campana de extracción.
- Centrífuga modelo 5702R, Eppendorff.
- Centrífuga 32R HETTICH ZENTRIFUGEN.
- Centrífuga refrigerada SORBALL INSTRUMENTS RC5C GIRAL.
- Centrífuga refrigerada Heraeus Multifuge 1S-R.
- Columna de HPLC mediterranea sea18 5  $\mu\text{m}$  25X0.46 TEKNOKROMA.
- Columna capilar SP2330 30 m x 0,25mm x 0,20  $\mu\text{m}$ .
- Columna capilar 30 m HP-5MS 30 m x 0,25mm x 0,25  $\mu\text{m}$ .
- Columna de intercambio iónico DOWEX-50W.
- Columna de extracción en fase sólida C-18 de 1 ml (SUPELCO, Bellefonte, PA).

- Columna C18 de fase reversa (Luna 3n pFp(2), 100A, 150 x 2mm ID, Phenomenex, CA, USA).
- Congelador de -80 °C FORMA SCIENTIFIC 823.
- Cromatógrafo de gas HEWLETT-PACKARD 6890 Serie II.
- Cubeta capilar de cuarzo de 0,5 nm (Biochrom).
- Destilador de agua BIBBY MERIT.
- Detector electroquímico Coulochem II ESA.
- Detector UV para HPLC BIORAD UV-1806.
- Electrodo y medidor de oxígeno ESD modelo 600 HANSATECH.
- Equipo ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Barcelona, España).
- Espectrofotómetro MILTON ROY Spectronic 601-C.
- Espectrometro de masas HEWLETT-PACKARD 5973A.
- Evaporador N-evap Model 111 (Organomation Assoc. Inc.)
- Filtros de poliamida 0,45 µm de diámetro de poro SARTORIUS.
- Fluorímetro PERKIN ELMER LS 50B.
- GeneQuant (Amersham Biociences).
- Homogenizador mecánico WHEATON INSTRUMENTS.
- Homogeneizadores vidrio-teflón de 5 ml POBEL.
- Homogeneizadores vidrio-teflón de 2 ml POBEL.
- Horno de columna Eppendorf CH-500.
- LC-MS QTOF (Agilent Technologies, Barcelona, Spain).
- Microcentrífuga BIOFUGE 13 HERAEUS.
- Microscopio Olympus BX61 equipado con un eje Z motorizado.
- Mili Q Gradient A10 Milipak 40, MILIPORE.
- Multiagitador magnético con placa térmica SBS A-08.
- pH/mV-metro CRISON BASIC 20.
- Pipetas automáticas GILSON de 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, y 1000 µl.
- Placa Térmica P SELECTA S INVESTER.
- Programa de integración GILSON.
- Programa Statgraphics Plus 4.0.
- Programa de control del electrodo de oxígeno Oxygraph v1.15.
- RÍOs 8. MILIPORE.
- Sistema de detección iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).
- Software Adobe Photoshop 7.0.

- Software para análisis de datos Masshunter.
- Software de análisis cualitativo Masshunter.
- Software de análisis (Soft Imaging System, Olympus).
- Software Kaleida Graph 3.6.
- Software ImageJ (National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij>).
- Software de procesamiento "3D object counter" plug-in.
- Termostatizador con agitación MEMMERT.
- Termostatizador P SELECTA tectron 3000543.
- Tubos Whatman 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro MILLIPORE.
- Vibrador de brazo oscilante Vibromatic-384

## 2.2.- Productos químicos

*Nombre (Casa comercial, Referencia)*

- 2'-deoxiguanosina (Sigma, D-7145)
- 4',6-diamidina-2-phenylindola (DAPI, Boehringer Mannheim, 236276).
- 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (Sigma, H-5653).
- Acetato potásico (Sigma, P-5708).
- Acetato sódico (Sigma, S-2889).
- Acetonitrilo (Panreac, 221881).
- Ácido acético glacial (Panreac, 141008).
- Ácido clorhídrico (Merck, K35739817 608).
- Ácido fosfórico (Merck, K29868563 146).
- Ácido glutámico (Sigma, G-1376).
- Ácido homovanílico (Sigma, H-1252).
- Ácido málico (Sigma, M-9138).
- Ácido tricloroacético (Panreac, 252373).
- Adenosina 5'-difosfato, ADP (Sigma, A-2754).
- S-Adenosil-L-metionina (Sigma, A7007).
- S-Adenosil-L-homocisteína (Sigma, A9384).
- Agua HPLC (Scharlau, AG-0001).
- Albúmina sérica bovina (Sigma, A-7030).

- Alcohol isoamilo (Merck, K22601379 604).
- Antidigoxigenina de ratón (Boehringer Mannheim, 1333062).
- Anticuerpo anti-mouse conjugado con fluoresceína isothiocinato (FITC) (Boehringer Mannheim 124616).
- Anticuerpo anti-NDUFS3 de Complejo I mitocondrial (1:2000, Invitrogen Ltd, UK).
- Anticuerpo anti-NDUFA9 de Complejo I mitocondrial (1:2000, Invitrogen Ltd, UK).
- Anticuerpo anti-subunidad de 70 kDa de Complejo II mitocondrial (1:500, Invitrogen Ltd, UK).
- Anticuerpo anti-proteína ferro-sulfurada de Rieske de Complejo III mitocondrial (1:2000, Invitrogen Ltd, UK).
- Anticuerpo anti- subunidad II del núcleo de Complejo III mitocondrial (1:1000, Invitrogen Ltd, UK).
- Anticuerpo anti-subunidad 1 de Complejo IV mitocondrial (1:1000, Invitrogen Ltd, UK).
- Anticuerpo anti-AIF (1:1000, Sigma, Madrid, España).
- Anticuerpo anti-Porina mitocondrial (1:1.000, Invitrogen Ltd, UK).
- Antimicina A de *Streptomices sp.* (Sigma, A-8674).
- Biotina-16-dUTP (Boehringer Mannheim, 1093070000).
- Cloroformo (Panreac, 141252 1612).
- Cloruro de magnesio (Sigma M-8266).
- Cloruro de zinc (Merck, B286816 909).
- Cloruro potásico (Sigma, P-9333).
- Colagenasa A (Roche, 103586).
- Cy3 (Amersham PA, 43000).
- d5-2,3,3,4,4-L-glutámico 98 % d min (Isotec).
- Dieta de mantenimiento para roedores (Panlab, A04).
- Dietas semipurificadas (MP biochemicals).
- D-L-lisina-4,4,5,5-d4•2HCl 98 % min. (Isotec)
- Dodecilsulfato sódico (Sigma, L-4509).
- EDTA-Na<sub>2</sub> (Sigma, E-1644).
- EGTA (Sigma, E-4378).
- Ficol PM 400 (Sigma, F4375).

- Fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Sigma, P-5521).
- Fosfato dipotásico (Panreac, 141512).
- Fosfato monopotásico (Panreac, 141509).
- Glicina (Sigma, G-7126).
- Glucosa (Sigma, G-8270).
- Glucosa oxidasa (Sigma, G-0543).
- Helio (Carburos metálicos).
- Hepes (Sigma, H-3375).
- Hidrato de Colato sódico (Sigma, C-1254).
- Hidróxido sódico (Sigma, S8045).
- Homocisteína (Sigma, H4628).
- Isopropanol (Sigma, 34863).
- Kit de ADN polimerasa Tth (Roche Diagnostics-Borhringer Mannheim, Alemania).
- Kit de traducción nick (Boehringer Mannheim, 976776).
- Manitol (Sigma, M-4125).
- Malondialdehído (Sigma, 63287).
- Membrana de diálisis Servapor con un diámetro de 27mm (Serva, 44146).
- Metanol (Panreac, 361091).
- L-Metionina (Sigma, M9625).
- Nitrógeno (Air liquid).
- Nucleasa P1 de *Penicillium citrinum* (Sigma, N8630).
- OptiPrep™ (Axis-Shield).
- Paraformaldehido (Sigma).
- Perclorato sódico (Merck, A699864 614).
- Percoll (Farmacia).
- Peroxidasa de rábano (Sigma, P-8250).
- Pirúvico sódico (Sigma, P-8574).
- Poli L-lisina (Sigma).
- Proteasa. Subtilisina A, Tipo VIII: Bacteriana de *Bacilo licheniformis* (Sigma, P5380).
- RNAsa de páncreas bovino (Roche, 10 109 126 001).
- Rotenona (Sigma, R-8875).
- Sacarosa (Sigma, S-9378).

- Succinato sódico dibásico (Sigma, S-2378).
- Sulfato de cobre (II) (Sigma, 1297).
- Sulfato de Hierro (II) (Panreac, 131362).
- Superóxido dismutasa (Sigma, S-8160).
- Sustrato quimioluminiscente de la HRP (Millipore, MA, USA).
- Tris (Sigma, T-6791).

### **2.3.- Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) macho cuya edad dependió del experimento. Los animales fueron suministrados por Harlam y se alojaron en el animalario de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Se estabularon en jaulas individuales y se mantuvieron durante todo el tratamiento bajo condiciones controladas de temperatura ( $23 \pm 2$  °C), humedad relativa ( $50 \pm 10$  %) y ciclo de luz:oscuridad (12:12 horas).

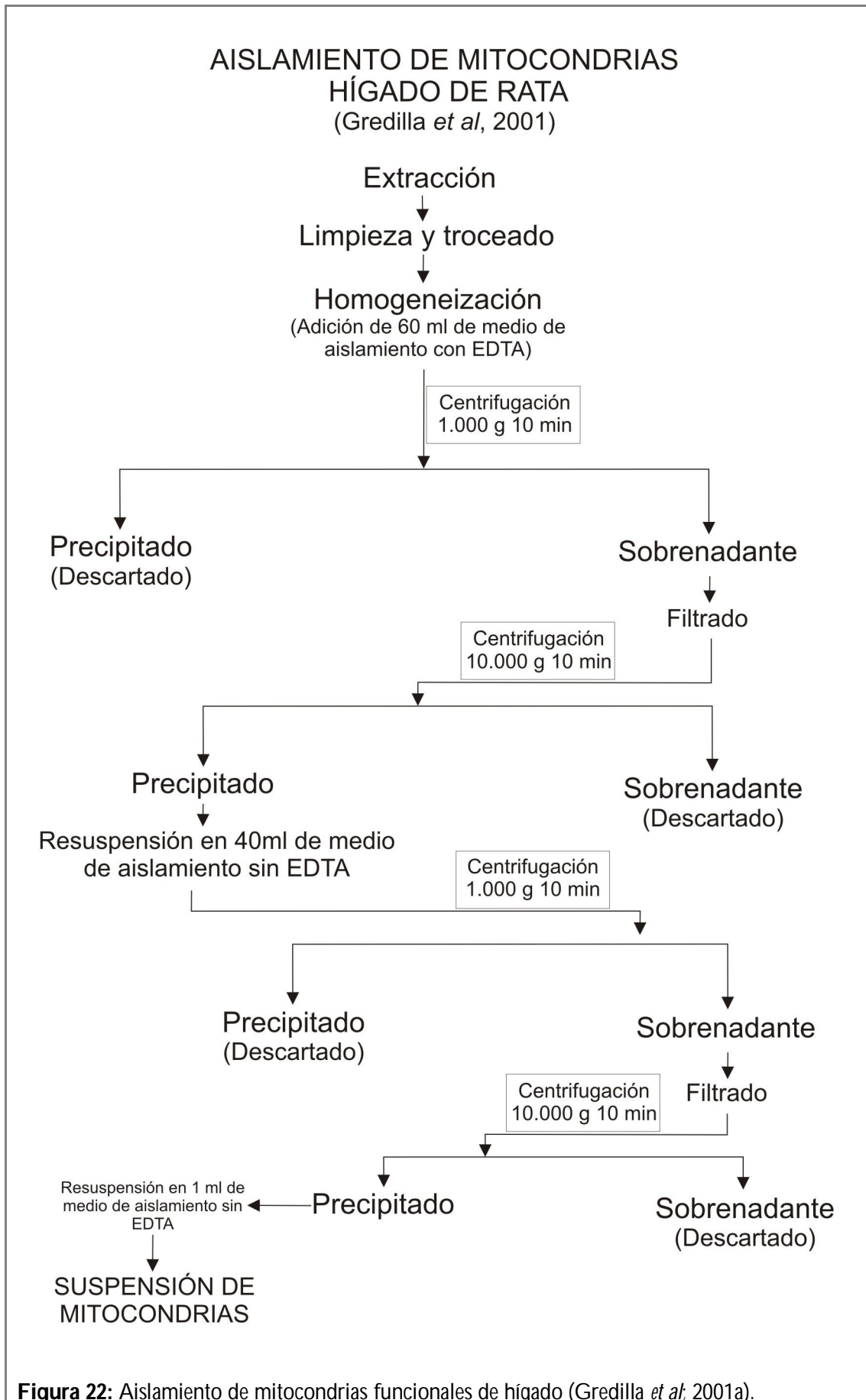
## **3.- MÉTODOS**

### **3.1.- Aislamiento de mitocondrias funcionales**

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación para evitar posibles interferencias de la anestesia con los parámetros a analizar. El órgano de estudio (hígado, corazón cerebro o riñón) fue extraído y procesado inmediatamente para obtener mitocondrias funcionales. Además, una porción del mismo fue congelada en nitrógeno líquido y conservada a -80 °C para análisis posteriores.

#### **3.1.1.- Hígado**

El hígado se procesó siguiendo el protocolo descrito por Gredilla *et al* (2001a) para obtener mitocondrias funcionales (figura 22).



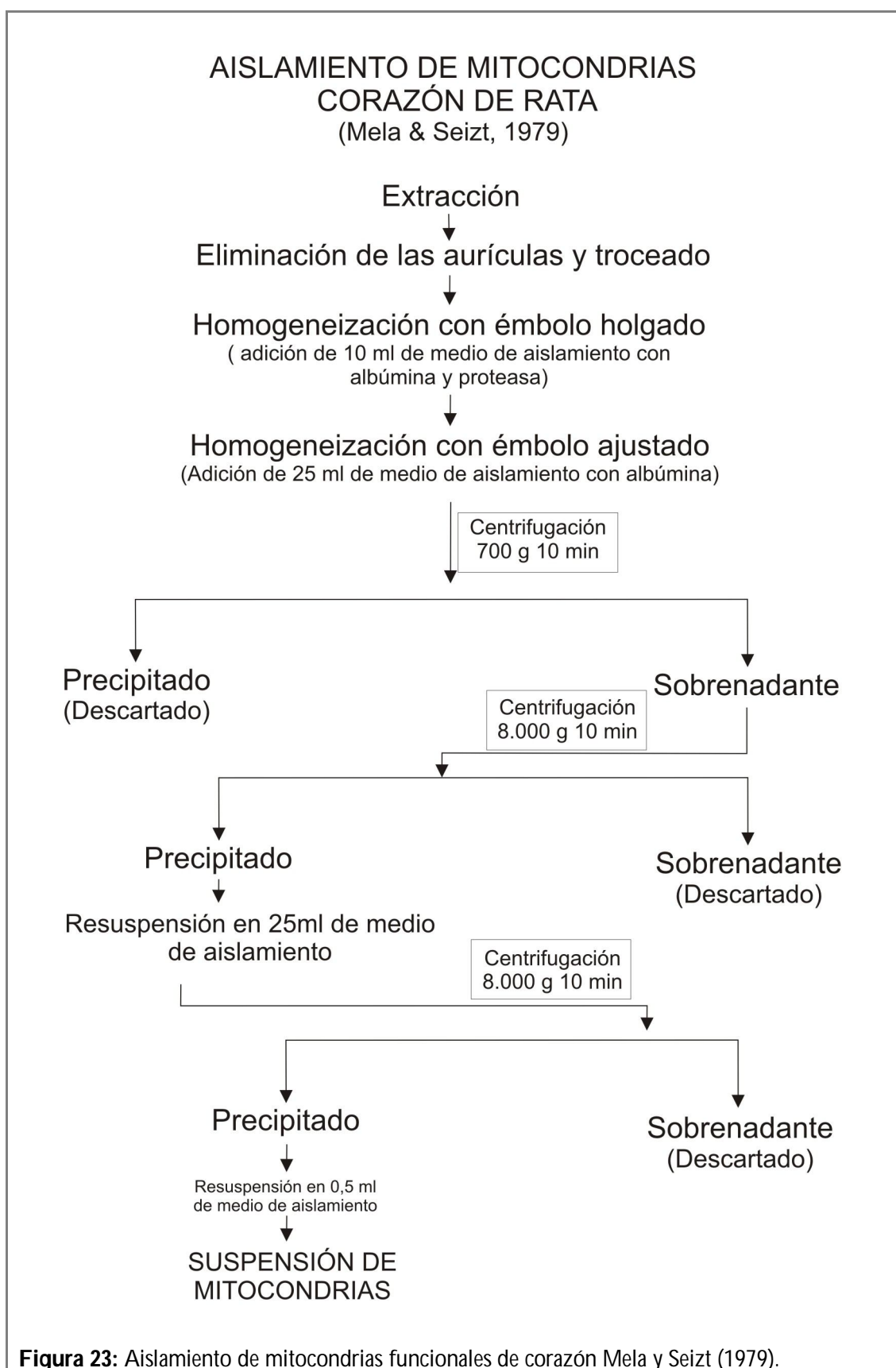
Tras extraer el hígado, éste se depositó en medio de aislamiento con EDTA (manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, hepes 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,35) frío, donde se aclaró bien, quitando la grasa visible para posteriormente trocearlo en fragmentos pequeños.

Seguidamente se homogeneizó en 60 ml de medio de aislamiento con EDTA en frío, para ser centrifugado a 1.000 g durante 10 minutos y eliminar de este modo los núcleos y restos de membranas celulares en el precipitado, mientras que el sobrenadante se filtró centrifugándose a 10.000 g durante 10 minutos. Tras esta centrifugación, se eliminó el sobrenadante, se limpió la grasa que quedó en la pared del tubo, y posteriormente se resuspendió el precipitado en 40 ml de medio de aislamiento sin EDTA. Se realizó una nueva centrifugación a 1.000 g, después de la cual se descartó el precipitado y se filtró el sobrenadante pasando éste a otro tubo donde se centrifugó a 10.000 g. El precipitado de esta última centrifugación se resuspendió en 1 ml de medio de aislamiento sin EDTA, obteniéndose así la suspensión mitocondrial. Todos los procesos descritos se realizaron a 4 °C.

### **3.1.2.- Corazón**

El aislamiento de mitocondrias funcionales a partir de corazón se llevó a cabo según el protocolo de Mela y Seitz (1979) (figura 23).

El corazón se depositó en medio de aislamiento (manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, EDTA 1 mM, y tris 10 mM, pH 7,4) frío, y se troceó en fragmentos pequeños. Se homogeneizó en 10 ml de medio de aislamiento con 5 mg de proteasa (para liberar las mitocondrias de las miofibrillas musculares) y 25 mg de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos con émbolo holgado vidrio-vidrio a 4 °C. Pasado 1 minuto se añadieron 25 ml de medio de aislamiento con 25 mg de albúmina, para posteriormente homogeneizar con un émbolo ajustado vidrio-vidrio.



El homogenado se centrifugó a 700 g durante 10 minutos. A continuación, se recuperó el sobrenadante que fue sometido a una nueva centrifugación a 8.000 g durante

10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 25 ml de medio de aislamiento. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 8.000 g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 0,5 ml de medio de aislamiento. Todos estos procesos se realizaron a 4 °C.

### 3.1.3.- Cerebro

La obtención de mitocondrias funcionales en el caso del cerebro se hizo siguiendo el protocolo descrito por Lai y Clark (1979) (figura 24).

El cerebro se depositó en medio de aislamiento (sacarosa 0.25 mM, EDTA 0,5 mM, tris 10 mM, pH 7,4) frío, y se trocó en fragmentos pequeños.

Seguidamente se homogeneizó en 35 ml de medio de aislamiento en frío con émbolo holgado vidrio-vidrio e inmediatamente después con émbolo ajustado vidrio-vidrio para, a continuación, ser centrifugado a 2.000 g durante 3 minutos y eliminar de este modo los núcleos y restos de membranas celulares en el precipitado. El sobrenadante se pasó a otro tubo para repetir la centrifugación a 2.000 g. Tras esta centrifugación se recogió el sobrenadante, y se centrifugó a 12.500 g durante 8 minutos, obteniéndose las mitocondrias crudas en el precipitado. Este precipitado se resuspendió en 6 ml de ficol al 3 % y, mediante carga inferior, se depositaron 25 ml de ficol al 6 %, procurando no mezclar fases.

El ficol al 6 % se obtuvo a partir de ficol al 30 % dializado en una membrana de diálisis Servapor con un diámetro de 27 mm. La diálisis se realizó en agua ultrapura a 5 °C durante 24 horas. El agua se renovó al menos cada 12 horas. En el ficol al 6 % se diluyó manitol (0,24 M), sacarosa (60 mM), EDTA (50 µM), tris (10 mM), y se ajustó el pH a 7,4. El ficol al 3 % se obtuvo diluyendo el ficol al 6 % con agua ultrapura.

Después de generar el gradiente, se centrifugó a 11.500 g durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 5 ml de medio de aislamiento. Seguidamente se centrifugó a 11.500 g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 35 ml de medio de aislamiento para centrifugarlo por última vez a 11.500 g durante 10 minutos.



Después de esta última centrifugación se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de medio de aislamiento, obteniéndose así la suspensión de mitocondrias no sinápticas. Al igual que en los casos anteriores, todos los procesos descritos se realizaron a 4 °C.

#### **3.1.4.- Riñón**

El riñón se procesó siguiendo un protocolo similar al de aislamiento de mitocondrias de hígado (figura 22), con la diferencia de que los volúmenes utilizados de medio de aislamiento, tanto para homogeneizar como para resuspender, fueron la mitad de los utilizados en el aislamiento del hígado.

### **3.2.- Valoración de proteína mitocondrial**

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

El color lo proporciona el sulfato cúprico (1%), que se une específicamente a los enlaces peptídicos de las proteínas expuestas tras la desnaturalización de las mismas por el colato sódico (4%). Para la formación de los complejos proteína-Cu es necesario un medio con pH alcalino, proporcionado por el NaOH (10%) que se añade a la reacción. Para realizar el ensayo se dispuso de un blanco de agua destilada y tres estándares de 50, 100 y 200 mg/de albúmina sérica bovina (BSA) preparados a partir de una solución madre de 10 mg/ml. La composición de los tubos a ensayar se especifica en la tabla 2.

Tras ser agitados se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm.

**Tabla 2:** Composición de los distintos tubos que se han de ensayar en el método del Biuret.

	Blanco	Estándar 1 (50mg/ml)	Estándar 2 (100mg/ml)	Estándar 3 (200mg/ml)	Muestra (Por duplicado)
Agua destilada (μl)	500	450	400	300	460
BSA (μl)	0	50	100	200	0
Suspensión de mitocondrias (μl)	0	0	0	0	40
Na-colato (μl)	200	200	200	200	200
NaOH (ml)	2	2	2	2	2
CuSO <sub>4</sub> (μl)	300	300	300	300	300

El cálculo de las concentraciones proteicas se realizó a partir de una recta de regresión construida con los datos de los estándares:

$$\text{mg de proteína} = \frac{\text{DO} - a}{b}$$

Donde:

a = punto de intersección con el eje x.

b = pendiente de la recta de regresión.

DO = absorbancia de la muestra.

La recta patrón se repitió cada día en el que se realizaron medidas, se comprobó que el coeficiente de regresión fuera cercano a 1 y se calculó la concentración de proteína mitocondrial a partir de la media de la absorbancia de los duplicados de cada muestra.

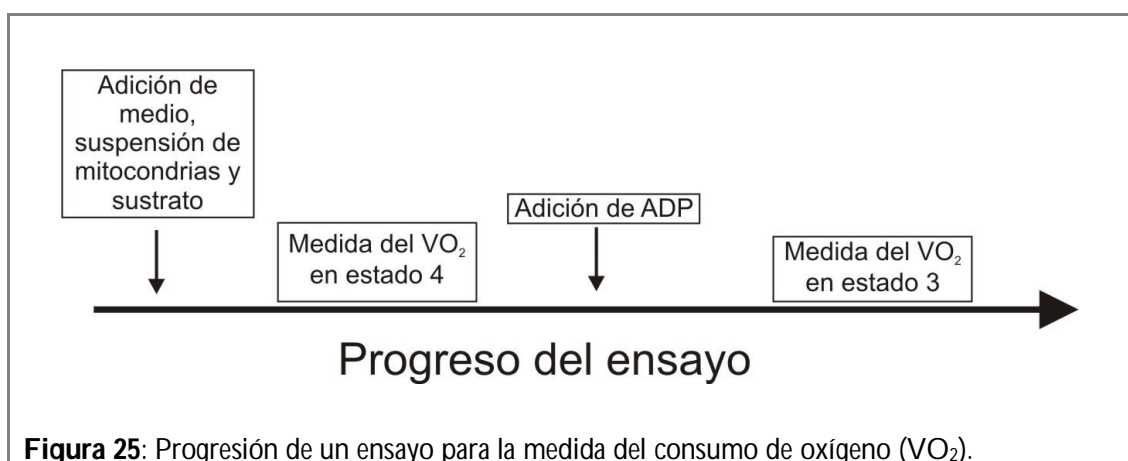
### 3.3.- Consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>)

Las medidas de consumo de oxígeno mitocondrial se realizaron a 37 °C utilizando 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 ánodo de Ag-AgCl empleado como 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 de 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 sustancias del medio de reacción a excepción del oxígeno, ya que éstas podrían dañar el electrodo modificando sus propiedades electroquímicas. Se utilizó un agitador magnético para evitar la formación de gradientes de oxígeno disuelto y depósitos de sustancias que pudieran estar en la mezcla de reacción e interferir en las medidas.

Los ensayos se realizaron con la suspensión mitocondrial obtenida en el aislamiento. Una vez conocida la concentración de proteína de la muestra por el método del Biuret, se añadió a la mezcla de reacción el volumen necesario para tener una concentración óptima de mitocondrias para el ensayo que fue diferente en cada órgano (3 mg/ml en hígado y cerebro, 0,8 mg/ml en corazón y 2 mg/ml en riñón).

Se valoró el consumo de oxígeno de cada muestra con varios sustratos. Primero se valoró el estado 4 (estado no fosforilante) y, posteriormente, el estado 3 (estado fosforilante) mediante la adición de ADP, tal y como se indica en la figura 25. Con estos dos datos se calculó el RCI como medida del grado de acoplamiento entre la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, comprobando de este modo si las mitocondrias están o no en buen estado funcional. Un RCI alto indica la presencia de mitocondrias en buen estado funcional y poco dañadas en el proceso de aislamiento (Barja, 1999b).



**Figura 25:** Progresión de un ensayo para la medida del consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>).

Cada vez que fue necesario cambiar la membrana de polietileno se calibró el aparato. Para esto se dejó la cámara de medida abierta con 1 ml de agua ultrapura. Tras la estabilización de la medida se ajustó el cero de oxígeno mediante el desplazamiento del mismo con nitrógeno. Asimismo, cada día antes de tomar las medidas se realizó una deriva

(índice de consumo de oxígeno por parte del electrodo en ausencia de mitocondrias) para restarla posteriormente a las medidas de consumo de oxígeno de las muestras.

Cada ensayo se realizó en un volumen final de 0,5 ml de los cuales:

- "X" volumen de suspensión mitocondrial (calculado en función de la concentración de proteína de la suspensión mitocondrial obtenida).
- 10  $\mu\text{l}$  de sustrato (piruvato-malato, glutamato-malato o succinato a una concentración de 125 mM cada uno en la solución inicial).
- 10  $\mu\text{l}$  de ADP (25 mM en la solución inicial), una vez se ha medido el estado 4.
- 10  $\mu\text{l}$  de rotenona (100  $\mu\text{M}$  en la solución inicial), solo cuando se usó succinato como sustrato.
- Se completó hasta 0,5 ml con medio de incubación con albúmina (KCl 145 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM,  $\text{H}_2\text{KPO}_4$  5 mM, hepes 30 mM, EGTA 0,1 mM, albúmina de suero bovino al 0,1 %, pH 7,4 ajustado a 37 °C) como indica el protocolo de Barja (1999b).

Para calcular el consumo de oxígeno medido como nmoles  $\text{O}_2$ /(mg proteína x minuto), se utilizó la siguiente fórmula:

$$VO_2 = \frac{a - b}{c}$$

Donde:

a = pendiente del ensayo (nmoles  $\text{O}_2$ /(ml x min)).

b = pendiente de la deriva (nmoles  $\text{O}_2$ /(ml x min)).

c = concentración de proteína utilizada en el ensayo (mg/ml).

De este modo se obtuvo el consumo de oxígeno en estado 3 y estado 4. Una vez obtenidos estos datos se pudo calcular el RCI, según la siguiente fórmula:

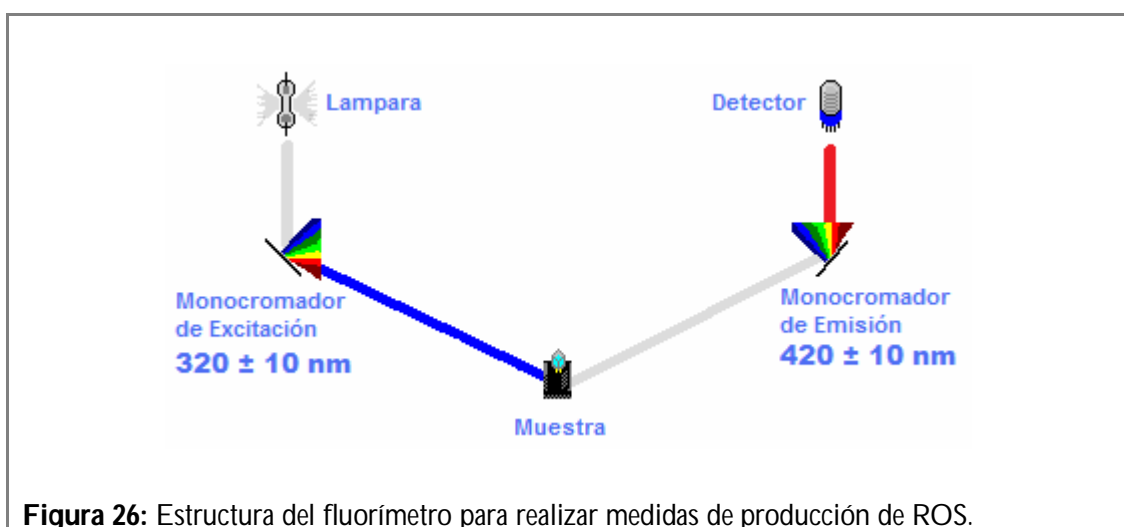
$$RCI = \frac{VO_2 \text{ en estado 3}}{VO_2 \text{ en estado 4}}$$

### 3.4.- Producción de radicales libres de oxígeno (ROS)

La producción mitocondrial de ROS se estimó mediante una técnica fluorimétrica de determinación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Ruch *et al*, 1983) adaptada para trabajar con mitocondrias (Barja, 2002b).

La técnica está basada en la oxidación del ácido homovanílico (HMV) al reaccionar con el  $H_2O_2$  en presencia de peroxidasa de rábano (HRPx), dando lugar a la formación de un dímero fluorescente. Este método se basa en la detección de la fluorescencia de dicho dímero.

Las medidas de fluorescencia (excitación: 312 nm, slit 10 nm; emisión 420 nm, slit 10 nm) se realizaron a punto final y en un volumen total de 1,5 ml (figura 26). Se empleó el mismo medio de incubación usado en las medidas de consumo de oxígeno mitocondrial (KCl 145 mM,  $MgCl_2$  3 mM,  $H_2KPO_4$  5 mM, hepes 30 mM, EGTA 0,1 mM, albúmina de suero bovino al 0,1 %, pH 7 ajustado a 37 °C), en presencia de un volumen de proteína mitocondrial de 0,25 mg/ml, 38  $\mu$ l de HMV (4 mM), 123  $\mu$ l de HRPx (70 U/ml), 12  $\mu$ l de superóxido dismutasa (SOD) (que corresponden a 50 U/ml de SOD en el tubo de ensayo) y 30  $\mu$ l de inhibidor (rotenona 100  $\mu$ M, o antimicina A 500  $\mu$ M) en los ensayos que procediese; finalmente se añadieron 30  $\mu$ l de sustrato piruvato-malato, glutamato-malato, o succinato a una concentración 125 mM cada uno en la solución inicial según correspondiera.



**Figura 26:** Estructura del fluorímetro para realizar medidas de producción de ROS.

En presencia de SOD el ensayo estima la producción mitocondrial de ROS ( $O_2^{\cdot-} + H_2O_2$ ), ya que la enzima añadida en exceso convierte los radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) producidos por la mitocondria en  $H_2O_2$  (Barja, 2002b).

Tras añadir los sustratos, los tubos se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Una vez transcurrido dicho tiempo, la reacción se detuvo introduciendo cada tubo en un baño de hielo y añadiéndole 0,5 ml de glicina 2 M (glicina 2 M, EDTA 50 mM, NaOH 2,2 M). Los ensayos se realizaron por duplicado con sus blancos correspondientes (que se componían de todos los elementos añadidos a la reacción excepto el sustrato correspondiente). Hay que tener en cuenta que los ensayos con antimicina tenían sus propios blancos (con antimicina y sin sustrato) ya que este inhibidor emite fluorescencia propia.

Como estándar se utilizó el sistema glucosa-glucosa oxidasa. En un medio con glucosa en exceso, la enzima genera  $H_2O_2$  a una tasa dependiente de la cantidad de glucosa oxidasa (GO) añadida. El estándar se ensayó paralelamente, en las mismas condiciones que las muestras, en el mismo volumen final (1,5 ml) y utilizando un blanco con la misma composición, salvo que en lugar de añadir 150  $\mu$ l de glucosa se utilizaron 150  $\mu$ l de medio. A cada tubo estándar se le añadieron: 1175  $\mu$ l de medio de incubación, 123  $\mu$ l de HRPx (70 U/ml), 38  $\mu$ l de HMTV (4 mM), 10  $\mu$ l de GO (0,05 U/ml) y 150  $\mu$ l de glucosa (140 mM).

Se estimó la producción mitocondrial de ROS a tiempo final realizando los siguientes cálculos:

$$ROS = \frac{UFM \times F}{P \times S} \times 2,75$$

Donde:

ROS = producción mitocondrial de ROS medida como nmol  $H_2O_2$  / (min x mg proteína).

UFM = unidades de fluorescencia por minuto. Se calcula como:

$$UFM = \frac{\text{Fluorescencia muestra} - \text{Fluorescencia blanco muestra}}{15 \text{ minutos}}$$

F = 2000  $\mu$ l / volumen mitocondrias ( $\mu$ l) (factor de dilución).

P = mg proteína / 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>/minuto x ml.

2,75 = factor de corrección aplicado para adaptar las unidades de glucosa oxidasa de las condiciones descritas por el proveedor (pH 5,1 y 35 °C) a las condiciones en las que se realiza la incubación (pH 7,4 y 37 °C).

### **3.5.- Fuga de radicales libres en porcentaje (% FRL, *percent Free Radical Leak*)**

Las medidas de consumo de oxígeno y de producción de ROS mitocondrial se realizaron en las mismas muestras y bajo las mismas condiciones (medio de incubación, concentraciones de sustratos e inhibidores, temperatura, y pH). Esto permitió relacionar estas medidas, muestra a muestra, para calcular el % FRL.

Este factor 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 el O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, y solamente 2 para reducirlo a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el % FRL se calculó como la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dividida por dos veces el consumo de oxígeno, multiplicado por 100.

$$\% \text{ FRL} = 100 \times \frac{\text{Producción de H}_2\text{O}_2}{2 \times \text{VO}_2}$$

Por ejemplo, un resultado del 6 % indica que el 6 % de los electrones que fluyen hasta el final de la cadena de transporte de electrones se combinan con el oxígeno para formar ROS.

### **3.6.- Determinación del daño oxidativo al ADN mitocondrial**

La cuantificación del daño oxidativo al ADN mitocondrial se llevó a cabo mediante la valoración de los niveles del deoxinucleósido oxidado 8-oxo-7,8-dihidro-2'-

deoxiguanosina (8-oxodG) en relación al deoxinucleósido no oxidado deoxiguanosina (dG). Dicha valoración se realizó mediante separación de las bases por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), para su posterior detección coulométrica, en el caso de la 8-oxodG, y ultravioleta, en el caso de la dG.

### 3.6.1.- Aislamiento de ADN mitocondrial

El aislamiento del ADNmt se realizó según el método de Latorre *et al* (1986) adaptado a mamíferos por Asunción *et al* (1996).

Se partió de las muestras de tejido conservadas a - 80 °C, se tomaron entre 200 y 300 mg de cada muestra (400 y 500 mg en el caso del hígado) y se homogeneizaron. La homogeneización se realizó a 4 °C añadiendo de 1,5 ml de tampón de homogeneización (TRIS 10 mM, NaCl 60 mM, sacarosa al 5% y EDTA-Na<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,8) por gramo de tejido. Posteriormente se mezclaron:

- 300 µl de homogenado.
- 300 µl de tampón (TRIS 10 mM, SDS al 1,25 %, sacarosa al 5 %, EDTA-Na<sub>2</sub> 10 mM, pH 9).
- 400 µl de cloroformo:alcohol isoamilo (49:1, v/v).

Se agitó hasta que se mezcló completamente y se centrifugó a 500 g durante 10 minutos a 4 °C. Se recogió la fase superior y se incubó a 65 °C durante 30 minutos. De este modo, se rompieron las membranas y se liberó el contenido celular, a la vez que se desnaturalizaron las proteínas por la acción del SDS. A continuación, se añadió 0,12 ml de acetato potásico 3 M (pH 4,8) y se incubó a - 20 °C durante 10 minutos. El descenso del pH y la alta concentración de sales provocaron la precipitación del ADN de alto peso molecular, es decir, el ADNn. Además el potasio facilitó su precipitación al formar complejos con las proteínas unidas a SDS.

Después de la descongelación de las muestras a temperatura ambiente, éstas se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C, y se recuperó el sobrenadante que

contenía el ADNmt, mientras que en el sedimento quedaron restos celulares, complejos SDS-proteína y ADNn.

El sobrenadante se mantuvo en hielo y se le añadió un volumen igual de isopropanol. Tras la mezcla por inversión se pudo observar el ADN como turbidez en la suspensión. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante quedando en el sedimento el ADNmt parcialmente purificado, que fue resuspendido en 0,5 ml de etanol al 70 % frío (-20 °C).

Se realizó una última centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C, se decantó el etanol y se secó el precipitado con nitrógeno. Las muestras fueron resuspendidas en 300 µl de tampón TE (TRIS-HCl 10 mM, EDTA- Na<sub>2</sub> 1 mM, pH 8) con ayuda de una pipeta automática y se añadieron 112,5 U de RNasa (disuelta en 25 µl de tampón TE). Se incubaron a temperatura ambiente durante 6 minutos, tras los cuales se añadieron 0,3 ml de SDS al 0,1 % (pH 12,5). Se volvieron a incubar otros 6 minutos a 65 °C, se añadieron 230 µl de acetato sódico 3 M (pH 4,8) y se incubaron nuevamente durante 20 minutos a -20 °C.

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se añadió un volumen igual de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 6 minutos.

Se realizó una nueva centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 0,5 ml de etanol al 70 % frío (- 20 °C), volviéndose a centrifugar a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se decantó el etanol y se secó el precipitado con nitrógeno. Se evitó que el precipitado se secara en exceso ya que esto podría producir una oxidación artificial de la dG que sobrevaloraría la oxidación de ADN de la muestra. Finalmente se añadió 35 µl de tampón TE (TRIS-HCl 10 mM, EDTA- Na<sub>2</sub> 1 mM, pH 8) al precipitado y se mantuvo durante 2 días a 4 °C, tras los cuales se resuspendió con ayuda de una pipeta automática.

### **3.6.2.- Determinación de la concentración de ADN en la muestra**

Una vez resuspendida la muestra, se tomó una alícuota de 3  $\mu$ l para determinar la concentración de ADN. Se introdujeron estos 3  $\mu$ l de muestra en un capilar de cuarzo para medir la concentración y la pureza del ADN extraído por espectrometría utilizando un GeneQuant.

### **3.6.3.- Digestión del ADN**

Una vez determinada la concentración de ADN se añadieron 40  $\mu$ l de acetato sódico 3 M (pH 4,8) y 800  $\mu$ l de etanol al 70 % frío (- 20 °C) a las muestras, se centrifugaron a 10.000 g a 4 °C durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Se añadió 1 ml de etanol al 70 % frío (- 20 °C) volviéndose a centrifugar durante 5 minutos. Se decantó el etanol y se secó el precipitado con nitrógeno, evitando el secado excesivo para prevenir la oxidación artificial del ADN.

El precipitado se resuspendió en 150  $\mu$ l de acetato sódico 20 mM (pH 4,8) con ayuda de un vortex y después se incubó a 50 °C durante 1 hora. Tras la incubación se añadió 5 unidades de nucleasa P1 (disuelta en 20  $\mu$ l de acetato sódico 20 mM, cloruro de zinc 10 mM y glicerol al 15 %, pH 4,8) a las muestras y se incubó durante 30 minutos a 50 °C. A continuación, se añadió 1 unidad de fosfatasa alcalina (disuelta en 20  $\mu$ l de TRIS 1M, pH 4,8) y se incubó durante 1 hora a 50 °C (Loft & Poulsen, 1999).

Por último, las muestras se transfirieron a Eppendorffs con filtro Whatman y se centrifugaron en una microfuga a 13.000 rpm durante 20 minutos.

### **3.6.4.- Condiciones cromatográficas**

Se inyectaron 100  $\mu$ l de muestra en un sistema HPLC en el que se utilizó una fase móvil acuosa compuesta por ácido fosfórico 50 mM y acetonitrilo al 6 %, pH 5. Para preparar esta fase móvil se utilizó agua comercial de grado HPLC que se pasó por unos filtros de 0,45  $\mu$ m de diámetro de poro. El sistema se mantuvo con un flujo de 0,9 ml/min

con una presión aproximada de 1.500 psi mediante una bomba Gilson 305 con un modulo nanométrico Gilson 805, en una columna mediterránea sea18 (5  $\mu\text{m}$  25x0,46) de Teknokroma que se mantenía a 30 °C con un horno de columna Eppendorf CH-500.

Para la determinación de los niveles de 8-oxodG se utilizó un detector culométrico ajustado a unas condiciones de 275 mV/20 nA, mientras que para la valoración de la dG se utilizó un detector ultravioleta Biorad ajustado a 254 nm y con una sensibilidad de 0,64.

### 3.6.5.- Cálculo de las concentraciones de dG y 8-oxodG

Para cuantificar las muestras se inyectaron cada día 100  $\mu\text{l}$  de estándares puros de 8-oxodG (10 nM) y dG (100  $\mu\text{M}$ ). Ambos estándares estaban disueltos en una mezcla de tampón acetato sódico 10 mM (pH 4,8) y tampón TRIS 1M (pH 8) en una proporción 11:1.

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

$$[8oxodG] = Area_{8oxodG} \times \frac{10}{A_{8oxodG}}$$

Donde:

[8oxodG] = concentración de 8oxodG en la muestra (nM).

Area<sub>8oxodG</sub> = área del pico de 8-oxodG de la muestra.

A<sub>8oxodG</sub> = área del pico de 8-oxodG del estándar.

Asimismo, la concentración de dG se calcula mediante la siguiente expresión:

$$[dG] = Area_{dG} \frac{100}{A_{dG}}$$

Donde:

[dG] = concentración de dG en la muestra ( $\mu\text{M}$ ).

Area<sub>dG</sub> = área del pico de dG de la muestra.

$A_{dG}$  = área del pico de dG del estándar.

Finalmente, el índice 8-oxodG /  $10^5$  dG nos indica el daño oxidativo al ADN y se calcula de la siguiente forma:

$$\frac{8oxodG}{10^5 \times dG} = \frac{100 \times 8oxodG}{dG}$$

### **3.7.- Composición de los ácidos grasos procedentes de los lípidos totales**

#### **3.7.1.- Preparación de las muestras**

Las muestras del tejido se homogeneizaron en tampón hepes 10 mM, pH 7,4, suplementado con BHT 1  $\mu$ M, DETAPAC 1 mM y ácido fítico 1 mM, como antioxidantes; y con leupeptina (0,5  $\mu$ g/ml), aprotinina (0,5  $\mu$ g/ml), pepstatina (0,7  $\mu$ g/ml), fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) (40  $\mu$ g/ml) y EDTA (1,1 mM) como inhibidores de la proteólisis. La extracción de lípidos de las muestras se hizo utilizando cloroformo:metanol en una proporción 2:1 (v/v) según Folch *et al* (1957).

#### **3.7.2.- Extracción de lípidos**

Se tomó 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. 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  $\mu$ l de disulfuro de carbono (CS<sub>2</sub>) como vehículo para su posterior análisis mediante

cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS, *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*).

### 3.7.3.- 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 consistió 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 % respecto al total de lípidos.

### 3.7.4.- Cálculo de los índices relacionados con la composición lipídica

El cálculo de los diferentes índices se realizó según las siguientes expresiones:

- El contenido de ácidos grasos saturados (**SFA**):  

$$\text{SFA} = [\sum\% \text{mol} (8:0 + 10:0 + 11:0 + 12:0 + 13:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0 + 20:0 + 24:0)]$$
- El contenido de ácidos grasos insaturados (**UFA**):  

$$\text{UFA} = [\sum\% \text{mol} (16:1 + 18:1 + 18:2 + 18:3 + 18:4 + 20:1 + 20:2 + 20:3 + 20:4 + 20:5 + 22:4 + 22:5 + 22:6)]$$
- El contenido de ácidos grasos monoinsaturados (**MUFA**):  

$$\text{MUFA} = [\sum\% \text{mol} (16:1 + 18:1 + 20:1 + 24:1)]$$
- El contenido de ácidos grasos poliinsaturados (**PUFA**):  

$$\text{PUFA} = [\sum\% \text{mol} (18:2 + 18:3 + 18:4 + 20:2 + 20:3 + 20:4 + 20:5 + 22:4 + 22:5 + 22:6 + 24:5 + 24:6)]$$
- El contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3 (**PUFA<sub>n-3</sub>**):  

$$\text{PUFA}(n-3) = [\sum\% \text{mol} (18:3 + 20:5 + 22:5n-3 + 22:6 + 24:5 + 24:6)]$$

- El contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 6 (**PUFAn-6**):  

$$\text{PUFA(n-6)} = [\Sigma\% \text{mol (18:2 + 18:4 + 20:2 + 20:3 + 20:4 + 22:4 + 22:5n-6)}]$$
- La longitud media de la cadena (**ACL**):  

$$\text{ACL} = [(\Sigma\% \text{mol total } C_8 \times 8) + (\Sigma\% \text{mol total } C_{10} \times 10) + (\Sigma\% \text{mol total } C_{11} \times 11) + (\Sigma\% \text{mol total } C_{12} \times 12) + (\Sigma\% \text{mol total } C_{13} \times 13) + (\Sigma\% \text{mol total } C_{14} \times 14) + (\Sigma\% \text{mol total } C_{15} \times 15) + (\Sigma\% \text{mol total } C_{16} \times 16) + (\Sigma\% \text{mol total } C_{17} \times 17) + (\Sigma\% \text{mol total } C_{18} \times 18) + (\Sigma\% \text{mol total } C_{20} \times 20) + (\Sigma\% \text{mol total } C_{22} \times 22) + (\Sigma\% \text{mol total } C_{24} \times 24)]/100$$
- El índice de dobles enlaces (**DBI**):  

$$\text{DBI} = [(1 \times \Sigma\% \text{ácidos monoenoicos}) + (2 \times \Sigma\% \text{ácidos dienoicos}) + (3 \times \Sigma\% \text{ácidos trienoicos}) + (4 \times \Sigma\% \text{ácidos tetraenoicos}) + (5 \times \Sigma\% \text{ácidos pentaenoicos}) + (6 \times \Sigma\% \text{ácidos hexaenoicos})]$$
- El índice de peroxidizabilidad lipídica (**PI**; Witting & Horwit, 1964):  

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

### 3.8.- Determinación del daño oxidativo a proteínas

#### 3.8.1.- Extracción de proteínas

Tras realizar la preparación de muestras y la separación de los lípidos, tal y como se indica en el apartado 3.7.1, se tomó la fase acuosa y se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 10 % (concentración en la mezcla de precipitación). La precipitación se aceleró mediante una centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. 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 a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Este último paso se repitió dos veces.

### 3.8.2.- Síntesis de los estándares internos

Para la síntesis de los diferentes estándares internos (deuterados y no deuterados) se utilizaron los siguientes procedimientos. Así la N<sup>ε</sup>-(carboximetil)-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>-(carboxietil)-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). El MDA se preparó inmediatamente antes de su uso por hidrólisis de su forma dimetilacetal con 1 ml de HCl 1 M 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 semialdehído glutámico (GSA) y semialdehído aminoadípico (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, que se convirtió en el correspondiente éster metílico mediante el tratamiento con ácido metanólico-HCl. Después de la evaporación, el producto fue tratado 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 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, mientras se calentaba a 60 °C durante 20 minutos 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-ftalaldehído (OPA). El área media de los aminoácidos 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).

### 3.8.3.- Análisis de AASA, CEL, CML, MDAL y GSA

Las concentraciones de GSA, AASA, CML, CEL y GSA se determinaron por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) según Pamplona *et al* (1999b, 2000b). 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 1 ml de HCl 6 N e incubando a 155 °C durante 30 minutos. Los hidrolizados obtenidos se rehidrataron en 1 ml de ácido trifluoroacético al 1 % y se aplicaron a columnas de extracción en fase sólida C-18 de 1 ml (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 metil ésteres 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 seguido 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  $\mu$ l de cloruro de metileno y centrifugarlos a 800 g durante 5 minutos para eliminar los posibles precipitados. Los sobrenadantes se traspasaron a viales y se inyectaron alícuotas de 2  $\mu$ l en el sistema de GC/MS para su análisis y cuantificación.

#### **3.8.4.- Condiciones cromatográficas**

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  $\mu$ m) 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, 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 un m/z de 180) y d8-lisina (con un m/z de 187); GSA (con un m/z de 280) y d5-GSA (con un m/z de 285); AASA (con un m/z de 294) y d4-ASSA (con un m/z de 298); CML (con un m/z de 392) y d4-CML (con un m/z de 396); CEL (con un m/z de 379) y d4-CEL (con un m/z de 383); y MDAL (con un m/z de 474) y d8-MDAL (con un m/z de 482). Las concentraciones finales se expresaron en  $\mu$ moles de GSA, AASA, CML, CEL o MDAL/mol lisina.

### **3.9.- Determinación de la concentración de los complejos I, II, III y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y de AIF**

La concentración de los complejos mitocondriales I y III, que contienen los generadores de radicales libres, y los complejos II y IV, que no producen ROS, y la concentración de AIF se determinó mediante el análisis de Western Blot (Pamplona *et al*, 2005; Sanz *et al*, 2006a; y Caro *et al*, 2008).

La concentración proteica se determinó por el método de Bradford (1976). Para realizar la inmunodetección se utilizó un anticuerpo monoclonal específico para las subunidades NDUFS3 (30 kDa) y NDUF9 (39 kDa) del complejo I; la subunidad de 70 kDa del complejo II; la proteína ferro-sulfurada de Rieske (29,6 kDa) y la subunidad II del núcleo (48,5 kDa) del complejo III y la subunidad I del complejo IV (57 kDa) (diluciones 1:2000, 1:2000, 1:500, 1:2000, 1:1000 y 1:1000, respectivamente, Molecular Probes, Invitrogen Ltd, UK) y anticuerpos monoclonales específicos para el segmento C-terminal (comprendido del aminoácido 593 al 613) de AIF (1:1000; Sigma, Madrid, España). Como control se utilizó un anticuerpo anti-porina (1:15000, Molecular Probes, Invitrogen Ltd, UK) para referir la cantidad total de las subunidades analizadas de los complejos I, II III y IV frente a la masa mitocondrial total, representada por la cantidad de porina. Se utilizó un anticuerpo secundario apropiado y un sustrato quimioluminiscente de la HRP (Millipore, MA, USA) para la detección del anticuerpo primario. La cuantificación y grabación de la señal fue realizada con un equipo ChemiDoc de BioRad. Los datos se expresan en unidades arbitrarias.

### **3.10.- Determinación de la concentración de metionina, S-adenosilmetionina (SAM) y S-adenosilhomocisteína (SAH) por LC ESI-QTOF MS**

Metionina, SAM y SAH fueron detectadas y cuantificadas mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo mas tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*) funcionando en modo positivo de ionización *electrospray* (LC ESI-QTOF MS).

Se homogeneizaron 100 mg de tejido congelado en un mortero enfriado con nitrógeno líquido y se transfirieron a un vial previamente pesado que contenía 200  $\mu\text{l}$  de una solución compuesta por acetato amónico 0,1 %, ácido heptafluorobutírico 0,1 % y 440 pmoles de d3-Met deuterada (como estándar interno), pH 2,5. La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 minutos y fue calentada a 80 °C durante 5 minutos para precipitar las proteínas endógenas. Inmediatamente después, las muestras se enfriaron en hielo durante 2 minutos y fueron centrifugadas durante 15 minutos a 14.000 g para eliminar todas las partículas. Por último, los sobrenadantes se transfirieron a Eppendorffs con filtro Whatman y se centrifugaron en una microfuga a 13.000 rpm durante 15 minutos.

Las muestras fueron analizadas usando un sistema LC ESI-QTOF MS. Se inyectó una alícuota de 8  $\mu\text{l}$  de cada muestra procesada en una columna C18 de fase reversa (Luna 3n pFp(2), 100A, 150 x 2 mm ID, Phenomenex, CA, USA). Se usó un flujo de 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  con un solvente A compuesto de agua con un 0,1 % de ácido fórmico y un solvente B compuesto de un 95% de acetonitrilo y 5 % de agua conteniendo un 0,1 % de ácido fórmico. El gradiente se componía de varias fases: Solvente B al 0 % durante 5 minutos, seguidamente se incrementó gradualmente el porcentaje de solvente B hasta llegar al 100 % en un tiempo de 20 minutos para posteriormente, mantener el 100 % de solvente B durante 5 minutos. Finalmente se reequilibró a un 100 % de solvente A en un tiempo de 6 minutos. Los datos fueron obtenidos en un modo positivo de electrospray funcionando en modo full-scan de 100 a 3000 m/z. El voltaje capilar fue de 3500 V con una pendiente de 1 scan/s. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador (flujo del gas, 5 l/min; temperatura del gas, 325 °C).

La cuantificación se realizó mediante curvas de estándares externos y estándares internos deuterados (d3-Met). Se observó linealidad en el rango de concentraciones estudiadas: 0,07-335  $\mu\text{M}$ , 0,25-50  $\mu\text{M}$  y 0,26-130  $\mu\text{M}$  para metionina, SAM y SAH, respectivamente. Se utilizó el software para análisis de datos Masshunter para obtener los resultados y el software de análisis cualitativo Masshunter para la integración y la extracción de intensidades en los picos. Los valores m/z usados para la cuantificación fueron: 150,0533 m/z  $[\text{M}+\text{H}]^+$  para metionina; 399,14506 m/z  $[\text{M}+\text{H}]^+$  para SAM; 385,12886 m/z  $[\text{M}+\text{H}]^+$  para SAH; y 153,07716 m/z  $[\text{M}+\text{H}]^+$  para d3-Met. Los resultados se expresaron como nmol/g de tejido. Se calculó la razón SAM/SAH, denominada

potencial de metilación, como parámetro cuantitativo de las reacciones de metilación intracelulares.

### **3.11.- Ensayos *in vitro* de metionina, S- adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH) y homocisteína**

Para analizar el efecto *in vitro* de metionina, SAM, SAH y homocisteína se añadieron estos metabolitos tanto en la reacción de producción de ROS, como en los ensayos de consumo de oxígeno, a distintas concentraciones dentro de los rangos fisiológicos (Harper, 1968; Finkelstein & Martin, 1986; Regina *et al*, 1993; Troen *et al*, 2003; Devlin AM *et al*. 2004; Melse-Boonstra *et al.*, 2005; Verhoef *et al*, 2005; Velez-Carrasco *et al*, 2008).

En el caso de las medidas de producción de ROS, los ensayos se realizaron tal y como se indica en el apartado 3.4 (Producción de ROS) de esta misma sección. Antes de iniciar la reacción con el sustrato, se añadieron: 30  $\mu$ l ó 21  $\mu$ l de metionina 5mM; 100  $\mu$ l ó 50  $\mu$ l de SAM 7,5 mM; 100  $\mu$ l ó 20  $\mu$ l de SAH 7,5 mM; 20  $\mu$ l ó 5  $\mu$ l de homocisteína 7,5 mM según correspondía. Ninguno de estos metabolitos presenta fluorescencia a estas concentraciones a las longitudes de onda de excitación y de emisión utilizadas.

Para comprobar si los metabolitos, a las concentraciones utilizadas, interfieren con el método de detección de ROS, se realizaron ensayos con el sistema de glucosa-glucosa oxidasa con los distintos metabolitos, tal y como se indica en el apartado 3.4 (Producción de ROS) de esta misma sección. Ningún metabolito salvo la homocisteína interfirió con el sistema de detección.

Para minimizar la interferencia de la homocisteína fue necesario realizar un ensayo directamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para ello, a cada tubo se le añadieron: 1175  $\mu$ l de medio de incubación (KCl 145 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> 5 mM, hepes 30 mM, EGTA 0,1 mM, albúmina de suero bovino al 0,1%, pH 7,4 ajustado a 37 °C), 123  $\mu$ l de HRPx (70 U/ml), 38  $\mu$ l de HMV (4 mM), y la concentración adecuada de homocisteína. Pasados 15 minutos a 37 °C se añadieron 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (75  $\mu$ M). Tras una incubación de 3 minutos a 37 °C, se añadieron 0,5 ml de una solución de glicina (glicina 2 M, EDTA 50 mM, NaOH 2,2 M). Los blancos llevaban todos estos elementos excepto el metabolito y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A

continuación se realizaron las medidas de fluorescencia tal y como se indica en el apartado 3.4 (Producción de ROS) de esta misma sección. La fluorescencia corregida de los ensayos con homocisteína se obtuvo según la siguiente expresión:

$$FC = FM \times \frac{F(H_2O_2)}{F(H_2O_2 + HCys)}$$

Donde:

FC = Fluorescencia corregida en presencia de homocisteína.

FM = Fluorescencia medida en presencia de homocisteína.

F(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) = Fluorescencia del ensayo con peróxido de hidrógeno.

F(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + HCys) = Fluorescencia del ensayo con peróxido de hidrógeno en presencia de homocisteína.

Esta fluorescencia corregida se utilizó en la fórmula del apartado 3.4 (Producción de ROS) para calcular la producción de ROS en nmol/(min x mg proteína).

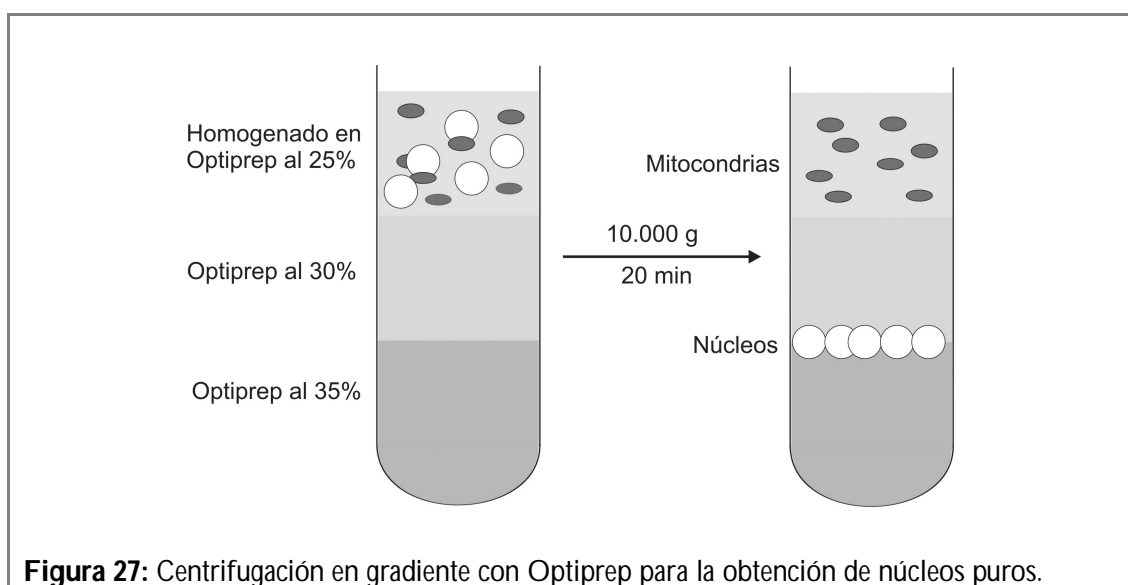
En el caso de las medidas de consumo de O<sub>2</sub>, se siguió el protocolo tal y como se indica en el apartado 3.3 (Consumo de oxígeno) de esta misma sección salvo que, antes de iniciar el ensayo con el sustrato, se añadieron: 10 µl de metionina (5 mM), 33,3 µl de SAM (7,5 mM), 33,3 µl de SAH (7,5 mM), ó 26,7µl de homocisteína (7,5 mM), según correspondiera.

### **3.12.- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)**

#### **3.12.1.- Aislamiento de núcleos**

Los núcleos de los hepatocitos fueron purificados mediante bandeo isopícnico en un medio isoosmótico y no iónico usando un gradiente de centrifugación OptiPrep (Graham *et al*, 1994). El hígado fue homogeneizado en 3 ml de medio de homogeneización (sacarosa 0,25 M, KCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, tricina-KOH 20 mM, pH 7,8) por g de tejido. Se mezclaron 3 ml de este homogenado en proporción 1:1 con una solución de trabajo (KCl

150 mM,  $MgCl_2$  30 mM, tricina-KOH 120 mM, pH 7,8) que contenía un 50% (p/v) de OptiPrep. La muestra fue transferida a un tubo de centrifuga y mediante carga inferior se generó un gradiente con una capa compuesta por 5 ml de una solución de OptiPrep al 30 % más otra capa formada por 5 ml de OptiPrep al 35 % en el fondo del tubo. Después de centrifugar la muestra a 10.000 g durante 20 minutos en un rotor de ángulo variable se recogió la banda de núcleos de la interfase formada entre las capas de OptiPrep al 30 y al 35 % (figura 27).



El material recuperado de la interfase de OptiPrep fue más del 90 % del ADN total y no presentaba contaminantes discernibles mediante microscopia de contraste de fases. Para descartar la presencia de mitocondrias contaminantes se midió la actividad de la succinato deshidrogenasa, como marcador mitocondrial, en el homogeneizado inicial y en la solución final de núcleos purificados. Con este objetivo 50  $\mu$ l de cada fracción de las muestras se mezclaron con 0,3 ml de succinato sódico (0,01 M) en tampón fosfato (0,05 M, pH 7,5). Después de una incubación de 10 minutos a 37 °C se añadió 0,1 ml de violeta de p-iodonitrotetrazolium (2,5 mg/ml) tras lo cual se realizó otra incubación de 10 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo con la adición de 1 ml de etilacetato:etanol:ácido tricloroacético 5:5:1 (v/v/p) seguida de una centrifugación en una microfuga a 13.000 rpm durante 1 minuto, después de la cual se midió la absorbancia a 490 nm. Para los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar del violeta de p-iodonitrotetrazodiuim ( $19.300 M^{-1} cm^{-1}$ ). Los núcleos de células de hígado de rata aisladas estaban libres de contaminación mitocondrial (menos de 0,06% y 0,08% en animales jóvenes y viejos respectivamente).

### 3.12.2.-PCR en tiempo real

El ADNn fue aislado a partir de los núcleos purificados mediante centrifugación a 1.000 g, extracción con cloroformo y precipitación en etanol siguiendo el método de Loft & Poulsen (1999). La PCR se realizó usando el kit de ADN polimerasa Tth. La cuantificación en tiempo real de citocromo c oxidasa III (COX III) y RNA ribosómico 16S (RNAr 16S) en relación con la gliceraldehido-3 P-dehidrogenasa (GAPDH) fue realizada usando el ensayo SYBR Green I y se evaluó mediante un sistema de detección iCycler. Los cDNAs objetivo se amplificaron mediante el siguiente procedimiento: 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, seguido de enfriamiento y extensión a 62 °C durante 1 minuto por ciclo. El incremento de la fluorescencia fue medido en tiempo real durante la fase de extensión. El umbral del ciclo (Ct) fue determinado y la expresión génica relativa fue reflejada como nivel de cambio =  $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ . Los primers específicos utilizados se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3:** Primers utilizados en la RT-PCR

		<b>Secuencia de 5' a 3'</b>
<b>COX III</b>	Directo	5'-GGAACATACCAAGGCCAC-3'
	Reverso	5'-GAGCCGTA AATTCCGTCTG-3'
<b>RNAr 16S</b>	Directo	5'-GACGAGAAGACCCTATGGAG-3'
	Reverso	5'-AGAAACCGACCTGGATTGC-3'
<b>GAPDH</b>	Directo	5'-CCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3'
	Reverso	5'-GGTCCTCAGTGTAGCCCA AGATG-3'

COX III = citocromo c oxidasa III, RNAr 16S = RNA ribosómico 16S, GAPDH = gliceraldehido-3 P-dehidrogenasa

### 3.13.- Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

#### 3.13.1.- Aislamiento de hepatocitos de rata

Los hepatocitos de rata se aislaron mediante un método de perfusión con colagenasa A (Romero & Viña, 1983). Las células se lavaron para eliminar la colagenasa mediante dos ciclos de centrifugación a 50 g durante 5 minutos tras los cuales se resuspendieron en medio William E (L-glutamina 2 mM, insulina 100 nM, dexametasona 100 nM y suero bovino fetal 2 %). Se obtuvo una subpoblación de hepatocitos de alta

viabilidad (> 96 %) mediante centrifugación en gradiente de densidad discontinuo de Percoll generado *in situ* (Pertoft *et al*, 1977). El gradiente consistió en una suspensión de células ( $3 \times 10^6$  células/ml) sobre una solución de Percoll isotónica (1,07 g/ml) en una proporción 1:2. Posteriormente se centrifugó durante 25 min a 15.000 g a 4 °C con un rotor de ángulo fijo. El tubo de equilibrado contenía un marcador de densidad (rango de densidad 1,033-1,152 g/ml) que se utilizó como marcador del gradiente formado. Los hepatocitos no viables y otros tipos celulares permanecieron en la parte superior del gradiente, mientras que los hepatocitos viables formaron una banda en la posición correspondiente a las densidades entre 1,07 y 1,09 g/ml. Los hepatocitos viables fueron recogidos del gradiente, y para liberarlos del Percoll se lavaron con medio de hepatocitos en dos ciclos de centrifugación de 5 minutos a 50 g.

### 3.13.2.- FISH cuantitativo

Las suspensiones celulares de hepatocitos aislados de rata fueron lavadas con PBS durante 5 minutos, centrifugadas durante 10 minutos a 1.000 g y posteriormente resuspendidas y fijadas durante 15 minutos en paraformaldehído al 4 % tamponado con PBS. Seguidamente las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 1.000 g durante 10 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS y se guardaron a 4 °C. Los portaobjetos fueron cubiertos con poli L-lisina, tras lo cual la suspensión celular se dejó caer sobre ellos. Los portaobjetos fueron deshidratados con etanol al 100 % y secados con llama de mechero de alcohol. Las siguientes secuencias repetitivas de ADN fueron utilizadas como sondas:

- El ADNmt que fue marcado mediante traducción nick con biotina-16-dUTP usando un kit de traducción nick.
- Secuencias de telómero de vertebrados (TTAGGG) que fueron marcadas con digoxigenina-11-dUTP.

Los portaobjetos fueron incubados con RNasa A (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en 2xSSC durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual fueron aclarados dos veces durante 5 minutos en 2xSSC. A continuación, fueron incubados en pepsina al 0,1 % durante 20 minutos a 37 °C con agitación suave, lavados dos veces con PBS durante 5 minutos y aclarados de nuevo

5 minutos en 2xSSC. Seguidamente fueron fijados durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído al 4 % en 1xSSC, lavados 3 veces más en 2xSSC durante 5 minutos, deshidratados secuencialmente en series de soluciones de etanol al 70 %, 95 % y 100 % de 3 minutos en cada una y finalmente secados al aire.

La mezcla de hibridación (2 ng/ml de ADN correspondiente a cada sonda y formamida al 70 % (v/v) en 2xSSC) fue hervida durante 10 minutos y colocada en hielo durante 7 minutos. A continuación, esta mezcla de hibridación fue añadida a los portaobjetos con las muestras y éstos fueron colocados en una placa a 72 °C durante 5 minutos. La hibridación fue realizada durante toda la noche a 37 °C.

Después de la hibridación, se realizaron varios lavados posthibridación con 2xSSC a 72 °C. Las señales inespecíficas fueron eliminadas mediante aclarado en solución bloqueante 4B a 37 °C durante 35 minutos. La detección de la sonda marcada con biotina fue realizada mediante un conjugado de avidina con Cy3, mientras que la detección de las sondas con marcado de digoxigenina se realizó de forma indirecta con antidigoxigenina de ratón. Como anticuerpo secundario se utilizó *anti-mouse* conjugado con fluoresceína isotiocinato (FITC). Después los portas fueron lavados en tampón de detección (4xSSC, 0,2 % Tween 20) y contramarcados con 4',6-diamidina-2-fenilindol (DAPI). Por último, estos portas fueron montados en Vectashield (vector H 1000).

Se analizaron 3 ratas jóvenes y 3 viejas. Se montaron 3 portas por individuo y se observaron un total de 20 núcleos por portaobjeto bajo un microscopio equipado con un eje Z motorizado. Las imágenes se captaron con una cámara digital usando el software de análisis Soft Imaging System, Olympus. Las imágenes rojas y verdes fueron captadas con las mismas condiciones de contraste y brillo cada 0,38 micras en el eje Z. Las figuras mostradas fueron procesadas con el software de Adobe Photoshop 7.0 para mejorar el brillo y el contraste.

La cuantificación fue realizada con el programa ImageJ. Para medir el área total del núcleo se delimitó la región de interés (ROI) en las imágenes 2D siguiendo el contorno de los núcleos marcados con DAPI. Las áreas fueron medidas en pixels y transformadas en micras cuadradas de acuerdo con la configuración de la cámara y el microscopio y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las medidas de intensidad de fluorescencia,

se le dio a cada pixel en la escala de grises de 16 bits, un número entre el 0 y el 65535. Este número corresponde con los niveles de gris, siendo el 0 la ausencia de fluorescencia y el 65535 la fluorescencia máxima. Se utilizó el software de procesamiento *3D object counter* para medir el área y la intensidad de las áreas del ADNmt y del telómero, así como el número de señales en cada núcleo. Un conjunto de imágenes consecutivas cubriendo todo el núcleo fueron analizadas por separado del resto de las series Z para minimizar la superposición de señales de fluorescencia procedente de núcleos adyacentes. La herramienta *3D object counter* contó el número de objetos 3D en los conjuntos de imágenes y mostró el volumen, la superficie y la intensidad de cada objeto. La intensidad del volumen era la suma de los valores de cada pixel en cada señal del conjunto. Se encontró una correlación positiva ( $r = 0,98$ ) entre el volumen y el área medidos con las señales de ADNmt y de telómero. De este modo, los datos mostrados correspondieron a los valores de la señal del área medida en pixels y transformada a micras cuadradas.

### 3.14.- Métodos estadísticos

A partir de los datos de la presente tesis se calcularon las características muestrales y se realizaron los análisis estadísticos.

#### 3.14.1.- Características muestrales

De cada conjunto de datos se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Media aritmética:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X}{n}$$

- Desviación típica de la media:

$$\sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

- Error estándar de la media:

$$SEM = \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}}$$

### 3.14.2.- Análisis estadísticos

El análisis de los datos de los experimentos de suplementación de metionina *in vivo* e *in vitro*, se realizó mediante la prueba estadística de la T de Student. Tanto esta prueba como la obtención de los parámetros estadísticos fueron realizados mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.0.

Para realizar el análisis de datos de la RT-PCR en tiempo real se utilizó el ANOVA de una vía. Este análisis y la obtención de los parámetros estadísticos fueron realizados mediante el paquete de software comercial Kaleida Graph 3.6 Software.

En el caso del análisis de los datos del FISH cuantitativo se utilizó también el ANOVA de una vía. Tanto este análisis como la obtención de los parámetros estadísticos fue realizado mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.0.

El nivel mínimo de significación fue 0,05 en todos los casos. El grado de significación se representó como: \* (p<0,05); \*\* (p<0,01); \*\*\* (p<0,001).

# Resultados

## 1.- SUPLEMENTACIÓN DE METIONINA

### 1.1.- Suplementación de metionina en la dieta a largo plazo

#### 1.1.1.- Peso de los animales

No se observaron diferencias significativas en el peso de los animales al inicio del tratamiento experimental. El peso de los animales se controló semanalmente durante todo el tratamiento y no se observaron diferencias significativas entre el peso del grupo control y del grupo suplementado con metionina (MetSup) en ningún momento (figura 28).

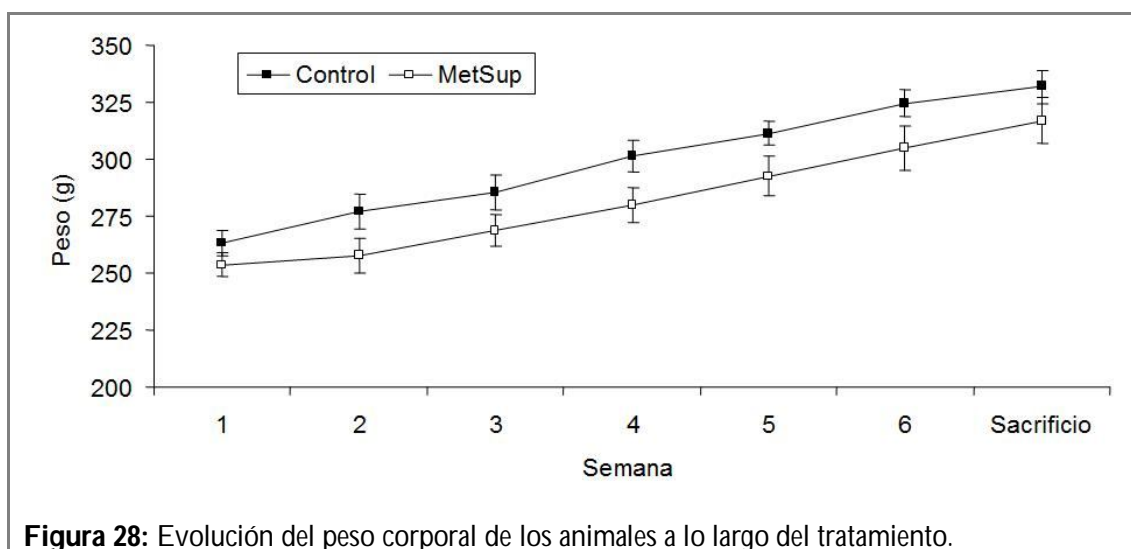


Figura 28: Evolución del peso corporal de los animales a lo largo del tratamiento.

#### 1.1.2.- Consumo mitocondrial de oxígeno

##### ▪ Hígado

Las medidas de la tasa de consumo de oxígeno se realizaron en ausencia (estado 4) y en presencia (estado 3) de ADP en mitocondrias de hígado aisladas a partir de animales controles y animales sometidos a suplementación con metionina. Las pruebas se hicieron 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 (tabla 4).

**Tabla 4:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot).

	<b>Control</b>	<b>MetSup</b>
<b>Pir/mal (estado 4)</b>	7,8 ± 1,0	6,6 ± 0,7
<b>Pir/mal + ADP (estado 3)</b>	19,5 ± 2,4 <sup>***b</sup>	21,0 ± 2,3 <sup>***b</sup>
<b>Glut/mal (estado 4)</b>	9,4 ± 0,8	10,3 ± 0,8
<b>Glut/mal + ADP (estado 3)</b>	72,1 ± 5,3 <sup>***b</sup>	93,3 ± 6,3 <sup>*a,***b</sup>
<b>Succ + Rot (estado 4)</b>	26,2 ± 2,0	29,9 ± 1,6
<b>Succ + Rot + ADP (estado 3)</b>	100,9 ± 9,1 <sup>***b</sup>	121,7 ± 3,3 <sup>*a,***b</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato (Pir/mal), glutamato/malato (Glut/mal) o succinato (Succ) como sustrato, respectivamente. Los ensayos con succinato se realizaron en presencia de rotenona (Rot). Los valores representan la media ± SEM (n = 8). Los superíndices indican diferencias significativas: a respecto al control, b respecto al consumo de oxígeno en estado 4. \* (p < 0,05); \*\*\* (p < 0,001).

La adición de ADP estimuló el consumo de oxígeno mitocondrial en todos los casos, indicando el buen estado de las mitocondrias aisladas. Al comparar la intensidad del consumo de oxígeno entre grupos experimentales, no se encontraron diferencias significativas exceptuando el incremento de consumo en estado 3 observado en el grupo suplementado con metionina utilizando glutamato/malato o succinato en presencia de rotenona como sustrato.

No se encontraron diferencias significativas entre grupos experimentales en los índices de control respiratorio (RCI). En todos los casos el valor del RCI indicó el buen estado de las mitocondrias aisladas (tabla 5), presentando dicho parámetro los valores más elevados con glutamato/malato como sustrato.

**Tabla 5:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre el índice de control respiratorio (RCI) en mitocondrias de hígado.

	Control	MetSup
<b>Pir/mal</b>	3,0 ± 0,5	3,2 ± 0,2
<b>Glut/mal</b>	8,0 ± 0,7	9,5 ± 0,7
<b>Succ + Rot</b>	3,8 ± 0,1	4,1 ± 0,2

Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato (Pir/mal), glutamato/malato (Glut/mal) o succinato (Succ) como sustrato, respectivamente. Los ensayos con succinato se realizaron en presencia de rotenona (Rot). Los valores representan la media ± SEM (n = 8).

### ▪ Corazón

Las medidas se realizaron en las mismas condiciones que en el caso del hígado, con la salvedad de que sólo se utilizó piruvato/malato como sustrato del complejo I (tablas 6). Se observó un incremento significativo del consumo de oxígeno en el estado 3 tras la adición de ADP confirmando también en este caso el buen estado de las mitocondrias.

**Tabla 6:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de corazón (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot).

	Control	MetSup
<b>Pir/mal (estado 4)</b>	28,4 ± 4,7	23,4 ± 1,7
<b>Pir/mal + ADP (estado 3)</b>	77,2 ± 5,4 <sup>***b</sup>	71,0 ± 6,1 <sup>***b</sup>
<b>Succ + Rot (estado 4)</b>	85,8 ± 9,4	112,9 ± 9,5 <sup>a</sup>
<b>Succ + Rot + ADP (estado 3)</b>	112,1 ± 5,3 <sup>***b</sup>	140,3 ± 10,7 <sup>a,***b</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato (Pir/mal) o succinato (Succ) como sustrato, respectivamente. Los ensayos con succinato se realizaron en presencia de rotenona (Rot). Los valores representan la media ± SEM (n = 8). Los superíndices indican diferencias significativas: a respecto al control, b respecto al consumo de oxígeno en estado 4. \* (p < 0,05); \*\*\* (p < 0,001).

Tanto en estado 3 como 4, utilizando succinato como sustrato del complejo II, se observó un incremento del consumo de oxígeno del grupo suplementado con metionina frente al grupo control. Por lo tanto, el tratamiento sólo afectó al consumo de oxígeno

cuando los electrones entraron en la cadena de transporte a través del complejo II (tabla 6).

No se encontraron diferencias significativas entre los RCI de los dos grupos experimentales (tabla 7). En todos los casos el valor del RCI indicó el buen estado de las mitocondrias.

**Tabla 7:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre el índice de control respiratorio (RCI) en mitocondrias de corazón.

	<b>Control</b>	<b>MetSup</b>
<b>Pir/mal</b>	3,0 ± 0,4	3,1 ± 0,3
<b>Succ + Rot</b>	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1

Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato (Pir/mal) o succinato (Succ) como sustrato, respectivamente. Los ensayos con succinato se realizaron en presencia de rotenona (Rot). Los valores representan la media ± SEM (n = 8).

#### ▪ Cerebro

No se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales en ningún caso (tabla 8), aunque la adición de ADP estimuló como siempre el consumo de oxígeno mitocondrial confirmando la funcionalidad de las mitocondrias cardiacas.

Tampoco se observaron diferencias significativas entre los RCI de los dos grupos experimentales (tabla 9), en este órgano. De nuevo, los valores de RCI confirmaron el buen estado de las mitocondrias.

**Tabla 8:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de cerebro (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot).

	Control	MetSup
<b>Pir/mal (estado 4)</b>	11,2 ± 1,7	13,8 ± 1,9
<b>Pir/mal + ADP (estado 3)</b>	23,1 ± 3,0 <sup>b</sup>	26,9 ± 4,8 <sup>**b</sup>
<b>Glut/mal (estado 4)</b>	11,5 ± 2,1	14,5 ± 2,2
<b>Glut/mal + ADP (estado 3)</b>	23,6 ± 4,1 <sup>**b</sup>	25,7 ± 2,8 <sup>**b</sup>
<b>Succ + Rot (estado 4)</b>	15,8 ± 1,6	17,1 ± 2,1
<b>Succ + Rot + ADP (estado 3)</b>	24,0 ± 2,0 <sup>b</sup>	26,1 ± 2,0 <sup>***b</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato (Pir/mal), glutamato/malato (Glut/mal) o succinato (Succ) como sustrato, respectivamente. Los ensayos con succinato se realizaron en presencia de rotenona (Rot). Los valores representan la media ± SEM (n = 8). b indica diferencias significativas respecto al consumo de oxígeno en estado 4. \* (p < 0,05); \*\* (p < 0,01); \*\*\* (p < 0,001).

**Tabla 9:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre el índice de control respiratorio (RCI) en mitocondrias de cerebro.

	Control	MetSup
<b>Pir/mal</b>	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,2
<b>Glut/mal</b>	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1
<b>Succ + Rot</b>	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1

Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato (Pir/mal), glutamato/malato (Glut/mal) o succinato (Succ) como sustrato, respectivamente. Los ensayos con succinato se realizaron en presencia de rotenona (Rot). Los valores representan la media ± SEM (n = 8).

#### ▪ Riñón

En el caso del riñón, sólo se utilizó glutamato/malato como sustrato del complejo I y tampoco en este órgano se encontraron diferencias significativas al comparar el consumo de oxígeno mitocondrial (tabla 10) o el RCI (tabla 11) entre grupos experimentales. También en este órgano los valores de este último parámetro indicaron el buen estado de las mitocondrias.

**Tabla 10:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de riñón (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot).

	Control	MetSup
<b>Glut/mal (estado 4)</b>	23,2 ± 4,2	23,8 ± 2,4
<b>Glut/mal + ADP (estado 3)</b>	88,1 ± 13,4 <sup>***b</sup>	91,7 ± 13,4 <sup>***b</sup>
<b>Succ + Rot (estado 4)</b>	55,6 ± 11,6	74,4 ± 11,6
<b>Succ + Rot + ADP (estado 3)</b>	148,1 ± 27,0 <sup>**b</sup>	196,6 ± 24,7 <sup>***b</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con glutamato/malato (Glut/mal) o succinato (Succ) como sustrato, respectivamente. Los ensayos con succinato se realizaron en presencia de rotenona (Rot). Los valores representan la media ± SEM (n = 8). b indica diferencias significativas respecto al consumo de oxígeno en estado 4. \*\* (p < 0,01); \*\*\* (p < 0,001).

**Tabla 11:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre el índice de control respiratorio (RCI) en mitocondrias de riñón.

	Control	MetSup
<b>Glut/mal</b>	4,0 ± 0,2	4,0 ± 0,3
<b>Succ + Rot</b>	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,1

Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato glutamato/malato (Glut/mal) o succinato (Succ) como sustrato, respectivamente. Los ensayos con succinato se realizaron en presencia de rotenona (Rot). Los valores representan la media ± SEM (n = 8).

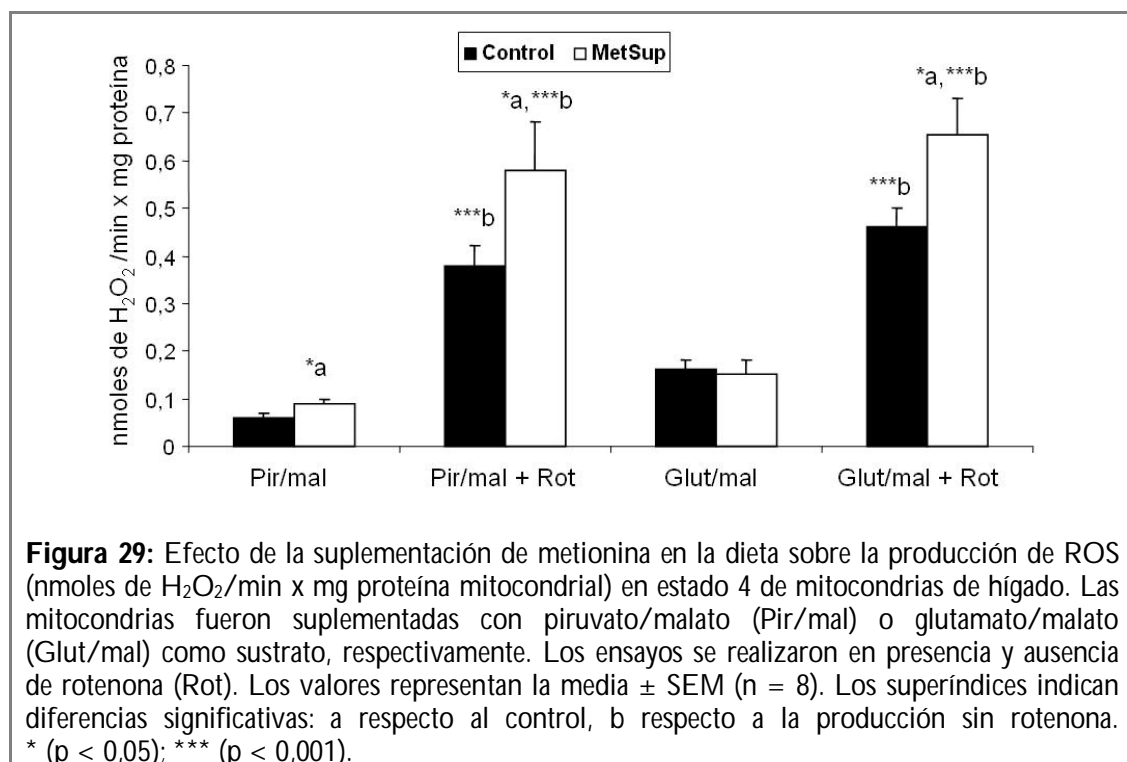
### 1.1.3.- Producción mitocondrial de radicales libres de oxígeno (ROS)

#### ▪ Hígado

Las pruebas de producción de ROS se hicieron 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. Se utilizó rotenona (inhibidor del complejo I) con los sustratos del complejo I para estudiar la producción máxima de radicales libres por parte de dicho complejo, y antimicina A (AA; inhibidor del complejo III) con el sustrato del complejo II para estudiar la producción máxima de

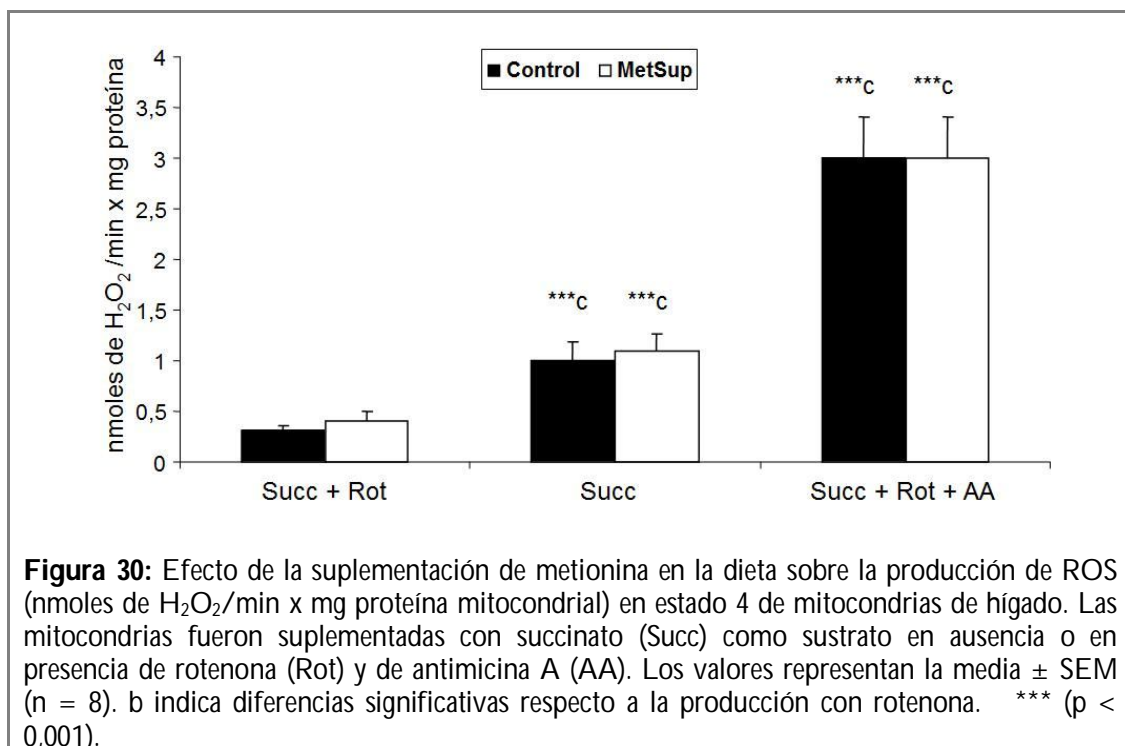
radicales libres por parte del complejo III. Todas las medidas de producción mitocondrial de radicales libres se realizaron en ausencia de ADP (estado 4).

El grupo MetSup mostró un incremento significativo de la producción basal de ROS respecto al grupo control sólo cuando se utilizó piruvato/malato como sustrato (figura 29, 30).



En todos los casos la adición de rotenona incrementó la producción mitocondrial de ROS al utilizar sustratos del complejo I. Los animales pertenecientes al grupo MetSup presentaron un incremento significativo de la producción mitocondrial de radicales libres al utilizar ambos sustratos del complejo I en presencia de rotenona con respecto al grupo control (figura 29).

Los ensayos de producción de ROS cuando las mitocondrias fueron suplementadas con succinato, sustrato del complejo II, fueron realizados en presencia y ausencia de rotenona, no encontrándose diferencias significativas entre grupos experimentales (figura 30). Cuando no se utilizaba rotenona en el ensayo se incrementaba la producción de ROS posiblemente por un transporte reverso de electrones desde el complejo II al I.

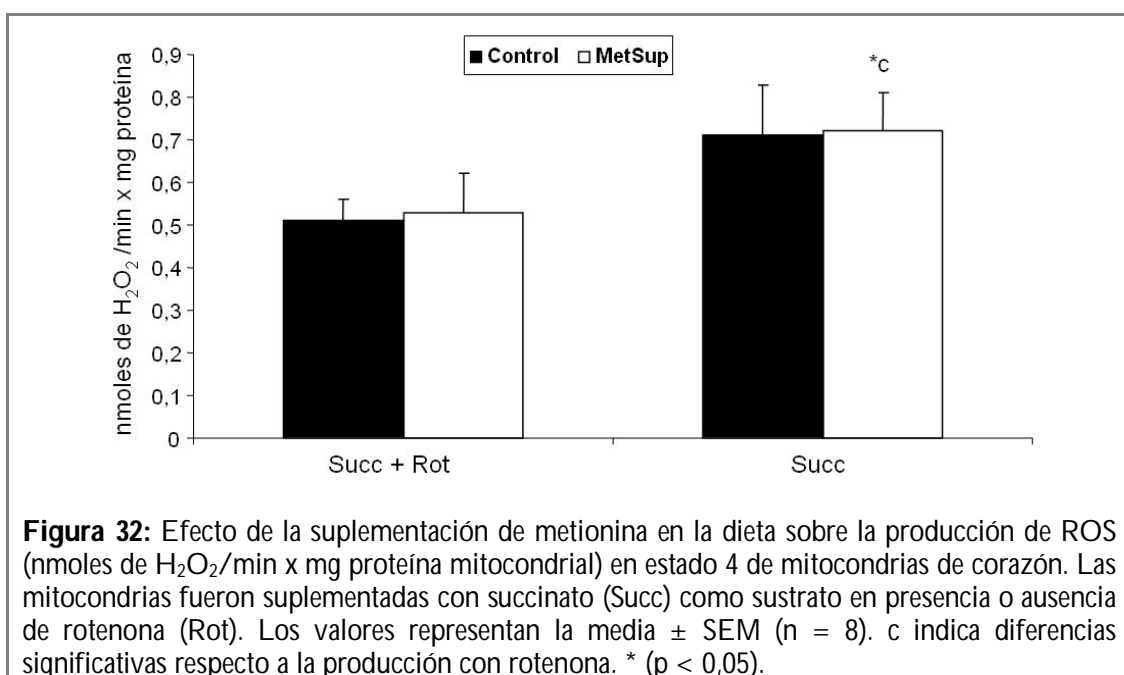
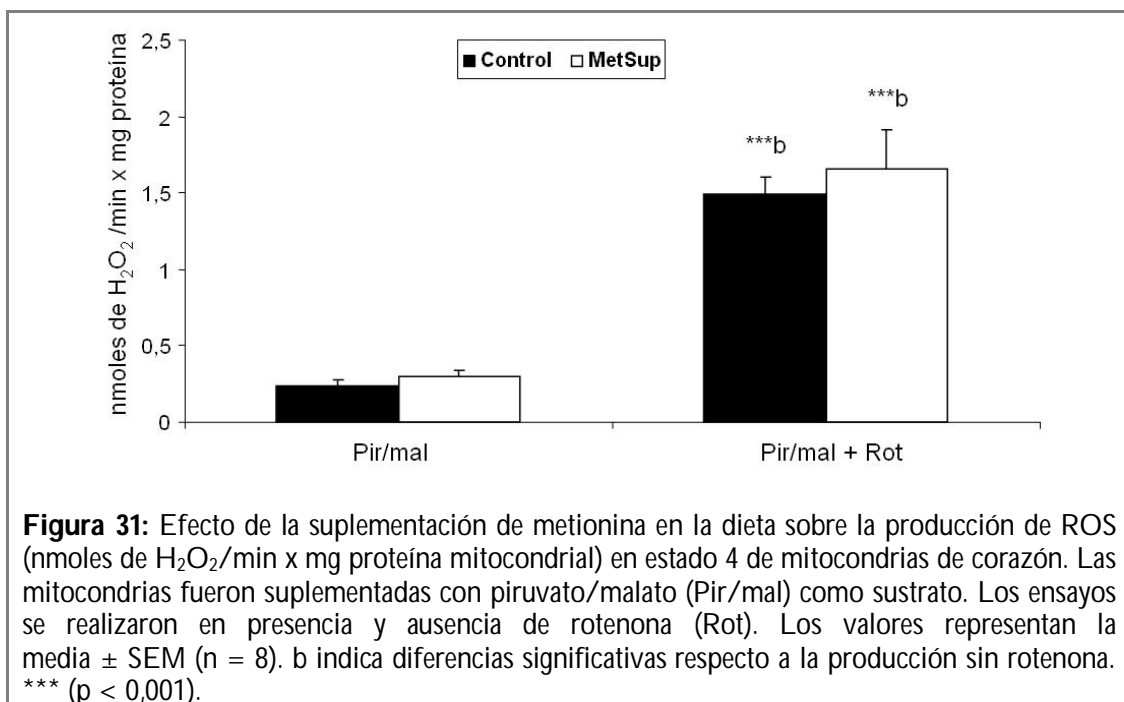


También se realizaron ensayos en mitocondrias suplementadas con succinato, añadiendo antimicina A para comprobar la producción máxima de ROS del complejo III (empleando succinato como sustrato y rotenona). En este caso se observó un incremento significativo de la producción de ROS (figura 30), aunque tampoco se observaron diferencias entre grupos experimentales.

Todos estos resultados de producción de ROS parecen indicar que el tratamiento incrementa la producción de radicales libres a nivel del complejo I en mitocondrias de hígado.

#### ▪ Corazón

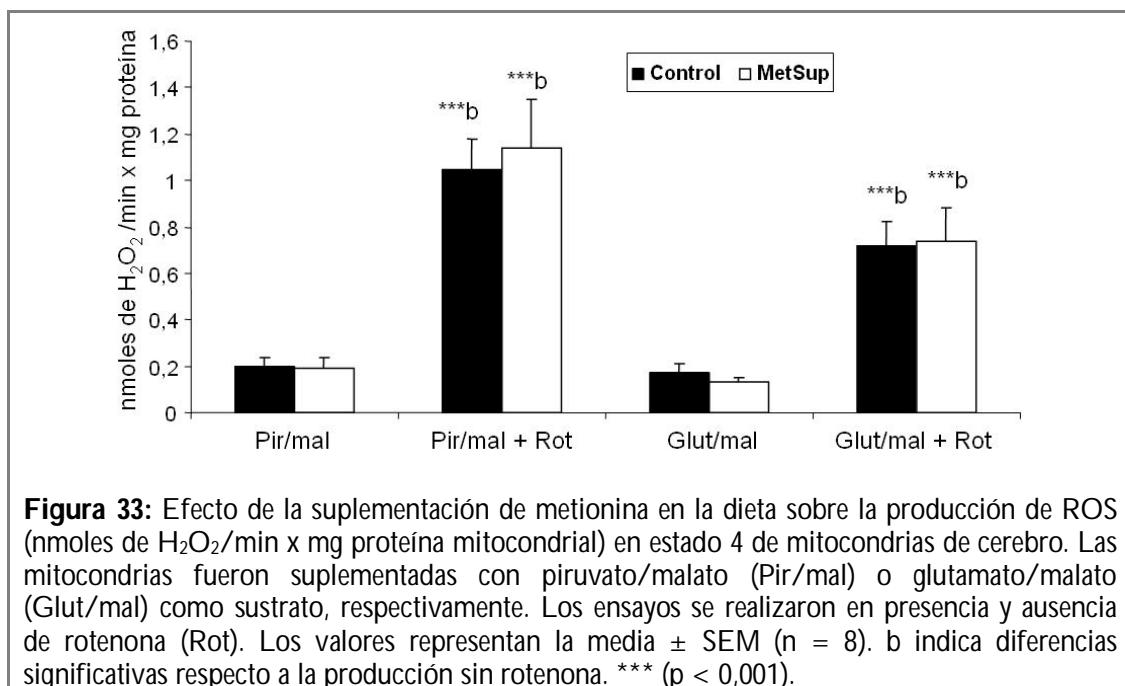
En este órgano, el único sustrato del complejo I utilizado fue piruvato/malato. No se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales en la producción mitocondrial de ROS con ninguno de los sustratos e inhibidores empleados (figura 31, 32).



La adición de rotenona, inhibidor del complejo I mitocondrial, a los ensayos con el sustrato del complejo I (piruvato/malato) supuso un incremento significativo de la producción de ROS (figura 31). Cuando se utilizó succinato como sustrato para los ensayos de producción de ROS, se observó un incremento de dicha producción de ROS cuando no se añadía rotenona al ensayo posiblemente por un transporte reverso de electrones desde el complejo II al I (figura 32).

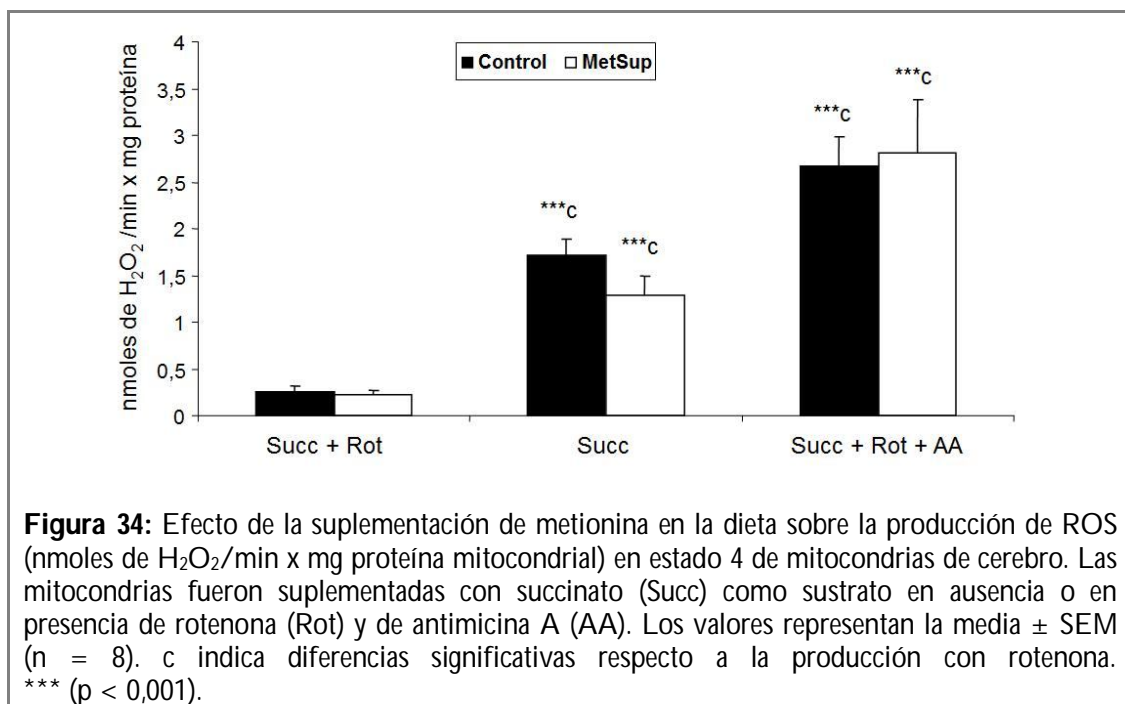
### ■ Cerebro

Al igual que en el caso del corazón, no se observaron diferencias significativas en la producción mitocondrial de ROS entre grupos experimentales con ninguno de los sustratos e inhibidores empleados (figura 33, 34).



La adición de rotenona, inhibidor del complejo I mitocondrial, a los ensayos con piruvato/malato o con glutamato/malato mostró un incremento significativo de la producción de ROS con respecto a los ensayos sin rotenona (figura 33). Igualmente, cuando se añadía antimicina A (junto con rotenona) al ensayo con succinato, se observaba un gran incremento de la producción de ROS, aunque seguían sin observarse diferencias entre grupos experimentales (figura 34).

Cuando no se añadía rotenona en los ensayos del sustrato del complejo II se incrementaba la producción de ROS, posiblemente por un transporte reverso de electrones desde el complejo II al I (figura 34).



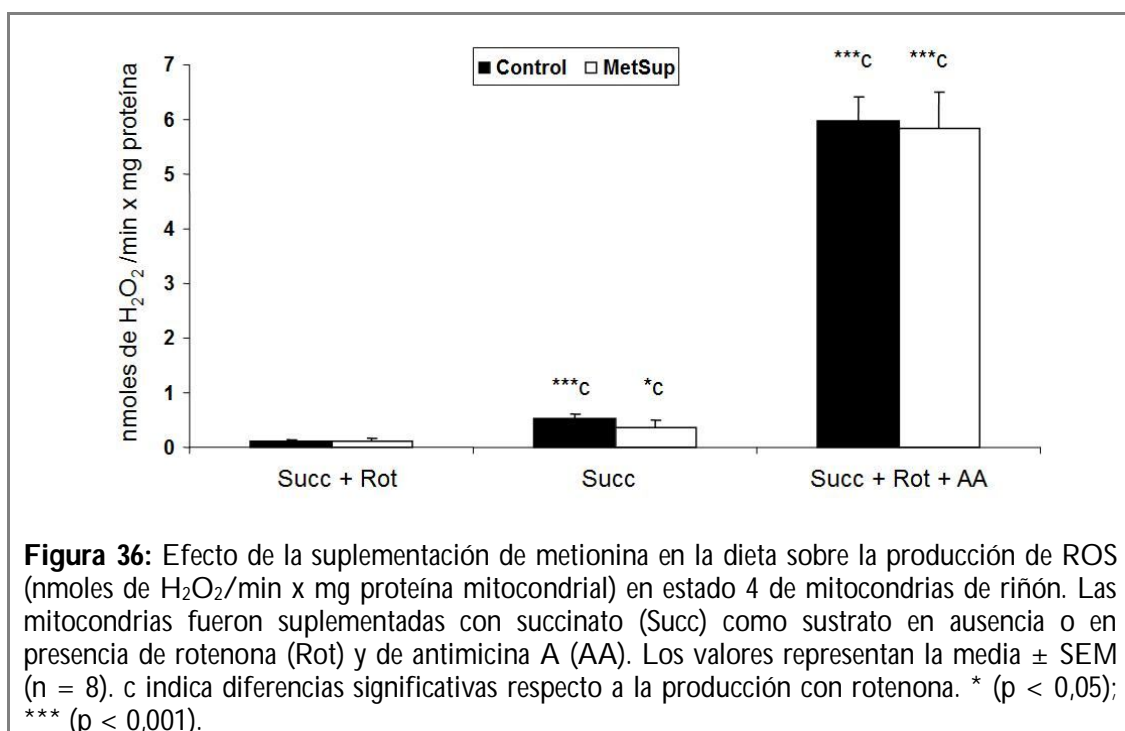
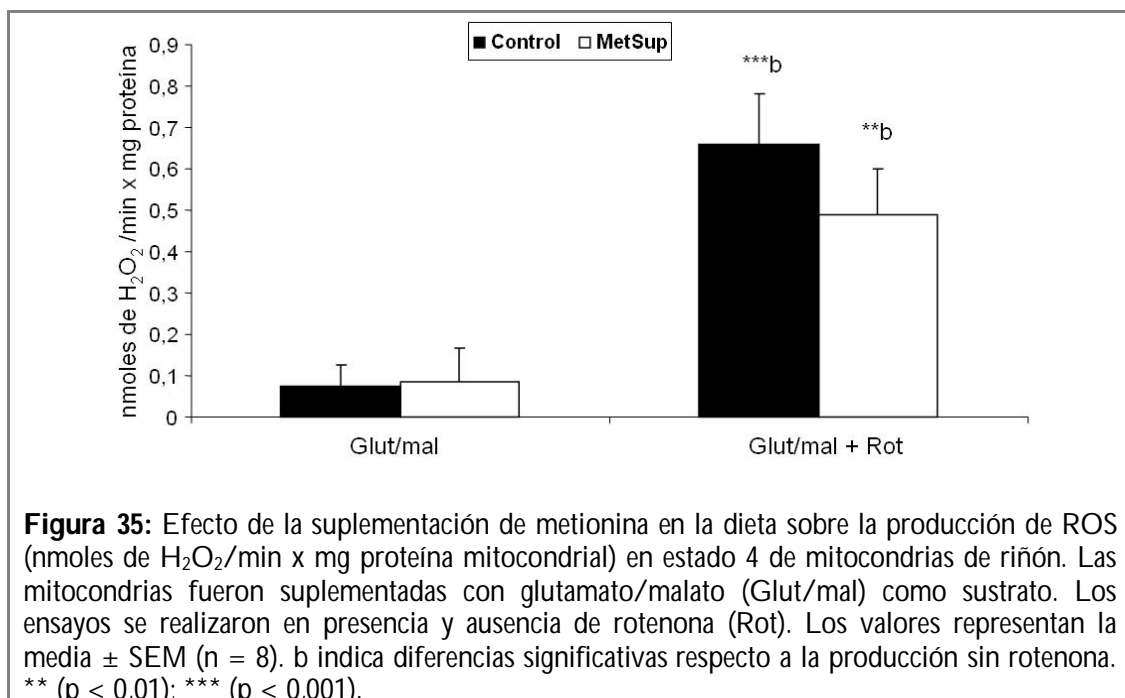
#### ▪ Riñón

En el caso del riñón sólo se utilizó glutamato/malato como sustrato del complejo I y, al igual que ocurrió en el cerebro y el corazón, no se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales en la producción mitocondrial de ROS, con ninguno de los sustratos e inhibidores empleados (figura 35, 36).

La adición de rotenona a los ensayos con el sustrato del complejo I (glutamato/malato) mostró un incremento significativo la producción de ROS (figura 35). Igualmente, cuando se añadía antimicina A (junto con rotenona) al ensayo con el sustrato del complejo II (succinato), se observaba un gran incremento de la producción de ROS, aunque seguían sin observarse diferencias entre grupos experimentales (figura 36).

Al igual que en los órganos anteriores, cuando no se añadía rotenona al ensayo con succinato como sustrato se observaba un incremento significativo de la producción de ROS, posiblemente por un transporte reverso de electrones desde el complejo II al I (figura 36).

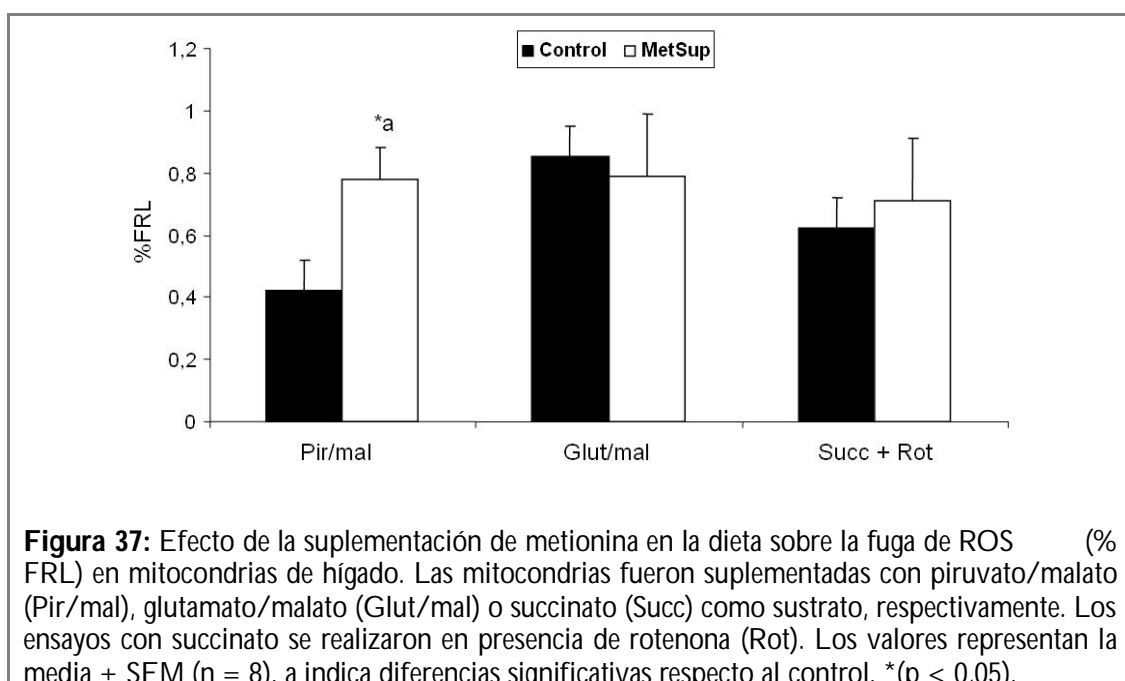
En los ensayos realizados en mitocondrias suplementadas con succinato añadiendo antimicina A, también se observó un incremento significativo de la producción de ROS (figura R9).



### 1.1.4.- Fuga de radicales libres de oxígeno (% FRL)

#### ▪ Hígado

La fuga de radicales libres (% FRL) representa el porcentaje de electrones que se escapan de la cadena respiratoria mitocondrial dando lugar a los ROS. Se observó un incremento significativo de dicha % FRL en el grupo suplementado con metionina frente al grupo control sólo cuando se utilizó piruvato/malato como sustrato (figura 37).

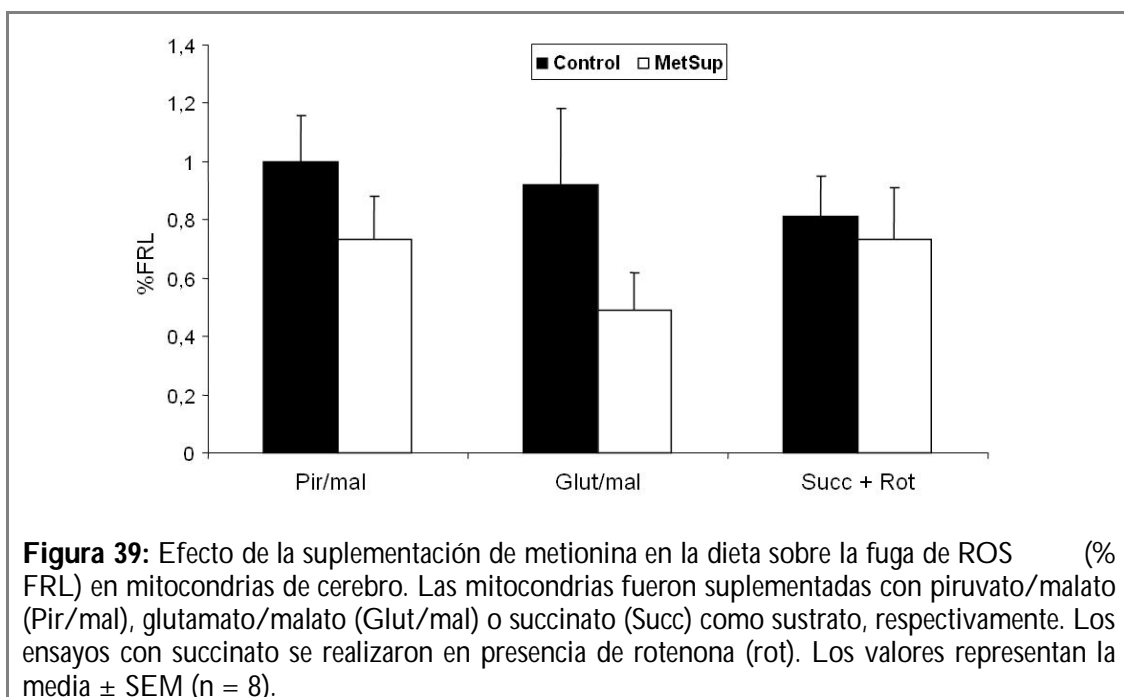
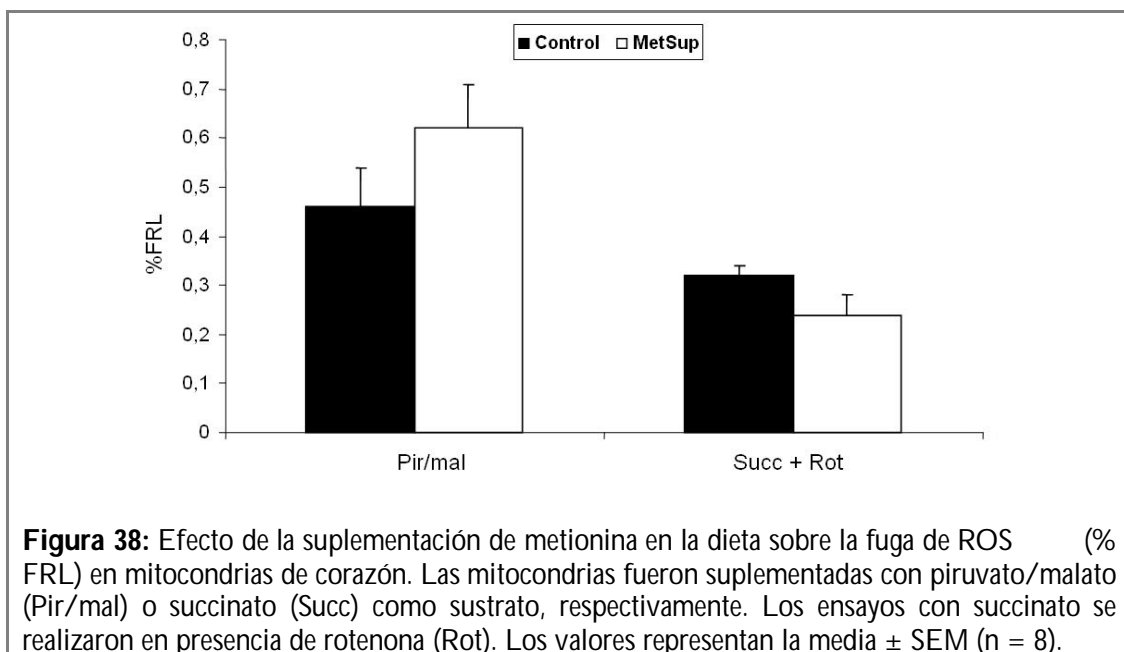


#### ▪ Corazón

No se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales con ninguno de los sustratos empleados (figura 38).

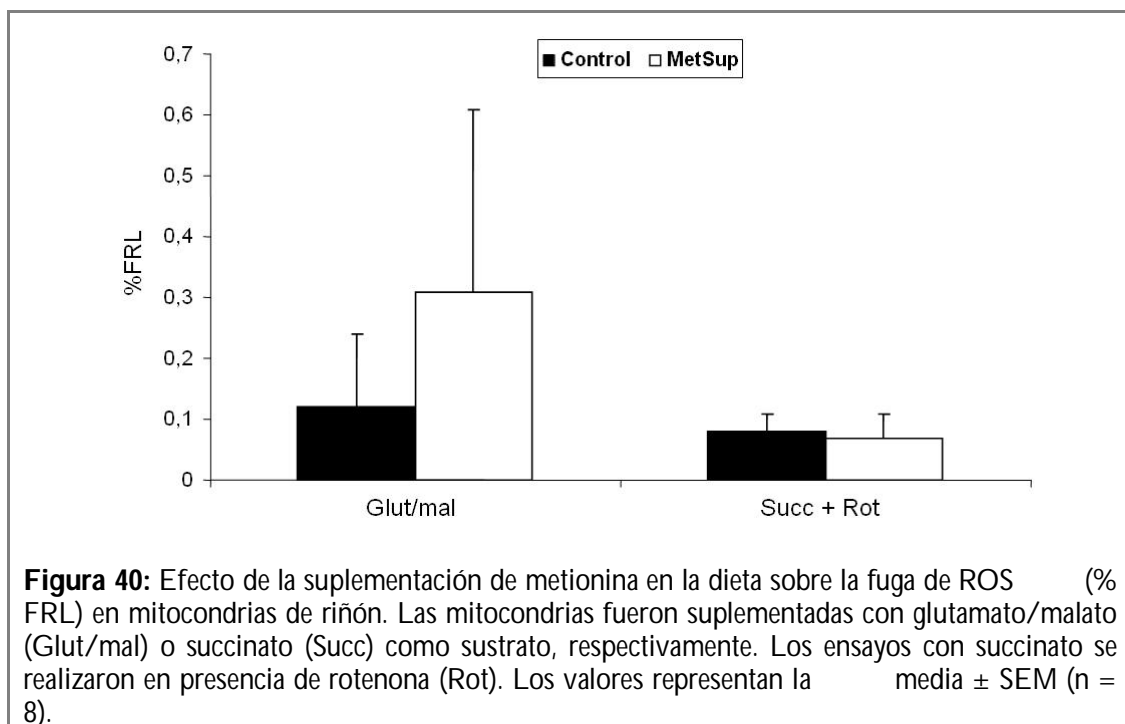
#### ▪ Cerebro

Tampoco en este órgano se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales con ninguno de los sustratos empleados (figura 39).



#### ▪ Riñón

En el caso del riñón, al igual que ocurrió en el corazón y el cerebro, tampoco se observaron diferencias significativas del % FRL entre el grupo control y el suplementado con metionina con ninguno de los sustratos utilizados (figura 40).



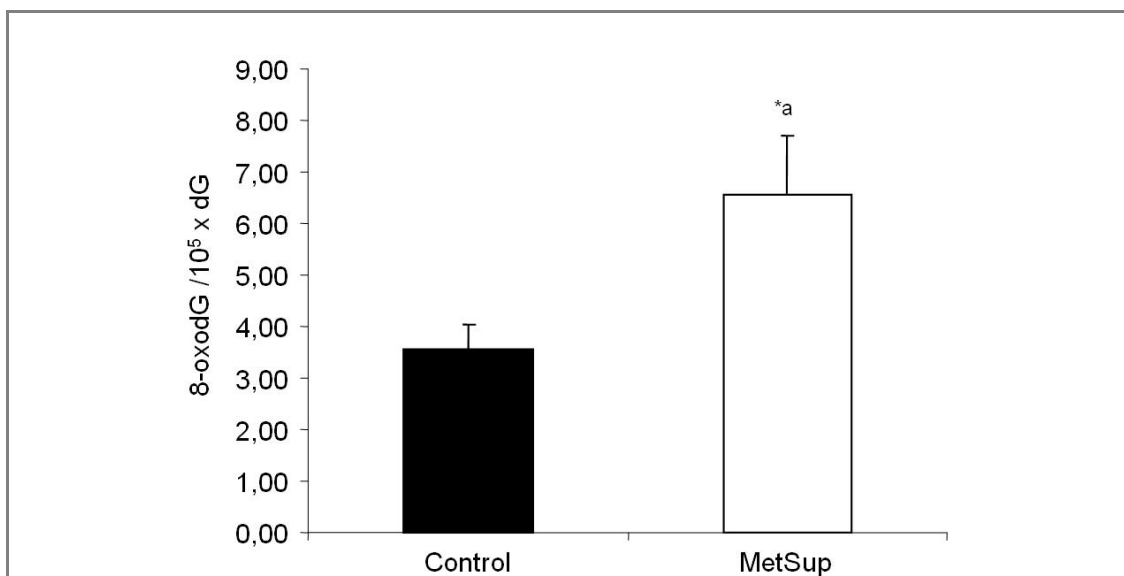
### 1.1.5.- Daño oxidativo al ADN mitocondrial

#### ▪ Hígado

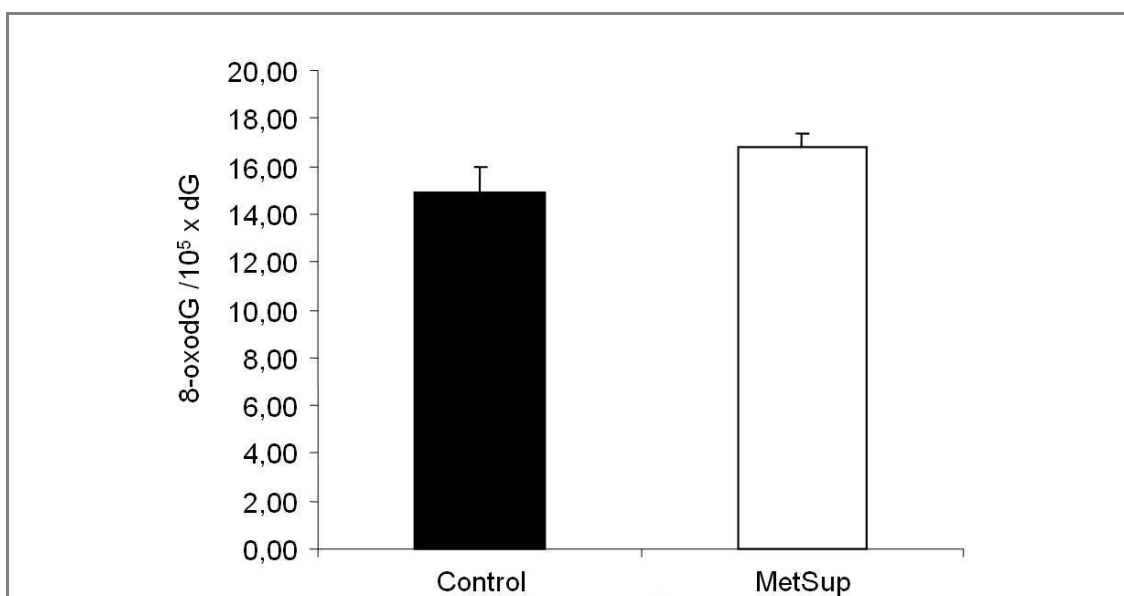
La suplementación de metionina en dieta aumentó el daño oxidativo al ADNmt en el caso del hígado, observándose un incremento significativo de los niveles de 8-oxodG en el grupo MetSup respecto al control (figura 41).

#### ▪ Corazón

En el caso del corazón y al contrario de lo observado en el hígado, no se apreciaron diferencias significativas entre grupos experimentales (figura 42).



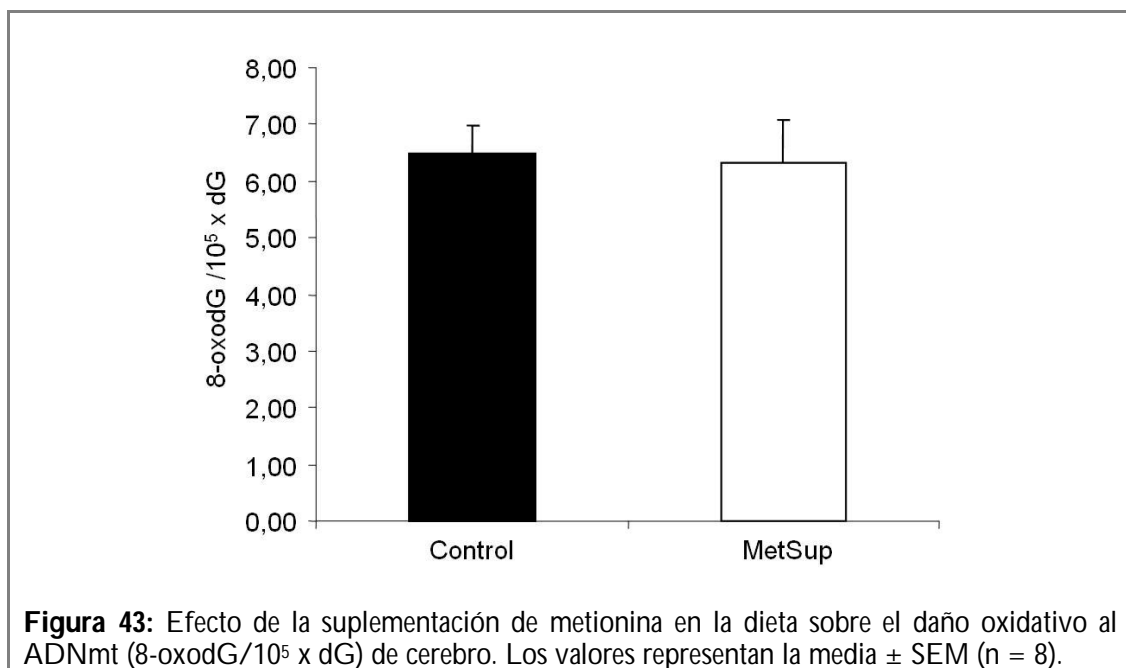
**Figura 41:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre el daño oxidativo al ADNmt (8-oxodG/10<sup>5</sup> x dG) de hígado. Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indican diferencias significativas respecto al control. \*(p < 0,05).



**Figura 42:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre el daño oxidativo al ADNmt (8-oxodG/10<sup>5</sup> x dG) de corazón. Los valores representan la media ± SEM (n = 8).

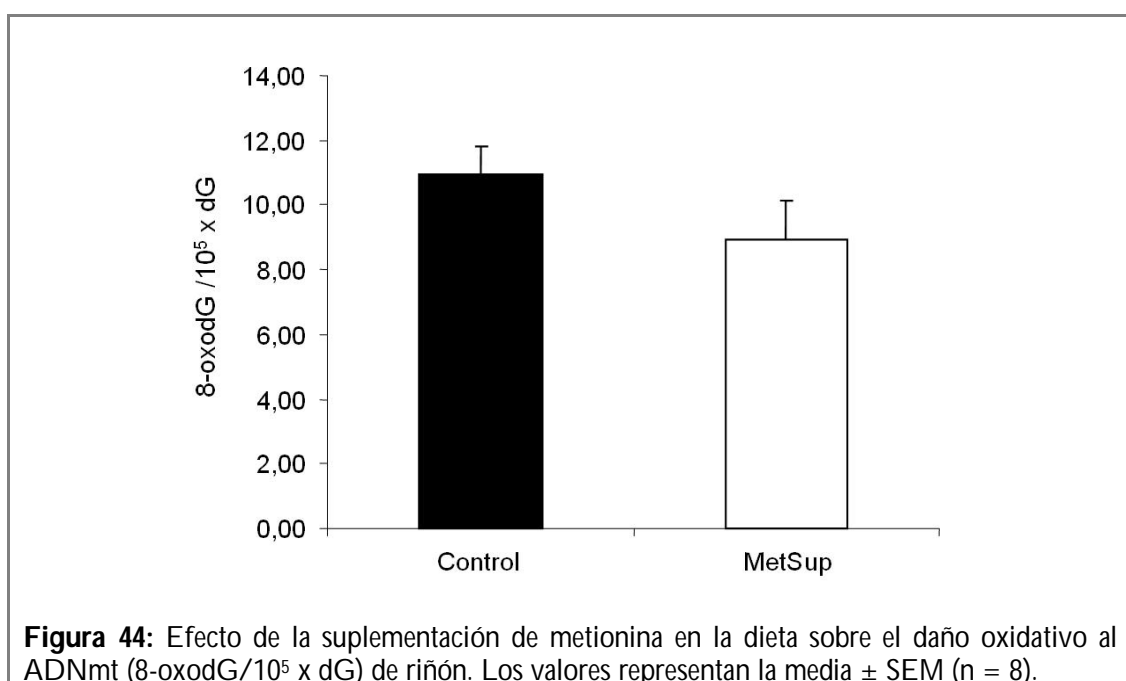
#### ▪ Cerebro

Tal y como se puede ver en la figura 43 la suplementación de metionina en la dieta no se tradujo en un incremento del daño oxidativo al ADNmt en el caso del cerebro.



#### ▪ Riñón

Al igual que en el caso del corazón y del cerebro, cuando analizamos el daño oxidativo al ADNmt en el riñón no se observaron diferencias significativas entre el grupo suplementado con metionina y el grupo control (figura 44).

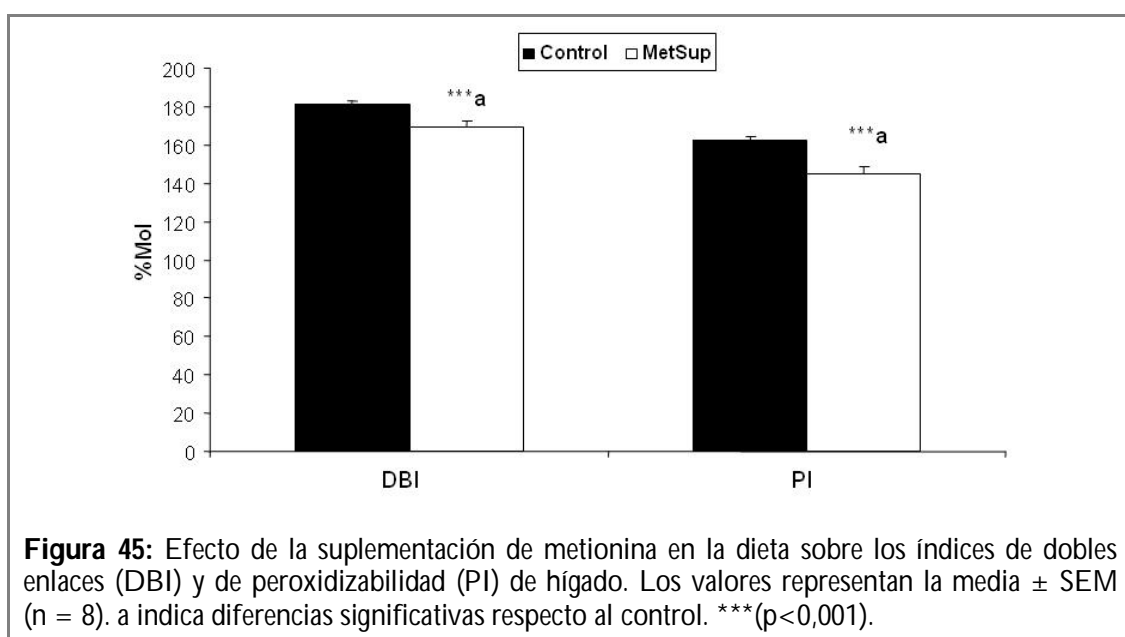


### 1.1.6.- Composición de ácidos grasos de lípidos totales y parámetros globales

#### ▪ Hígado

En el caso del hígado, se pudo observar una disminución significativa tanto del DBI como del PI en el grupo MetSup respecto al grupo control (figura 45). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos importantes de ácidos grasos (SFA, UFA, MUFA, PUFA) (tabla R9, figura 46). El ACL tampoco experimentó variaciones significativas entre los grupos experimentales (figura 46).

Los PUFA se pueden desglosar en PUFAn-3 y PUFAn-6. Se observó una disminución significativa de los niveles de PUFAn-3 del grupo MetSup frente al control, que no afectó al conjunto global de los PUFA (tabla 12).

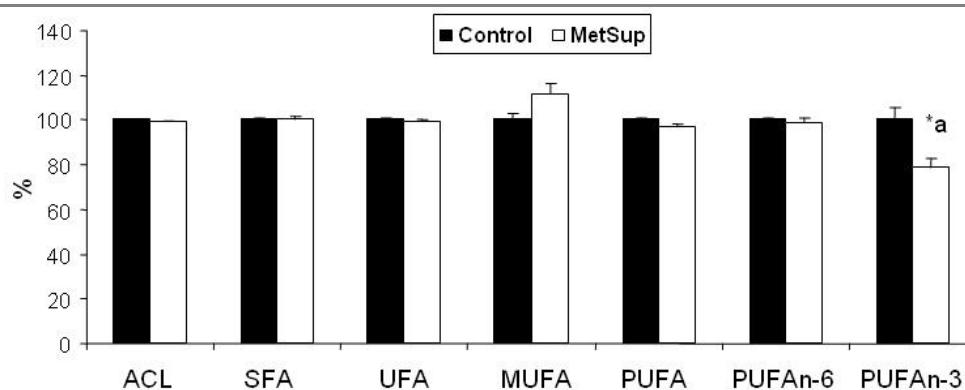


Los PUFAn-3 incluyen al ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3n-3), eicosapentanoico (20:5n-3), 7,10,13,16,19-docosapentanoico (22:5n-3) y docosahexanoico (22:6n-3). Se pudo observar que tanto el ácido  $\alpha$ -linolénico como el ácido eicosapentanoico presentaron una disminución significativa en el grupo MetSup frente al grupo control (tabla 13), por lo tanto parece que la disminución significativa observada en los PUFAn-3 sería causada, en su mayor parte, por el descenso de estos dos ácidos grasos.

**Tabla 12:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los índices globales (% mol) de los lípidos de hígado.

	Control	MetSup
<b>ACL</b>	18,21 ± 0,02	18,15 ± 0,03
<b>SFA</b>	40,21 ± 0,45	40,45 ± 0,52
<b>UFA</b>	59,78 ± 0,45	59,54 ± 0,52
<b>MUFA</b>	11,16 ± 0,31	12,48 ± 0,54
<b>PUFA</b>	48,61 ± 0,55	47,05 ± 0,75
<b>PUFAn-6</b>	43,06 ± 0,34	42,69 ± 0,68
<b>PUFAn-3</b>	5,54 ± 0,30	4,36 ± 0,24 <sup>*a</sup>

Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \* (p < 0,05).



**Figura 46:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los índices globales (% frente al control) de los lípidos de hígado. Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \* (p < 0,05).

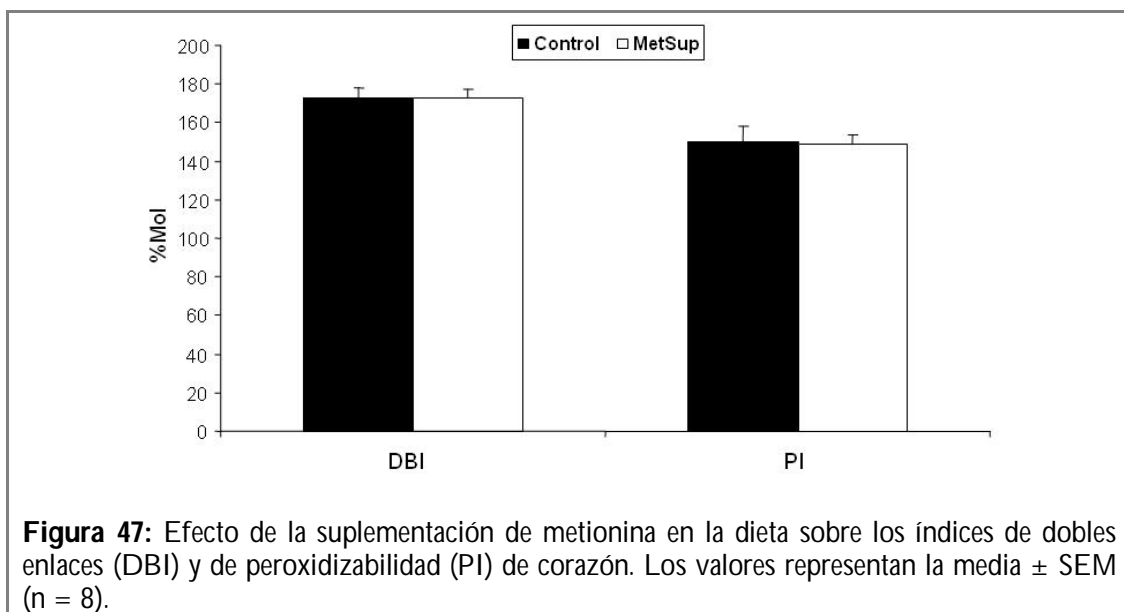
**Tabla 13:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la composición de ácidos grasos (% respecto al total de lípidos) de los lípidos de hígado.

	Control	MetSup
<b>14:0</b>	0,59 ± 0,06	0,40 ± 0,03 <sup>a</sup>
<b>16:0</b>	24,65 ± 0,53	23,46 ± 0,91
<b>16:1n-7</b>	1,17 ± 0,09	0,70 ± 0,04 <sup>***a</sup>
<b>18:0</b>	14,96 ± 0,36	16,57 ± 0,63
<b>18:1n-9</b>	9,99 ± 0,32	11,78 ± 0,53 <sup>a</sup>
<b>18:2n-6</b>	15,66 ± 0,50	19,01 ± 0,69 <sup>**a</sup>
<b>18:3n-3</b>	0,69 ± 0,06	0,27 ± 0,01 <sup>***a</sup>
<b>20:3n-6</b>	0,47 ± 0,03	0,25 ± 0,02 <sup>***a</sup>
<b>20:4n-6</b>	25,44 ± 0,29	22,40 ± 0,66 <sup>**a</sup>
<b>20:5n-3</b>	0,58 ± 0,06	0,28 ± 0,04 <sup>**a</sup>
<b>22:4n-6</b>	0,68 ± 0,05	0,38 ± 0,02 <sup>***a</sup>
<b>22:5n-6</b>	0,79 ± 0,11	0,64 ± 0,01
<b>22:5n-3</b>	1,43 ± 0,17	1,26 ± 0,12
<b>22:6n-3</b>	2,82 ± 0,09	2,53 ± 0,15

Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \* (p < 0,05); \*\* (p < 0,01); \*\*\* (p < 0,001).

#### ▪ Corazón

El tratamiento no modificó los valores de ACL, DBI o PI de las membranas cardíacas (figura 47). Tampoco se observaron diferencias significativas, entre grupos experimentales, en ninguno de los grupos importantes de ácidos grasos (SFA, UFA, MUFA, PUFA) (tabla 14, figura 48), ni de los ácidos grasos específicamente estudiados (tabla 15).



**Tabla 14:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los índices globales (% mol) de los lípidos de corazón.

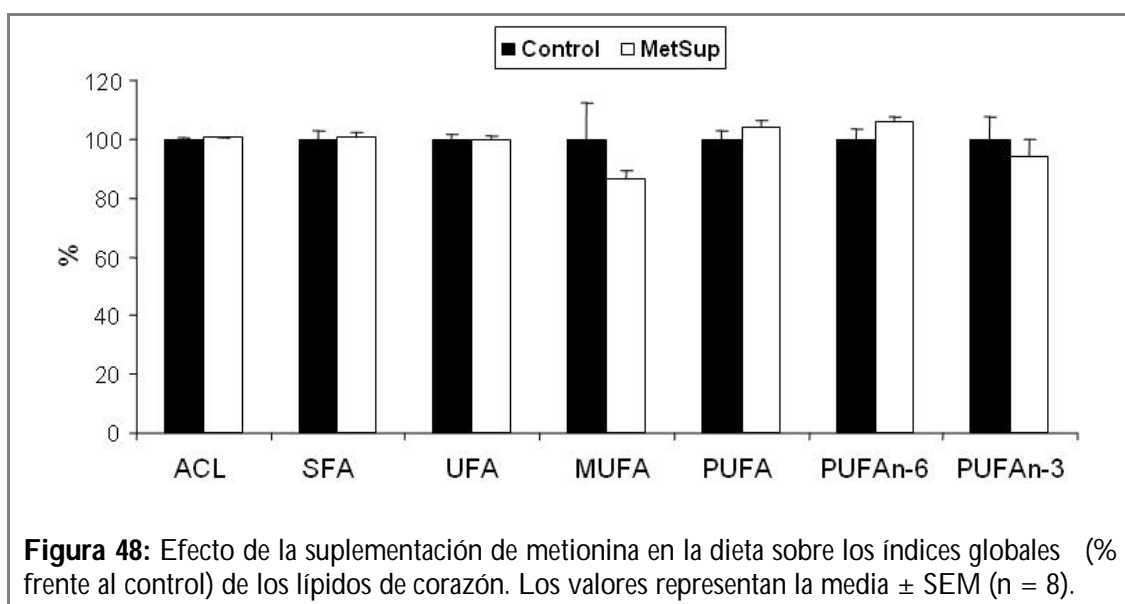
	Control	MetSup
<b>ACL</b>	18,45 $\pm$ 0,07	18,51 $\pm$ 0,04
<b>SFA</b>	39,44 $\pm$ 1,19	39,55 $\pm$ 0,74
<b>UFA</b>	60,55 $\pm$ 1,19	60,44 $\pm$ 0,74
<b>MUFA</b>	14,76 $\pm$ 1,84	12,74 $\pm$ 0,43
<b>PUFA</b>	45,78 $\pm$ 1,38	47,70 $\pm$ 0,97
<b>PUFAn-6</b>	40,06 $\pm$ 1,33	42,31 $\pm$ 0,71
<b>PUFAn-3</b>	5,71 $\pm$ 0,45	5,38 $\pm$ 0,32

Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8).

**Tabla 15:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la composición de ácidos grasos (% respecto al total de lípidos) de los lípidos de corazón.

	Control	MetSup
<b>14:0</b>	0,47 ± 0,14	0,45 ± 0,10
<b>16:0</b>	13,98 ± 0,58	12,23 ± 0,57
<b>16:1n-7</b>	1,23 ± 0,44	0,80 ± 0,20
<b>18:0</b>	22,03 ± 1,49	23,19 ± 0,62
<b>18:1n-9</b>	13,21 ± 1,45	11,60 ± 0,31
<b>18:2n-6</b>	16,16 ± 1,14	18,03 ± 0,37
<b>18:4n-3</b>	1,28 ± 0,12	1,61 ± 0,17
<b>20:0</b>	0,39 ± 0,06	0,48 ± 0,03
<b>20:1</b>	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,02
<b>20:2n-6</b>	0,65 ± 0,09	0,79 ± 0,10
<b>20:3n-6</b>	0,35 ± 0,14	0,61 ± 0,06
<b>20:4n-6</b>	22,88 ± 1,66	22,87 ± 0,78
<b>22:0</b>	2,12 ± 0,16	2,40 ± 0,09
<b>22:6n-3</b>	4,43 ± 0,38	3,77 ± 0,27
<b>24:0</b>	0,43 ± 0,16	0,79 ± 0,08

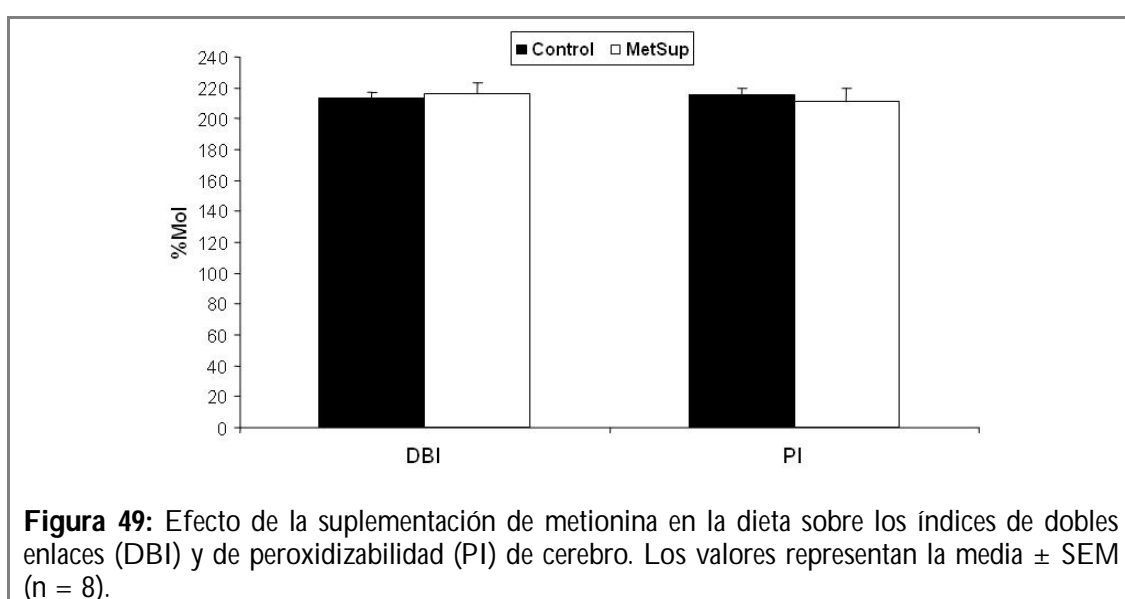
Los valores representan la media ± SEM (n = 8).



#### ▪ Cerebro

Tanto el ACL como el DBI y el PI de las membranas de cerebro no presentaron diferencias significativas entre grupos experimentales (figura 49, 50).

Tampoco se modificaron los valores de ninguno de los grupos importantes de ácidos grasos (SFA, UFA, MUFA, PUFA) (tabla 16, figura 50) debido a la suplementación de metionina en la dieta.

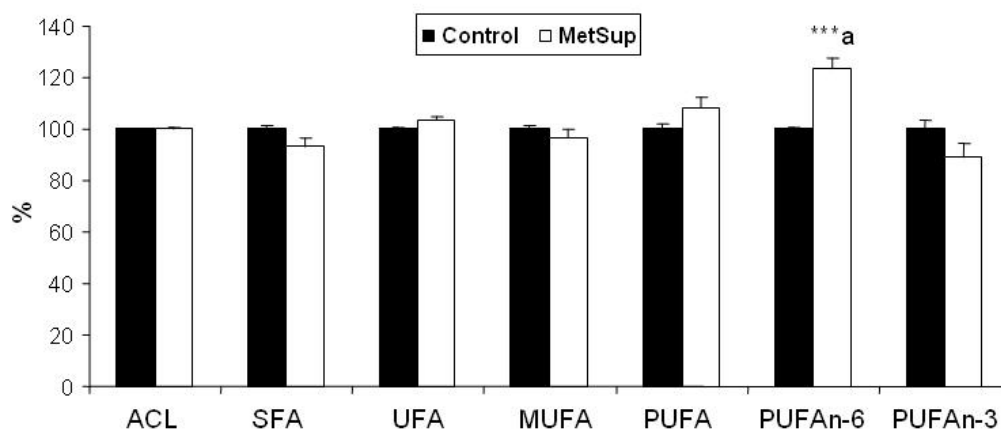


Aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles globales de los PUFA, se produjo un incremento significativo de los PUFA<sub>n-6</sub> en el grupo suplementado con metionina. Este incremento significativo de los niveles de los PUFA<sub>n-6</sub> en el grupo MetSup parece debido al aumento en los niveles de los ácidos grasos 11,14-eicosadienoico, (20:2n-6), dihomo- $\gamma$ -linoleico (20:3n-6) y araquidónico (20:4n-6) (tabla 17).

**Tabla 16:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los índices globales (% mol) de los lípidos de cerebro.

	Control	MetSup
<b>ACL</b>	19,12 $\pm$ 0,05	19,14 $\pm$ 0,08
<b>SFA</b>	31,61 $\pm$ 0,52	29,38 $\pm$ 1,04
<b>UFA</b>	68,38 $\pm$ 0,52	70,61 $\pm$ 1,04
<b>MUFA</b>	29,19 $\pm$ 0,32	28,17 $\pm$ 0,97
<b>PUFA</b>	39,19 $\pm$ 0,73	42,44 $\pm$ 1,72
<b>PUFA<sub>n-6</sub></b>	22,18 $\pm$ 0,20	27,34 $\pm$ 1,00 <sup>***a</sup>
<b>PUFA<sub>n-3</sub></b>	17,00 $\pm$ 0,57	15,10 $\pm$ 0,93

Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*\*\* (p < 0,001).



**Figura 50:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los índices globales (% frente al control) de los lípidos de cerebro. Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control \*\*\* (p < 0,001).

**Tabla 17:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la composición de ácidos grasos (% respecto al total de lípidos) de los lípidos de cerebro.

	<b>Control</b>	<b>MetSup</b>
<b>14:0</b>	0,14 ± 0,03	0,08 ± 0,01
<b>16:0</b>	10,55 ± 0,46	9,79 ± 0,75
<b>16:1n-7</b>	0,28 ± 0,02	0,27 ± 0,04
<b>18:0</b>	18,12 ± 0,39	17,15 ± 0,42
<b>18:1n-9</b>	24,78 ± 0,31	24,10 ± 0,96
<b>18:2n-6</b>	1,55 ± 0,07	1,35 ± 0,15
<b>18:3n-3</b>	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,02
<b>18:4n-6</b>	2,38 ± 0,08	2,30 ± 0,28
<b>20:0</b>	1,05 ± 0,07	0,96 ± 0,10
<b>20:1n-9</b>	4,12 ± 0,18	3,79 ± 0,36
<b>20:2n-6</b>	0,52 ± 0,05	2,13 ± 0,33 <sup>***a</sup>
<b>20:3n-6</b>	0,10 ± 0,01	2,82 ± 0,47 <sup>***a</sup>
<b>20:4n-6</b>	12,74 ± 0,13	14,04 ± 0,37 <sup>**a</sup>
<b>20:5n-3</b>	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,02
<b>22:0</b>	1,57 ± 0,26	1,31 ± 0,11
<b>22:4n-6</b>	4,19 ± 0,16	3,93 ± 0,14
<b>22:5n-6</b>	0,68 ± 0,03	0,74 ± 0,04
<b>22:5n-3</b>	2,00 ± 0,16	1,71 ± 0,21
<b>22:6n-3</b>	12,81 ± 0,33	11,34 ± 0,85
<b>24:0</b>	0,14 ± 0,04	0,07 ± 0,01
<b>24:5n-3</b>	0,26 ± 0,07	0,36 ± 0,16
<b>24:6n-3</b>	1,65 ± 0,16	1,43 ± 0,15

Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*\* (p < 0,01); \*\*\* (p < 0,001).

- **Riñón**

En el caso del riñón no se encontraron diferencias debidas al tratamiento en los valores de DBI y PI (figura 51). Tampoco se observaron diferencias significativas en el ACL ni en ninguno de los grupos importantes de ácidos grasos (SFA, UFA, MUFA, PUFA) (tabla 18, figura 52). Ninguno de los valores de los ácidos grasos estudiados experimentó variaciones significativas tras el tratamiento (tabla 19).

**Tabla 18:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los índices globales (% mol) de los lípidos de riñón.

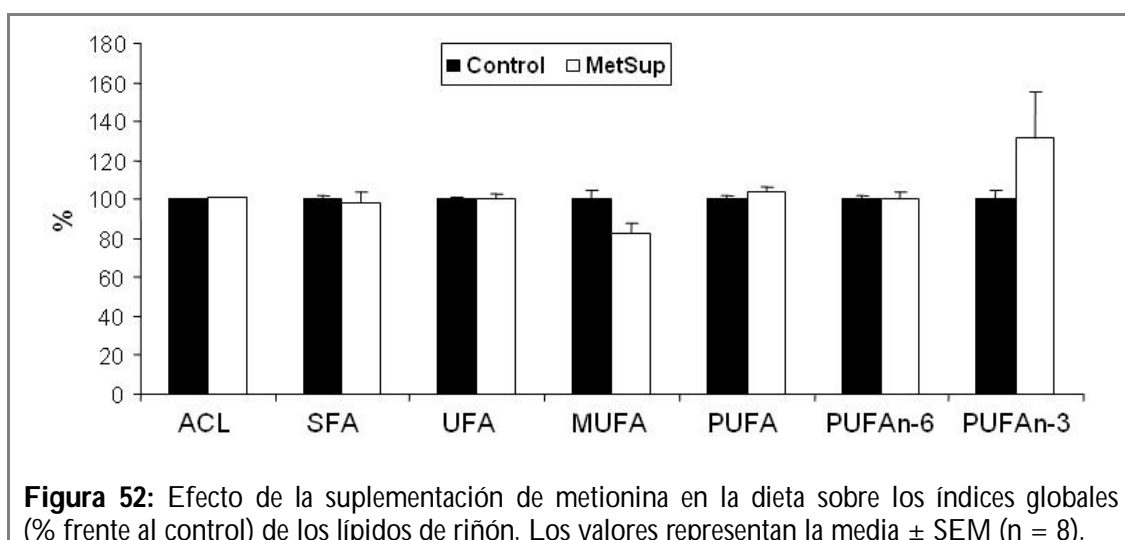
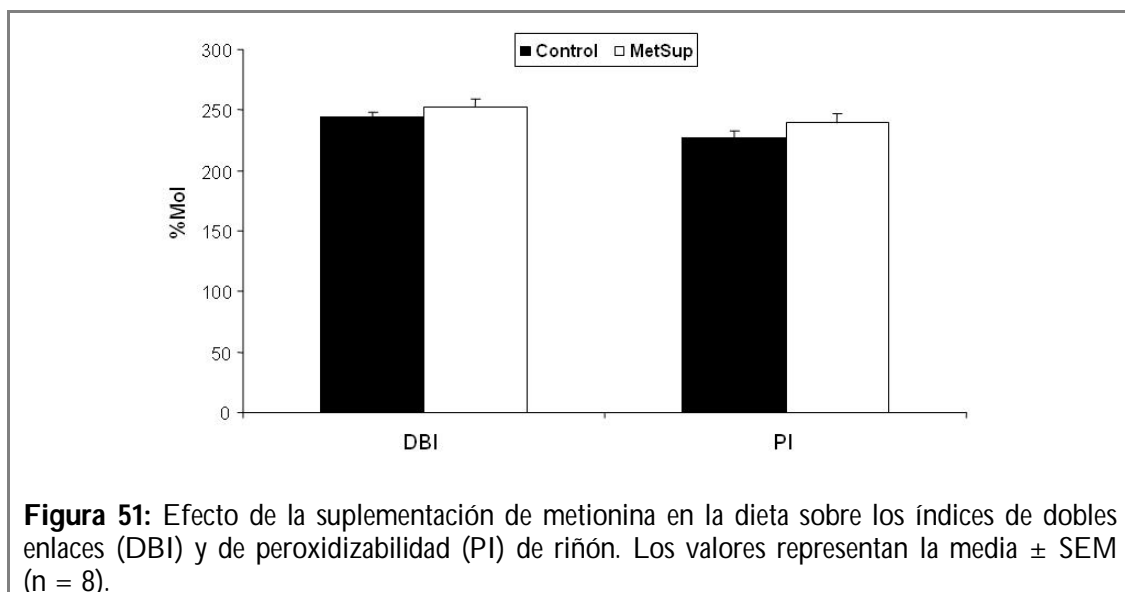
	<b>Control</b>	<b>MetSup</b>
<b>ACL</b>	18,97 ± 0,03	19,10 ± 0,06
<b>SFA</b>	26,07 ± 0,62	25,65 ± 1,38
<b>UFA</b>	73,92 ± 0,62	74,34 ± 1,38
<b>MUFA</b>	10,15 ± 0,51	8,36 ± 0,59
<b>PUFA</b>	63,77 ± 1,07	65,98 ± 1,74
<b>PUFAn-6</b>	57,33 ± 1,16	57,55 ± 2,15
<b>PUFAn-3</b>	6,43 ± 0,32	8,42 ± 1,56

Los valores representan la media ± SEM (n = 8).

**Tabla 19:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la composición de ácidos grasos (% respecto al total de lípidos) de los lípidos de riñón.

	<b>Control</b>	<b>MetSup</b>
<b>14:0</b>	0,36 ± 0,03	0,33 ± 0,06
<b>16:0</b>	10,00 ± 0,38	9,00 ± 0,73
<b>16:1n-7</b>	0,48 ± 0,09	0,54 ± 0,15
<b>18:0</b>	12,67 ± 0,56	13,30 ± 0,70
<b>18:1n-9</b>	8,97 ± 0,44	7,35 ± 0,51
<b>18:2n-6</b>	14,10 ± 0,42	13,83 ± 1,08
<b>18:3n-3</b>	0,47 ± 0,11	1,48 ± 0,54
<b>18:4n-6</b>	4,67 ± 0,40	3,77 ± 0,07
<b>20:0</b>	0,51 ± 0,07	0,59 ± 0,09
<b>20:1n-9</b>	0,69 ± 0,09	0,46 ± 0,04
<b>20:2n-6</b>	0,92 ± 0,06	1,00 ± 0,23
<b>20:3n-6</b>	0,38 ± 0,03	0,36 ± 0,08
<b>20:4n-6</b>	36,32 ± 1,21	36,69 ± 1,64
<b>20:5n-3</b>	0,40 ± 0,07	0,31 ± 0,07
<b>22:0</b>	2,24 ± 0,16	2,04 ± 0,26
<b>22:4n-6</b>	0,46 ± 0,02	1,41 ± 0,52
<b>22:5n-6</b>	0,46 ± 0,04	0,45 ± 0,04
<b>22:5n-3</b>	1,56 ± 0,11	1,65 ± 0,08
<b>22:6n-3</b>	1,81 ± 0,19	1,28 ± 0,23
<b>24:0</b>	0,27 ± 0,04	0,38 ± 0,10
<b>24:5n-3</b>	0,93 ± 0,22	0,71 ± 0,09
<b>24:6n-3</b>	1,24 ± 0,28	2,96 ± 1,18

Los valores representan la media ± SEM (n = 8).



### 1.1.7.- Daño oxidativo a proteínas

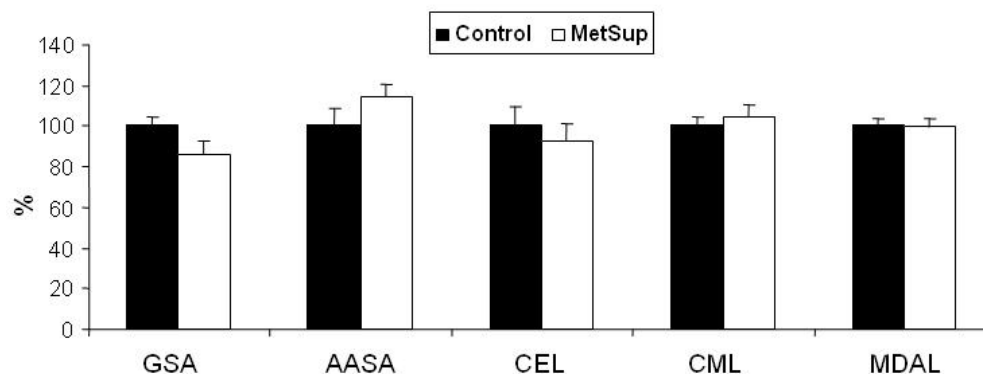
#### ▪ Hígado

Como se puede ver en la tabla 20 y en la figura 53, el tratamiento no modificó el nivel de ninguno de los marcadores de daño oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo estudiados en el caso de las proteínas de hígado.

**Tabla 20:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los marcadores de estrés oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo ( $\mu\text{moles/mol}$  de lisina) en proteínas de hígado.

	Control	MetSup
<b>GSA</b>	3063,61 $\pm$ 151,61	2638,51 $\pm$ 207,33
<b>AASA</b>	128,55 $\pm$ 11,14	147,05 $\pm$ 7,52
<b>CEL</b>	336,99 $\pm$ 31,70	313,95 $\pm$ 26,44
<b>CML</b>	1081,24 $\pm$ 47,04	1133,96 $\pm$ 63,51
<b>MDAL</b>	427,41 $\pm$ 14,95	426,62 $\pm$ 16,50

Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8).



**Figura 53:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los marcadores de estrés oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo (% respecto al control) en proteínas de hígado. Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8).

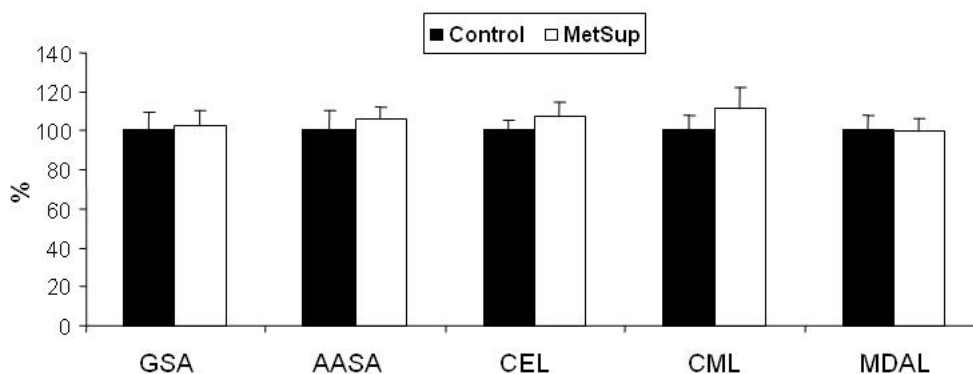
#### ▪ Corazón

Tampoco se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales en estos marcadores de daño oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo en el caso del corazón (tabla 21, figura 54).

**Tabla 21:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los marcadores de estrés oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo ( $\mu\text{moles/mol}$  de lisina) en proteínas de corazón.

	Control	MetSup
<b>GSA</b>	2916,46 $\pm$ 273,72	3012,59 $\pm$ 219,47
<b>AASA</b>	306,03 $\pm$ 32,27	324,72 $\pm$ 18,56
<b>CEL</b>	456,10 $\pm$ 26,30	488,59 $\pm$ 33,27
<b>CML</b>	1158,98 $\pm$ 88,11	1294,28 $\pm$ 127,80
<b>MDAL</b>	388,14 $\pm$ 32,31	384,96 $\pm$ 27,70

Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8).



**Figura 54:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los marcadores de estrés oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo (% respecto al control) en proteínas de corazón. Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8).

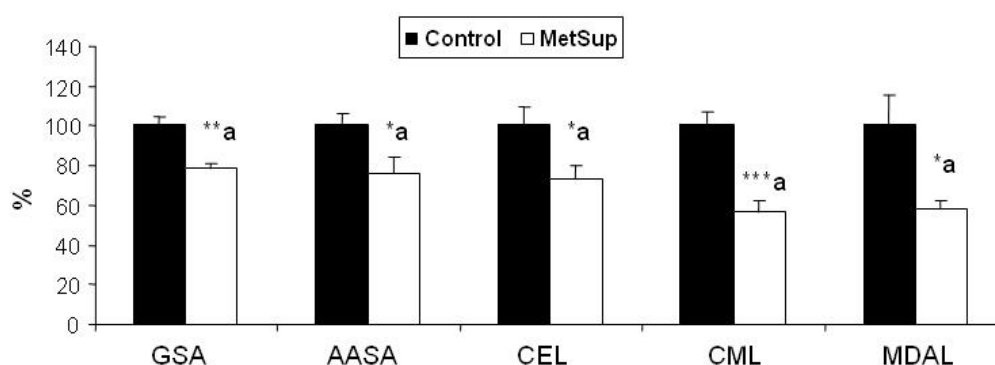
#### ▪ Cerebro

Sin embargo, en el cerebro se produjo una disminución significativa de los niveles de todos los marcadores de daño oxidativo, lipoxidativo y glicoxidativo a proteínas estudiados en el grupo suplementado con metionina (tabla 22, figura 55).

**Tabla 22:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los marcadores de estrés oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo ( $\mu\text{moles/mol}$  de lisina) en proteínas de cerebro.

	Control	MetSup
<b>GSA</b>	10848,52 $\pm$ 477,88	8481,75 $\pm$ 317,78 <sup>**a</sup>
<b>AASA</b>	157,36 $\pm$ 10,98	119,60 $\pm$ 12,52 <sup>a</sup>
<b>CEL</b>	495,03 $\pm$ 45,96	362,34 $\pm$ 32,44 <sup>a</sup>
<b>CML</b>	699,06 $\pm$ 50,68	395,88 $\pm$ 40,14 <sup>***a</sup>
<b>MDAL</b>	711,22 $\pm$ 109,14	413,80 $\pm$ 31,86 <sup>a</sup>

Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*(p < 0,05); \*\*(p < 0,01), \*\*\*(p < 0,001).



**Figura 55:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los marcadores de estrés oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo (% respecto al control) en proteínas de cerebro. Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*(p < 0,05); \*\*(p < 0,01), \*\*\*(p < 0,001).

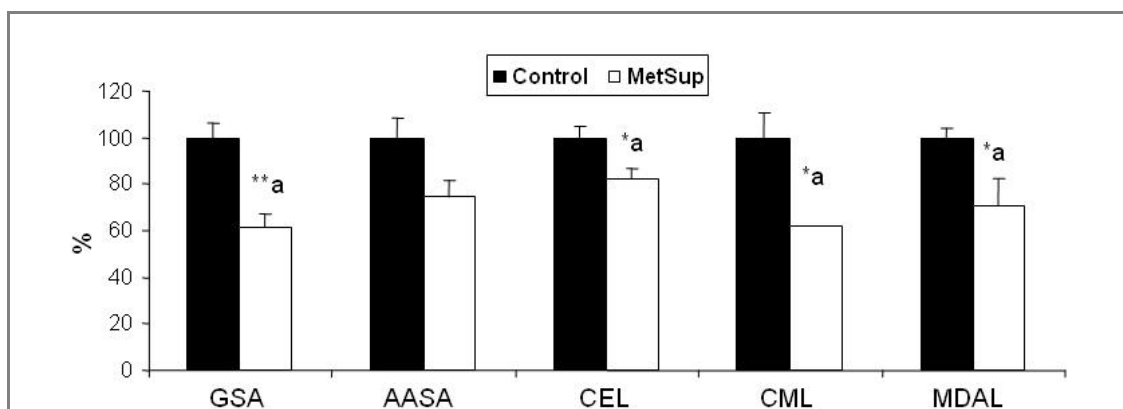
## ▪ Riñón

También en el riñón de los animales pertenecientes al grupo suplementado con metionina se observa un descenso significativo de todos los marcadores de daño oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo estudiados, salvo el AASA (tabla 23, figura 56).

**Tabla 23:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los marcadores de estrés oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo ( $\mu\text{moles/mol}$  de lisina) en proteínas de riñón.

	Control	MetSup
<b>GSA</b>	6191,04 $\pm$ 366,84	3810,92 $\pm$ 370,53 <sup>**a</sup>
<b>AASA</b>	313,93 $\pm$ 26,51	233,19 $\pm$ 22,88
<b>CEL</b>	479,97 $\pm$ 21,50	395,67 $\pm$ 21,28 <sup>*a</sup>
<b>CML</b>	729,40 $\pm$ 78,25	452,27 $\pm$ 3,21 <sup>*a</sup>
<b>MDAL</b>	427,04 $\pm$ 17,91	302,72 $\pm$ 48,04 <sup>*a</sup>

Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ).



**Figura 56:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre los marcadores de estrés oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo (% respecto al control) en proteínas de riñón. Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ).

### 1.1.8.- Concentración de metionina, SAM y SAH en tejido

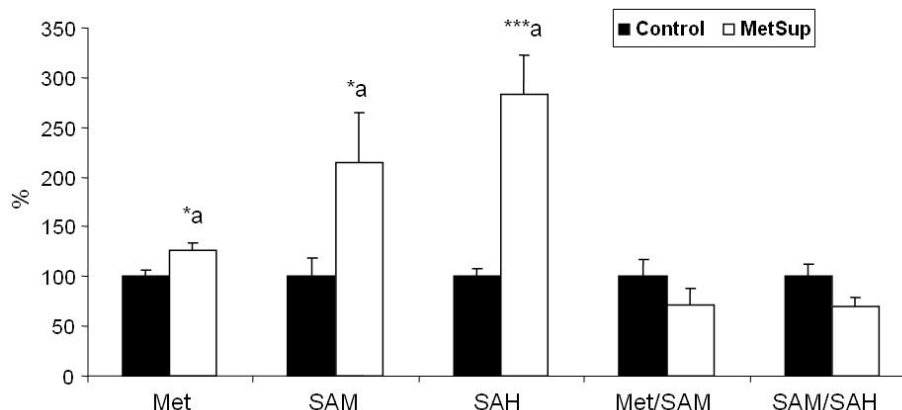
#### ▪ Hígado

La concentración de metionina, SAM y SAH aumentó significativamente en el grupo suplementado con metionina en la dieta en el hígado, mientras que los cocientes estudiados no se modificaron (tabla 24, figura 57).

**Tabla 24:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la concentración de metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH) (nmol/g tejido), así como los cocientes Met/SAM y SAM/SAH, en hígado.

	Control	MetSup
<b>Met</b>	343,57 ± 23,73	433,09 ± 28,81 <sup>*a</sup>
<b>SAM</b>	28,61 ± 5,21	61,50 ± 14,35 <sup>*a</sup>
<b>SAH</b>	42,22 ± 3,49	119,64 ± 16,77 <sup>***a</sup>
<b>Met/SAM</b>	14,38 ± 2,34	10,24 ± 2,38
<b>SAM/SAH</b>	0,67 ± 0,08	0,47 ± 0,06

Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*(p < 0,05), \*\*\*(p < 0,001).



**Figura 57:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la concentración (% respecto al control) de metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), así como los cocientes Met/SAM y SAM/SAH, en hígado. Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*(p < 0,05), \*\*\*(p < 0,001).

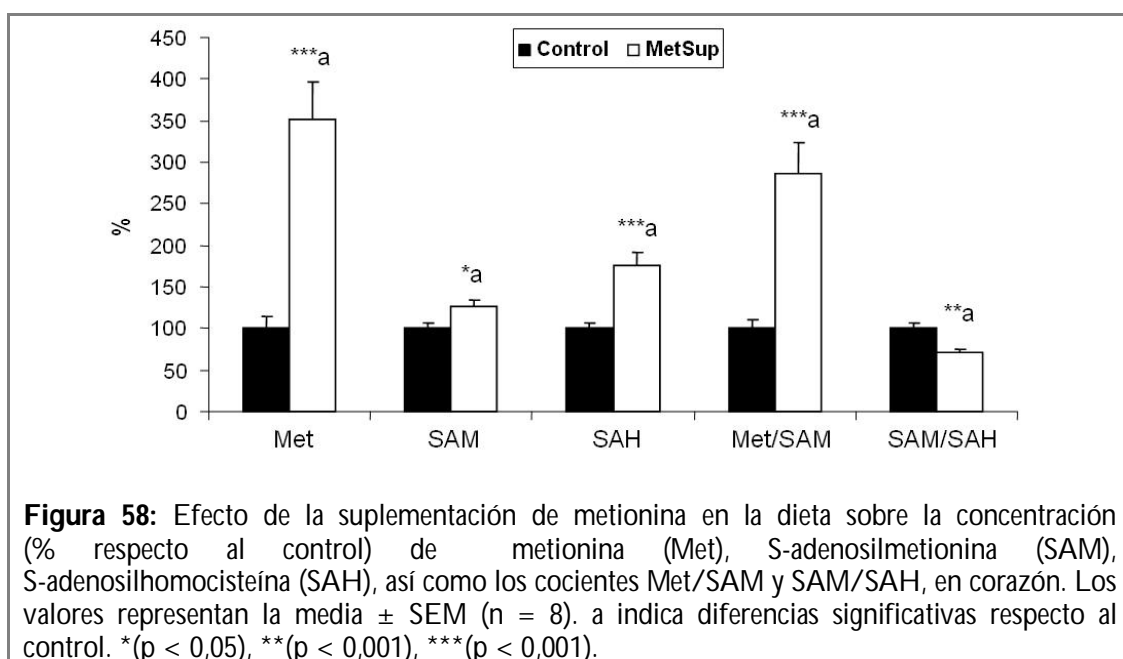
#### ▪ Corazón

En este órgano, se observó un incremento significativo de las concentraciones tanto de metionina, como de todos los metabolitos y del cociente Met/SAH en el grupo suplementado con metionina. Por el contrario, el cociente SAM/SAH experimentó una disminución significativa en este último grupo (tabla 25, figura 58).

**Tabla 25:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la concentración de metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH) (nmol/g tejido), así como los cocientes Met/SAM y SAM/SAH, en corazón.

	Control	MetSup
<b>Met</b>	119,31 ± 17,17	418,69 ± 55,13 <sup>***a</sup>
<b>SAM</b>	12,70 ± 0,74	15,94 ± 1,04 <sup>*a</sup>
<b>SAH</b>	8,97 ± 0,65	15,71 ± 1,42 <sup>***a</sup>
<b>Met/SAM</b>	9,31 ± 1,06	26,64 ± 3,44 <sup>***a</sup>
<b>SAM/SAH</b>	1,45 ± 0,10	1,04 ± 0,06 <sup>**a</sup>

Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*(p < 0,05), \*\*(p < 0,01), \*\*\*(p < 0,001).



**Figura 58:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la concentración (% respecto al control) de metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), así como los cocientes Met/SAM y SAM/SAH, en corazón. Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*(p < 0,05), \*\*(p < 0,001), \*\*\*(p < 0,001).

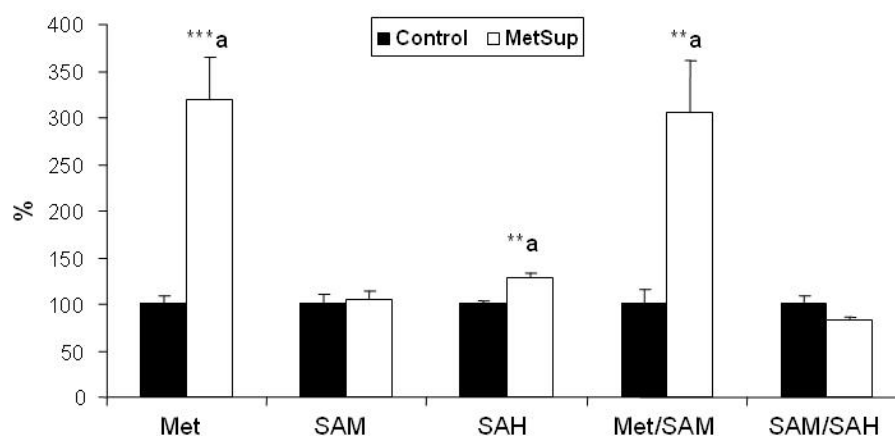
#### ▪ Cerebro

Tanto la concentración de metionina y de SAH como el cociente Met/SAM se incrementaron en el grupo MetSup frente al grupo control, mientras que la concentración de SAM y el cociente SAM/SAH no experimentaron estas diferencias, en el caso del cerebro (tabla 26, figura 59).

**Tabla 26:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la concentración de metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH) (nmol/g tejido), así como los cocientes Met/SAM y SAM/SAH, en cerebro.

	Control	MetSup
<b>Met</b>	112,76 ± 9,93	359,27 ± 51,43 <sup>***a</sup>
<b>SAM</b>	6,66 ± 0,75	6,96 ± 0,63
<b>SAH</b>	8,24 ± 0,35	10,49 ± 0,49 <sup>**a</sup>
<b>Met/SAM</b>	18,57 ± 2,99	56,56 ± 10,52 <sup>**a</sup>
<b>SAM/SAH</b>	0,80 ± 0,07	0,66 ± 0,03

Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001).



**Figura 59:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la concentración (% respecto al control) de metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), así como los cocientes Met/SAM y SAM/SAH, en cerebro. Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001).

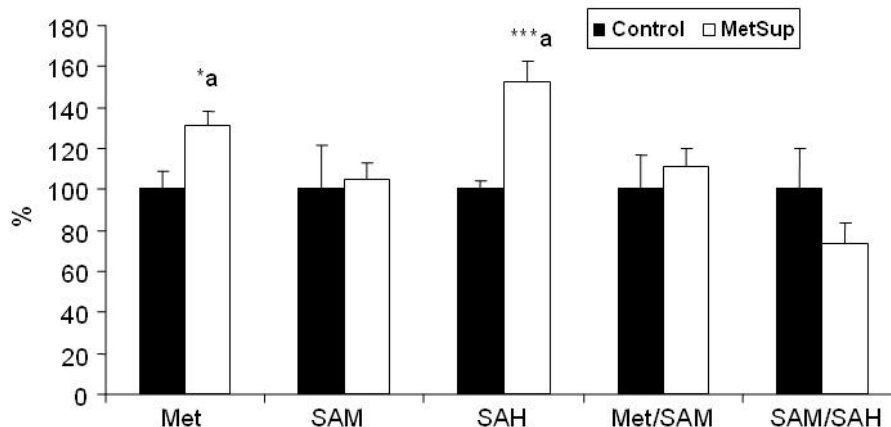
## ▪ Riñón

Por último en el riñón se observó un incremento de la concentración de metionina y de SAH en el grupo suplementado con metionina, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre grupos experimentales en el resto de parámetros estudiados (tabla 27, figura 60).

**Tabla 27:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la concentración de metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH) (nmol/g tejido), así como los cocientes Met/SAM y SAM/SAH, en riñón.

	Control	MetSup
<b>Met</b>	1310,61 ± 113,84	1712,96 ± 97,65 <sup>a</sup>
<b>SAM</b>	10,52 ± 2,26	11,07 ± 0,84
<b>SAH</b>	34,98 ± 1,60	53,31 ± 3,58 <sup>***a</sup>
<b>Met/SAM</b>	143,59 ± 23,99	159,37 ± 12,54
<b>SAM/SAH</b>	0,30 ± 0,06	0,22 ± 0,03

Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*(p<0,05), \*\*\*(p<0,01).



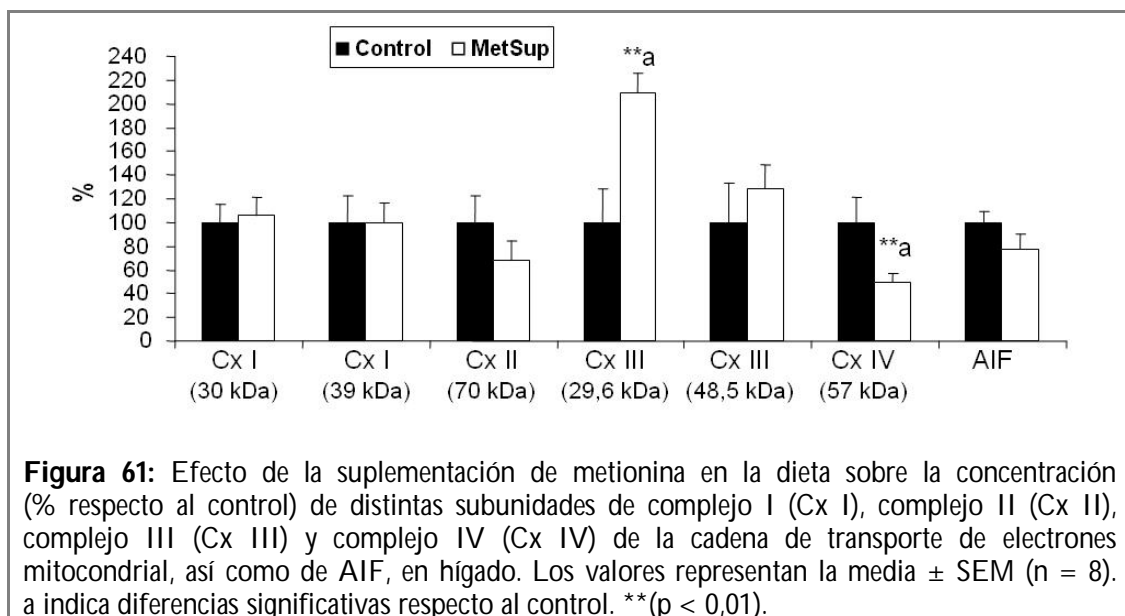
**Figura 60:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la concentración (% respecto al control) de metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), así como los cocientes Met/SAM y SAM/SAH, en riñón. Los valores representan la media ± SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*(p < 0,05), \*\*\*(p < 0,001).

### 1.1.9.- Concentración de los complejos I, II, III y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y de AIF

#### ▪ Hígado

En el caso del hígado, se pudo observar un incremento significativo de la subunidad de 29,6 kDa del complejo III y una disminución significativa de la subunidad de 57 kDa

del complejo IV en el grupo suplementado en metionina respecto al control, mientras que en el resto de subunidades estudiadas y en los valores de AIF no se observaron estas diferencias (figura 61).

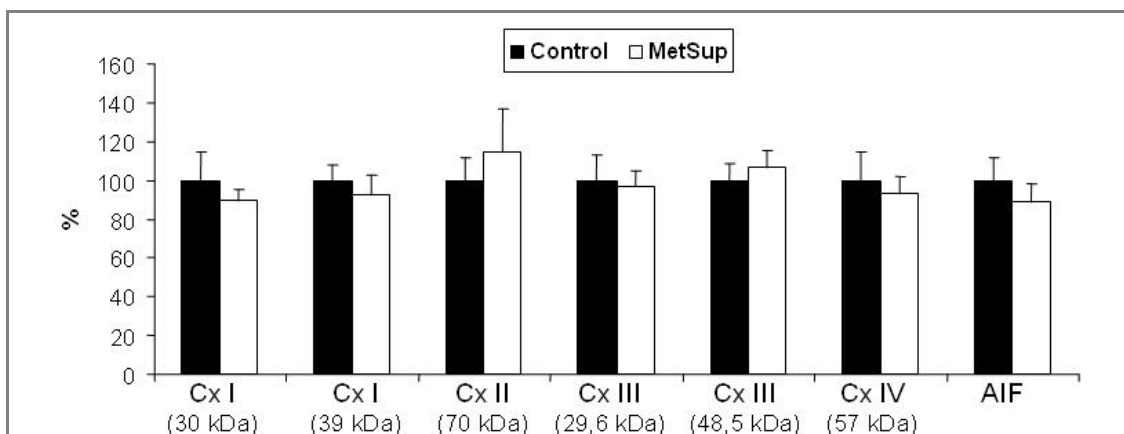


#### ▪ Corazón

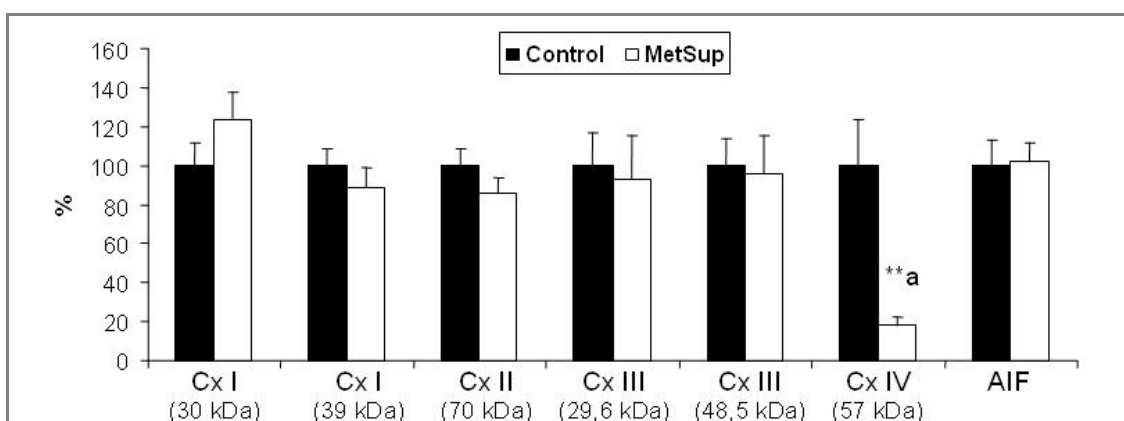
En este caso el tratamiento no determinó modificación alguna de los niveles de ninguna de las subunidades de los complejos mitocondriales estudiadas ni del AIF (figura 62).

#### ▪ Cerebro

Al analizar el cerebro de las ratas suplementadas con metionina, los niveles de la subunidad de 57 kDa del complejo IV experimentaron un incremento respecto al grupo control (figura 63). Por el contrario, el resto de las subunidades estudiadas y los valores de AIF no se vieron alterados por el tratamiento.



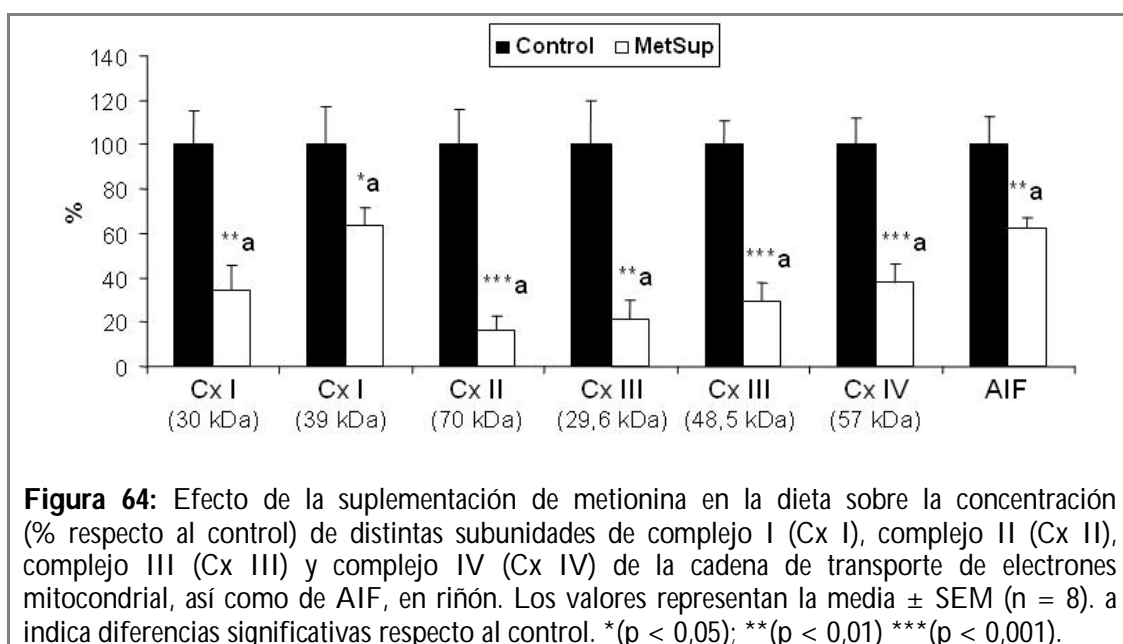
**Figura 62:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la concentración (% respecto al control) de distintas subunidades de complejo I (Cx I), complejo II (Cx II), complejo III (Cx III) y complejo IV (Cx IV) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, así como de AIF, en corazón. Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8).



**Figura 63:** Efecto de la suplementación de metionina en la dieta sobre la concentración (% respecto al control) de distintas subunidades de complejo I (Cx I), complejo II (Cx II), complejo III (Cx III) y complejo IV (Cx IV) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, así como de AIF, en cerebro. Los valores representan la media  $\pm$  SEM (n = 8). a indica diferencias significativas respecto al control. \*\*( $p < 0,01$ ).

## ▪ Riñón

En este último órgano estudiado se pudo observar una disminución significativa de los niveles de todas las subunidades de los complejos de la cadena de transporte de electrones estudiadas y de AIF en el grupo suplementado en metionina frente al grupo control (figura 64).



## 1.2.- Suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro*

### 1.2.1.- Consumo mitocondrial de oxígeno

#### ▪ Hígado

Para estos estudios se utilizó glutamato/malato como sustrato del complejo I y succinato en presencia de rotenona como sustrato del complejo II.

Los datos obtenidos indican que ni la metionina ni ninguno de sus metabolitos de degradación ensayados producen efectos significativos sobre el consumo de oxígeno de las mitocondrias de hígado (tabla 28, 29) ni sobre el RCI (tabla 30, 31). En todos los casos el valor del RCI indicó un buen estado de las mitocondrias ensayadas (tabla 30, 31).

**Tabla 28:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot).

	Tasa de consumo de oxígeno
<b>Glut/mal (estado 4)</b>	19,6 ± 2,3
<b>Glut/mal + ADP (estado 3)</b>	122,2 ± 8,5 <sup>***b</sup>
<b>Glut/mal + Met (100 μM) (estado 4)</b>	18,1 ± 2,1
<b>Glut/mal + Met (100 μM) + ADP (estado 3)</b>	110,4 ± 9,9 <sup>***b</sup>
<b>Glut/mal + SAM (500 μM) (estado 4)</b>	17,5 ± 2,6
<b>Glut/mal + SAM (500 μM) + ADP (estado 3)</b>	106,4 ± 12,7 <sup>***b</sup>
<b>Glut/mal + SAH (500 μM) (estado 4)</b>	16,7 ± 1,3
<b>Glut/mal + SAH (500 μM) + ADP (estado 3)</b>	107,9 ± 10,1 <sup>***b</sup>
<b>Glut + HCys (100 μM) (estado 4)</b>	17,0 ± 2,5
<b>Glut/mal + HCys (100 μM) + ADP (estado 3)</b>	105,6 ± 12,7 <sup>***b</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con glutamato/malato (Glut/mal) como sustrato y, metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), u homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 8). b indica diferencias significativas respecto al consumo de oxígeno en estado 4. \*\*\*(p < 0,001).

**Tabla 29:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot).

	Tasa de consumo de oxígeno
<b>Succ + Rot (estado 4)</b>	1,5 ± 2,1
<b>Succ + Rot + ADP (estado 3)</b>	172,8 ± 11,4 <sup>***b</sup>
<b>Succ + Rot + Met (100 μM) (estado 4)</b>	36,5 ± 3,0
<b>Succ + Rot + Met (100 μM) + ADP (estado 3)</b>	158,8 ± 12,1 <sup>***b</sup>
<b>Succ + Rot + HCys (25 μM) (estado 4)</b>	38,9 ± 2,1
<b>Succ + Rot + HCys (25 μM) + ADP (estado 3)</b>	166,2 ± 13,1 <sup>***b</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con succinato más rotenona (Succ + Rot) como sustrato y, metionina (Met) u homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 4). b indica diferencias significativas respecto al consumo de oxígeno en estado 4. \*\*\* (p < 0,001).

**Tabla 30:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre el índice de control respiratorio (RCI) en mitocondrias de hígado.

	RCI
<b>Glut/mal</b>	6,5 ± 0,3
<b>Glut/mal + Met (100 μM)</b>	6,3 ± 0,4
<b>Glut/mal + SAM (500 μM)</b>	6,4 ± 0,6
<b>Glut/mal + SAH (500 μM)</b>	6,5 ± 0,3
<b>Glut/mal + HCys (100 μM)</b>	6,4 ± 0,5

Las mitocondrias fueron suplementadas con glutamato/malato (Glut/mal) como sustrato y, metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), u homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 8).

**Tabla 31:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre el índice de control respiratorio (RCI) en mitocondrias de hígado.

	<b>RCI</b>
<b>Succ + Rot</b>	4,2 ± 0,1
<b>Succ + Rot + Met (100 µM)</b>	4,2 ± 0,2
<b>Succ + Rot + HCys (25 µM)</b>	4,3 ± 0,2

Las mitocondrias fueron suplementadas con succinato más rotenona (Succ + Rot) como sustrato y, metionina (Met) u homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 4).

#### ▪ Corazón

Las pruebas se hicieron en las mismas condiciones que en el caso del hígado, con la salvedad de que se utilizó piruvato/malato en lugar de glutamato/malato como sustrato del complejo I.

En este órgano se produjo un incremento significativo del consumo de oxígeno en presencia de SAH y homocisteína en estado 4 y de cualquiera de los cuatro metabolitos estudiados en estado 3 (tabla 32, 33). No se encontraron diferencias significativas entre los valores de RCI. En todos los casos el valor del RCI indicó el buen estado de las mitocondrias aisladas (tabla 34, 35).

**Tabla 32:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de corazón (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot).

	Tasa de consumo de oxígeno
<b>Pir/mal (estado 4)</b>	50,2 ± 2,8
<b>Pir/mal + ADP (estado 3)</b>	184,9 ± 7,4 <sup>***b</sup>
<b>Pir/mal + Met (100 μM) (estado 4)</b>	43,7 ± 2,8
<b>Pir/mal + Met (100 μM) + ADP (estado 3)</b>	164,1 ± 9,0 <sup>a,***b</sup>
<b>Pir/mal + SAM (500 μM) (estado 4)</b>	45,8 ± 2,7
<b>Pir/mal + SAM (500 μM) + ADP (estado 3)</b>	159,8 ± 8,9 <sup>a,***b</sup>
<b>Pir/mal + SAH (500 μM) (estado 4)</b>	39,8 ± 3,4 <sup>a</sup>
<b>Pir/mal + SAH (500 μM) + ADP (estado 3)</b>	143,4 ± 7,4 <sup>***a,***b</sup>
<b>Pir/mal + HCys (100 μM) (estado 4)</b>	42,0 ± 3,4 <sup>a</sup>
<b>Pir/mal + HCys (100 μM) + ADP (estado 3)</b>	144,5 ± 10,1 <sup>**a,***b</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato (Pir/mal) como sustrato y, metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), u homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 8). Los superíndices indican diferencias significativas: a respecto al consumo sin la adición de ningún metabolito al ensayo, b respecto al consumo de oxígeno en estado 4. \*(p < 0,05); \*\*(p < 0,01); \*\*\*(p < 0,001).

**Tabla 33:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de corazón (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot).

	Tasa de consumo de oxígeno
<b>Succ + Rot (estado 4)</b>	143,0 ± 4,0
<b>Succ + Rot + ADP (estado 3)</b>	274,6 ± 8,3 <sup>***b</sup>
<b>Succ + Rot + HCys (25 μM) (estado 4)</b>	133,8 ± 5,8
<b>Succ + Rot + HCys (25 μM) + ADP (estado 3)</b>	256,0 ± 12,6 <sup>***b</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con succinato más rotenona (Succ + Rot) como sustrato y homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 4). b indica diferencias significativas respecto al consumo de oxígeno en estado 4. \*\*\*(p < 0,001).

**Tabla 34:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre el índice de control respiratorio (RCI) en mitocondrias de corazón.

	<b>RCI</b>
<b>Pir/mal</b>	3,8 ± 0,3
<b>Pir/mal + Met (100 µM)</b>	3,9 ± 0,4
<b>Pir/mal + SAM (500 µM)</b>	3,7 ± 0,4
<b>Pir/mal + SAH (500 µM)</b>	3,8 ± 0,4
<b>Pir/mal + HCys (100 µM)</b>	3,4 ± 0,3

Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato (Pir/mal) como sustrato y, metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), u homocisteína (HCys) Los valores representan la media ± SEM (n = 8).

**Tabla 35:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre el índice de control respiratorio (RCI) en mitocondrias de corazón.

	<b>RCI</b>
<b>Succ + Rot</b>	1,9 ± 0,1
<b>Succ + Rot + HCys (25 µM)</b>	1,9 ± 0,1

Las mitocondrias fueron suplementadas con succinato más rotenona (Succ + Rot) como sustrato y homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 4).

#### ▪ Cerebro

En el caso del cerebro se utilizó piruvato/malato como sustrato de complejo I.

No se encontraron diferencias significativas con ninguno de los metabolitos utilizados en los ensayos (tabla 36, 37). Tampoco se observaron modificaciones significativas de los valores de RCI, y de nuevo en todos los casos el valor del RCI indicó el buen estado de las mitocondrias aisladas (tabla 38, 39).

**Tabla 36:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de cerebro (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot).

	Tasa de consumo de oxígeno
<b>Pir/mal (estado 4)</b>	10,5 ± 1,5
<b>Pir/mal + ADP (estado 3)</b>	20,2 ± 2,7 <sup>**b</sup>
<b>Pir/mal + Met (100 µM) (estado 4)</b>	9,2 ± 1,3
<b>Pir/mal + Met (100 µM) + ADP (estado 3)</b>	19,1 ± 2,5 <sup>**b</sup>
<b>Pir/mal + SAM (500 µM) (estado 4)</b>	11,3 ± 1,5
<b>Pir/mal + SAM (500 µM) + ADP (estado 3)</b>	21,6 ± 2,8 <sup>**b</sup>
<b>Pir/mal + SAH (500 µM) (estado 4)</b>	10,4 ± 1,1
<b>Pir/mal + SAH (500 µM) + ADP (estado 3)</b>	21,3 ± 1,8 <sup>***b</sup>
<b>Pir/mal + HCys (100 µM) (estado 4)</b>	9,7 ± 1,2
<b>Pir/mal + HCys (100 µM) + ADP (estado 3)</b>	17,4 ± 2,4 <sup>**b</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato (Pir/mal) como sustrato y, metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), u homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 8). b indica diferencias significativas respecto al consumo de oxígeno en estado 4. \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001).

**Tabla 37:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de cerebro (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot).

	Tasa de consumo de oxígeno
<b>Succ + Rot (estado 4)</b>	12,6 ± 1,4
<b>Succ + Rot + ADP (estado 3)</b>	25,8 ± 1,6 <sup>***b</sup>
<b>Succ + Rot + HCys (25 µM) (estado 4)</b>	12,3 ± 1,3
<b>Succ + Rot + HCys (25 µM) + ADP (estado 3)</b>	26,8 ± 1,9 <sup>***b</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con succinato más rotenona (Succ + Rot) como sustrato y homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 4). b indica diferencias significativas respecto al consumo de oxígeno en estado 4. \*\*\* (p < 0,001).

**Tabla 38:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre el índice de control respiratorio (RCI) en mitocondrias de cerebro.

	<b>RCI</b>
<b>Pir/mal</b>	2,0 ± 0,1
<b>Pir/mal + Met (100 µM)</b>	2,1 ± 0,2
<b>Pir/mal + SAM (500 µM)</b>	2,0 ± 0,1
<b>Pir/mal + SAH (500 µM)</b>	2,2 ± 0,2
<b>Pir/mal + HCys (100 µM)</b>	2,0 ± 0,4

Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato (Pir/mal) como sustrato y, metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), u homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 8).

**Tabla 39:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre el índice de control respiratorio (RCI) en mitocondrias de cerebro.

	<b>RCI</b>
<b>Succ + Rot</b>	2,1 ± 0,2
<b>Succ + Rot + HCys (25 µM)</b>	2,2 ± 0,1

Las mitocondrias fueron suplementadas con succinato más rotenona (Succ + Rot) como sustrato y homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 4).

#### ▪ Riñón

Los ensayos con mitocondrias de riñón, se hicieron en las mismas condiciones empleadas en el caso del hígado.

En el riñón se produjo un incremento significativo del consumo de oxígeno al añadir al ensayo homocisteína en estado 4 y cuando se añadía cualquiera de los cuatro metabolitos en estado 3 (tabla 40, 41). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los valores de RCI. Los valores de RCI también en este órgano confirman el buen estado de las mitocondrias aisladas (tabla R39, R40).

**Tabla 40:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de riñón (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot).

	Tasa de consumo de oxígeno
<b>Glut/mal (estado 4)</b>	23,4 ± 1,3
<b>Glut/mal + ADP (estado 3)</b>	84,4 ± 9,5 <sup>a,***b</sup>
<b>Glut/mal + Met (100 μM) (estado 4)</b>	21,7 ± 2,4
<b>Glut/mal + Met (100 μM) + ADP (estado 3)</b>	55,6 ± 2,0 <sup>a,***b</sup>
<b>Glut/mal + SAM (500 μM) (estado 4)</b>	20,1 ± 3,1
<b>Glut/mal + SAM (500 μM) + ADP (estado 3)</b>	57,0 ± 7,6 <sup>a,***b</sup>
<b>Glut/mal + SAH (500 μM) (estado 4)</b>	19,1 ± 2,2
<b>Glut/mal + SAH (500 μM) + ADP (estado 3)</b>	45,2 ± 5,1 <sup>a,***b</sup>
<b>Glut/mal + HCys (100 μM) (estado 4)</b>	16,9 ± 2,4 <sup>a</sup>
<b>Glut/mal + HCys (100 μM) + ADP (estado 3)</b>	41,3 ± 8,4 <sup>a,***b</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con glutamato/malato (Glut/mal) como sustrato y, metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), u homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 8). Los superíndices indican diferencias significativas: a respecto al consumo sin la adición de ningún metabolito al ensayo, b respecto al consumo de oxígeno en estado 4. \*(p < 0,05); \*\*(p < 0,01); \*\*\*(p < 0,001).

**Tabla 41:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de riñón (nmoles de O<sub>2</sub>/min x mg prot).

	Tasa de consumo de oxígeno
<b>Succ + Rot (estado 4)</b>	70,2 ± 3,8
<b>Succ + Rot + ADP (estado 3)</b>	222,9 ± 8,0 <sup>***b</sup>
<b>Succ + Rot + Met (100 μM) (estado 4)</b>	64,9 ± 3,2
<b>Succ + Rot + Met (100 μM) + ADP (estado 3)</b>	196,9 ± 6,3 <sup>***b</sup>
<b>Succ + Rot + HCys (25 μM) (estado 4)</b>	68,8 ± 1,9
<b>Succ + Rot + HCys (25 μM) + ADP (estado 3)</b>	194,3 ± 6,3 <sup>***b</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con succinato más rotenona (Succ + Rot) como sustrato y, metionina (Met) u homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 4). b indica diferencias significativas respecto al consumo de oxígeno en estado 4. \*\*\*(p < 0,001).

**Tabla 42:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre el índice de control respiratorio (RCI) en mitocondrias de riñón.

	RCI
<b>Glut</b>	3,6 ± 0,4
<b>Glut + Met (100 μM)</b>	2,9 ± 0,2
<b>Glut + SAM (500 μM)</b>	3,6 ± 0,2
<b>Glut + SAH (500 μM)</b>	3,2 ± 0,5
<b>Glut + HCys (100 μM)</b>	3,0 ± 0,2

Las mitocondrias fueron suplementadas con glutamato/malato (Glutamato/mal) como sustrato y, metionina (Met), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), u homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 8).

**Tabla 43:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre el índice de control respiratorio (RCI) en mitocondrias de riñón.

	RCI
<b>Succ + Rot</b>	3,2 ± 0,1
<b>Succ + Rot + Met (100 µM)</b>	3,0 ± 0,1
<b>Succ + Rot + HCys (25 µM)</b>	2,8 ± 0,1

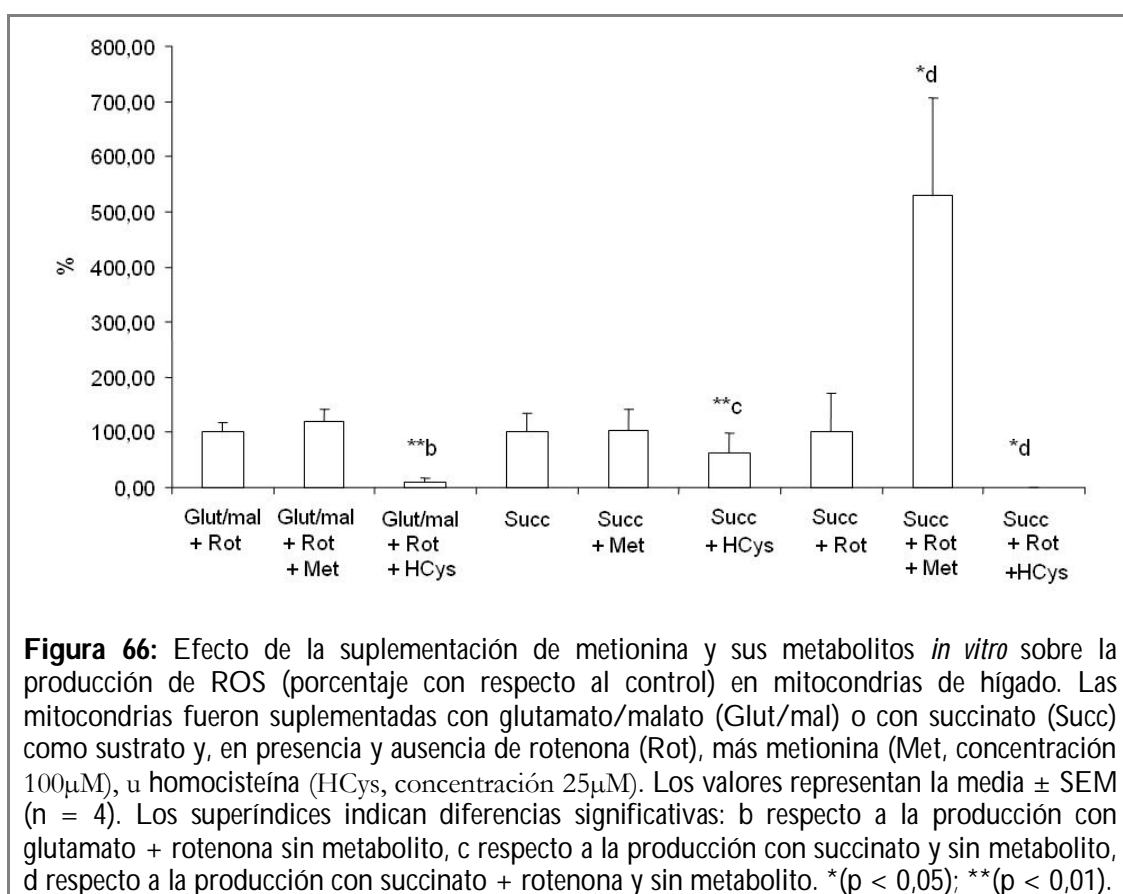
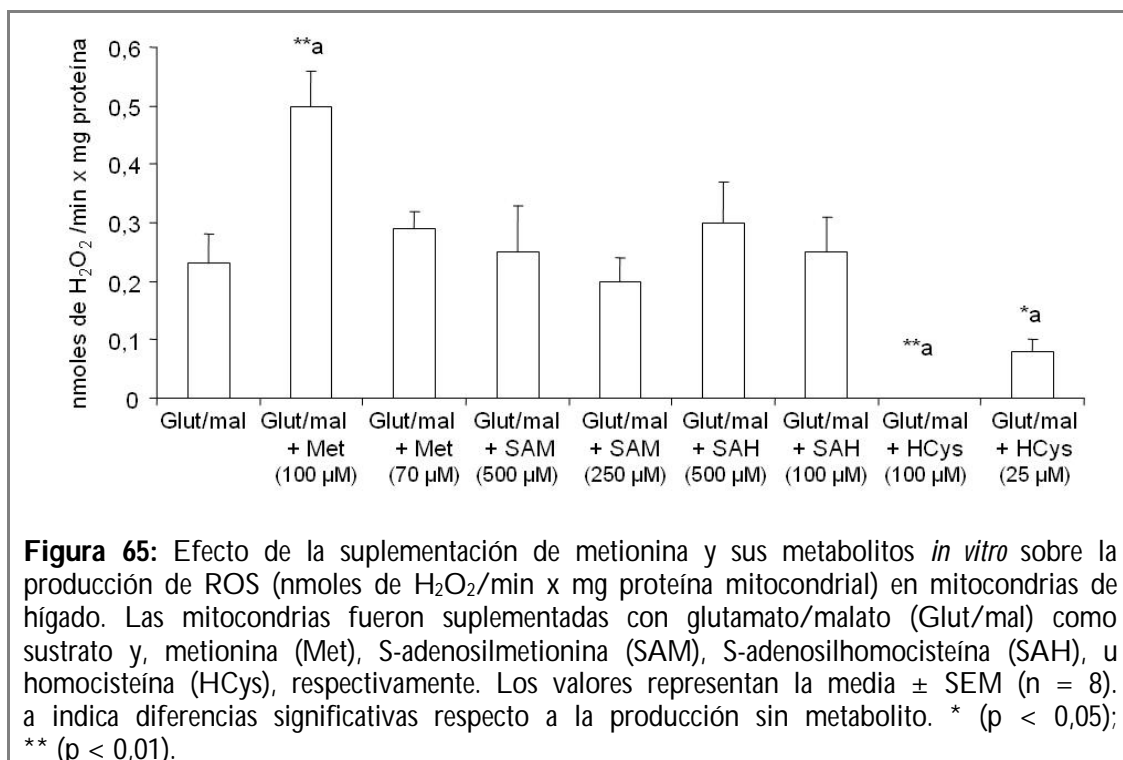
Las mitocondrias fueron suplementadas con succinato más rotenona (Succ + Rot) como sustrato y, metionina (Met) u homocisteína (HCys). Los valores representan la media ± SEM (n = 4).

### 1.2.2.- Producción mitocondrial de ROS

#### ▪ Hígado

Los ensayos se hicieron en presencia de sustratos tanto del complejo I (glutamato/malato) como del complejo II (succinato) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y tanto en presencia como en ausencia de rotenona. Todas las medidas de producción mitocondrial de radicales libres se realizaron en ausencia de ADP (estado 4).

En la tabla 44, así como en la figura 65 y la figura 66 se pueden observar los datos de las medidas de producción de radicales libres de las mitocondrias de hígado. En presencia de metionina (100 µM) se observó un incremento significativo de la producción de ROS cuando se utilizó como sustrato glutamato/malato o succinato con rotenona respecto del ensayo sin añadir el aminoácido. Del mismo modo, hubo una disminución significativa de la producción de ROS en presencia de homocisteína (100 y 25 µM) cuando se utilizó como sustrato glutamato/malato y succinato tanto en ausencia como en presencia de rotenona. Por lo tanto, parece que la metionina a una concentración de 100 µM es capaz de incrementar la producción de radicales libres a nivel del complejo III y que la homocisteína a las concentraciones utilizadas puede disminuir dicha producción tanto a nivel del complejo I como a nivel del complejo III.



**Tabla 44:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre la producción de ROS (nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min x mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de hígado.

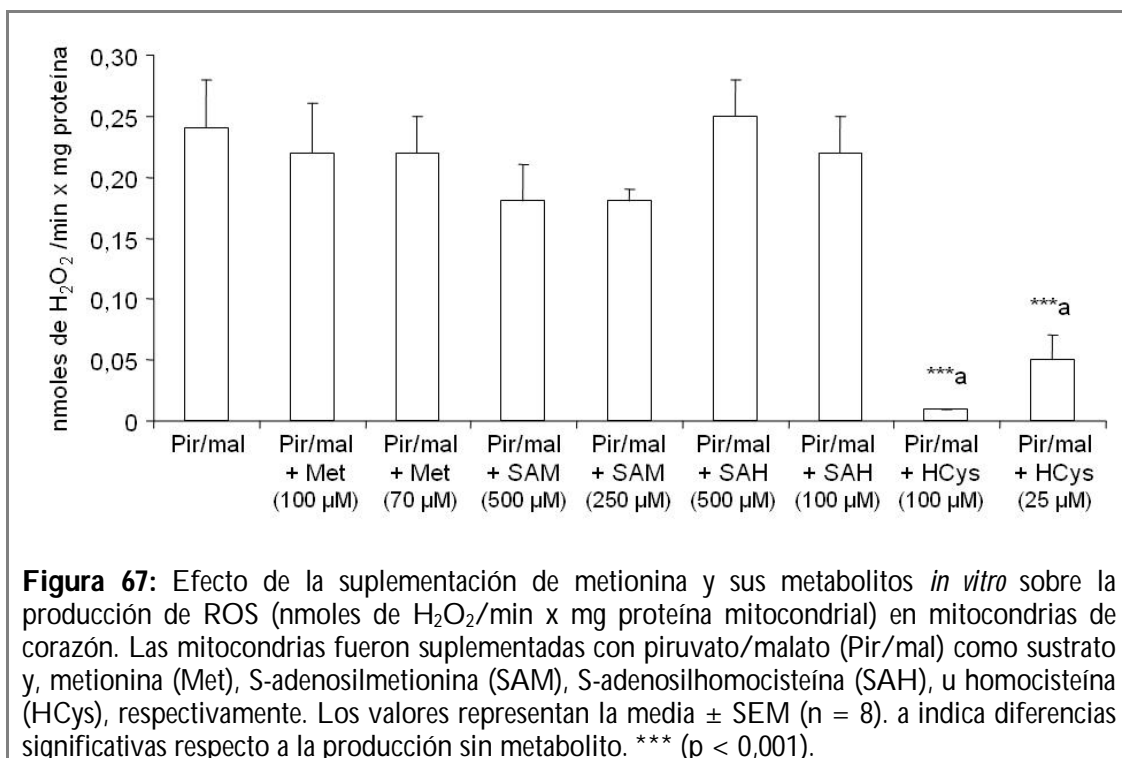
	Producción de ROS
<b>Glut/mal + Rot</b>	0,320 ± 0,055
<b>Glut/mal + Rot +Met (100 µM)</b>	0,387 ± 0,068
<b>Glut/mal + Rot +HCys (25 µM)</b>	0,030 ± 0,025 <sup>**b</sup>
<b>Succ</b>	1,018 ± 0,351
<b>Succ + Met (100 µM)</b>	1,048 ± 0,395
<b>Succ + HCys (25 µM)</b>	0,640 ± 0,359 <sup>**c</sup>
<b>Succ + Rot</b>	0,017 ± 0,012
<b>Succ + Rot +Met (100 µM)</b>	0,090 ± 0,030 <sup>+d</sup>
<b>Succ + Rot +HCys (25 µM)</b>	0,001 ± 0,001 <sup>+d</sup>

Las mitocondrias fueron suplementadas con glutamato/malato (Glut/mal) o con succinato (Succ) como sustrato y, en presencia y ausencia de rotenona (Rot), más metionina (Met, concentración 100µM), u homocisteína (HCys, concentración 25µM). Los valores representan la media ± SEM (n = 4). Los superíndices indican diferencias significativas: b respecto a la producción con glutamato + rotenona sin metabolito, c respecto a la producción con succinato y sin metabolito, d respecto a la producción con succinato + rotenona y sin metabolito. \*(p < 0,05); \*\*(p < 0,01).

#### ▪ Corazón

En el caso del corazón se utilizó piruvato/malato como sustrato de complejo I.

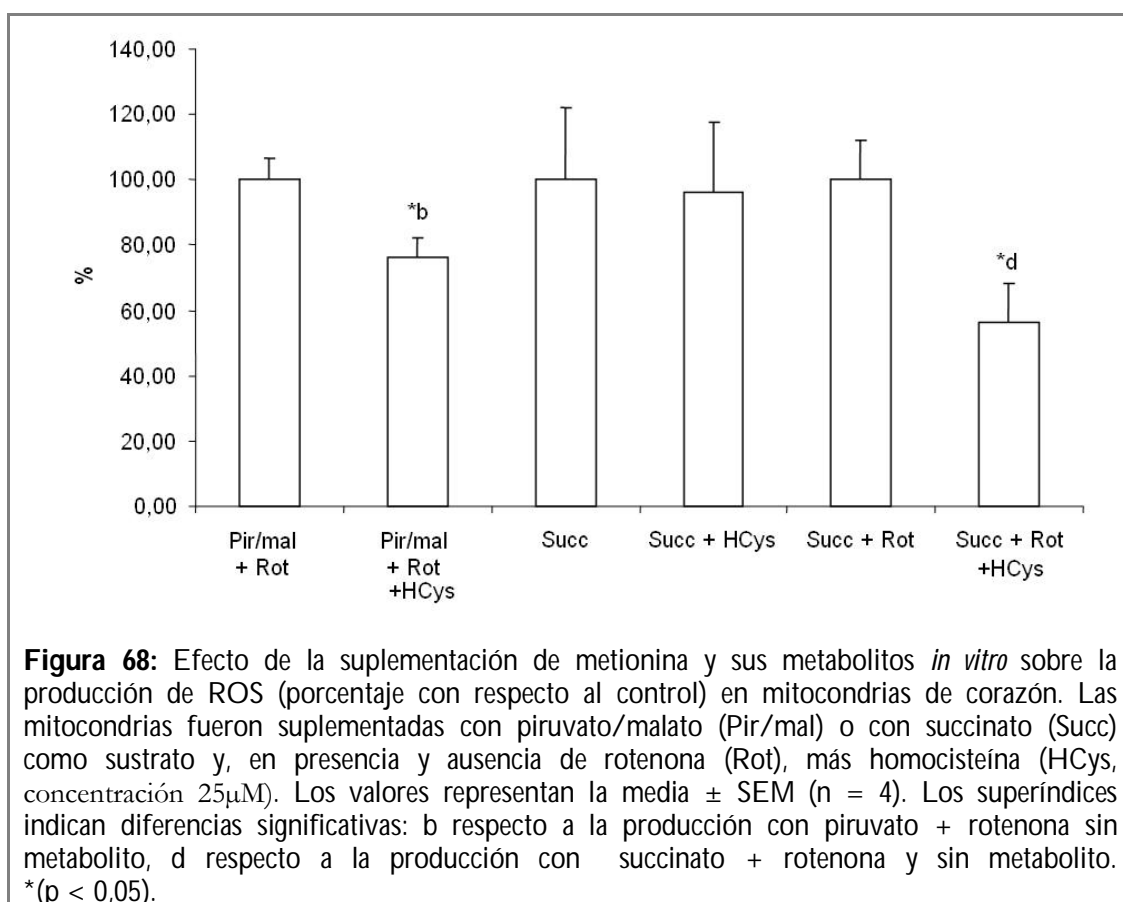
Se encontró una disminución significativa de la producción de ROS en presencia de homocisteína (100 y 25 µM), cuando se utilizaba piruvato/malato (con y sin rotenona) o succinato (con rotenona) como sustrato (tabla 45 y figura 67, 68). Por lo tanto, la homocisteína a las concentraciones utilizadas es capaz de reducir la producción de ROS a nivel tanto del complejo I como del II en mitocondrias cardíacas.



**Tabla 45:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre la producción de ROS (nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min x mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de corazón.

	Producción de ROS
<b>Pir/mal + Rot</b>	2,797 ± 0,183
<b>Pir/mal + Rot +HCys (25 μM)</b>	2,137 ± 0,157 <sup>b</sup>
<b>Succ</b>	2,790 ± 0,612
<b>Succ + HCys (25 μM)</b>	2,688 ± 0,596
<b>Succ + Rot</b>	0,398 ± 0,048
<b>Succ + Rot +HCys (25 μM)</b>	0,225 ± 0,047 <sup>d</sup>

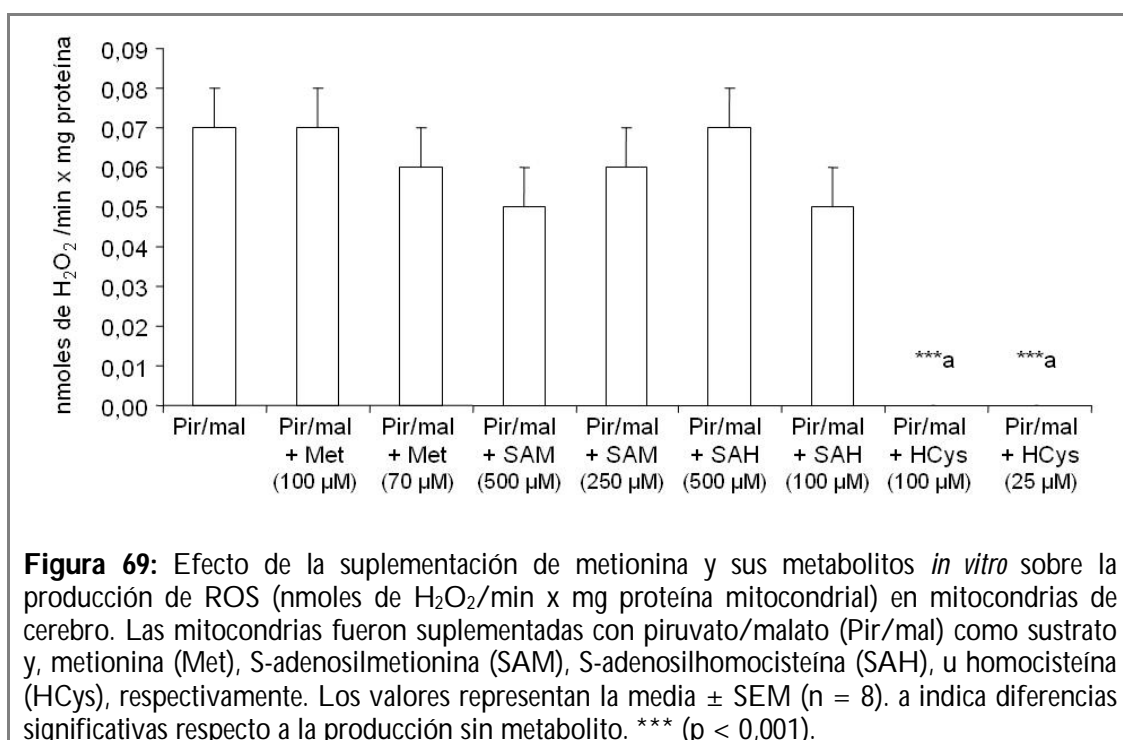
Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato (Pir/mal) o con succinato (Succ) como sustrato y, en presencia y ausencia de rotenona (Rot), más homocisteína (HCys, concentración 25μM). Los valores representan la media ± SEM (n = 4). Los superíndices indican diferencias significativas: b respecto a la producción con piruvato + rotenona sin metabolito, d respecto a la producción con succinato + rotenona y sin metabolito. \*(p < 0,05).



### ▪ Cerebro

Las medidas de producción de ROS en mitocondrias de cerebro se realizaron en las mismas condiciones que en el corazón.

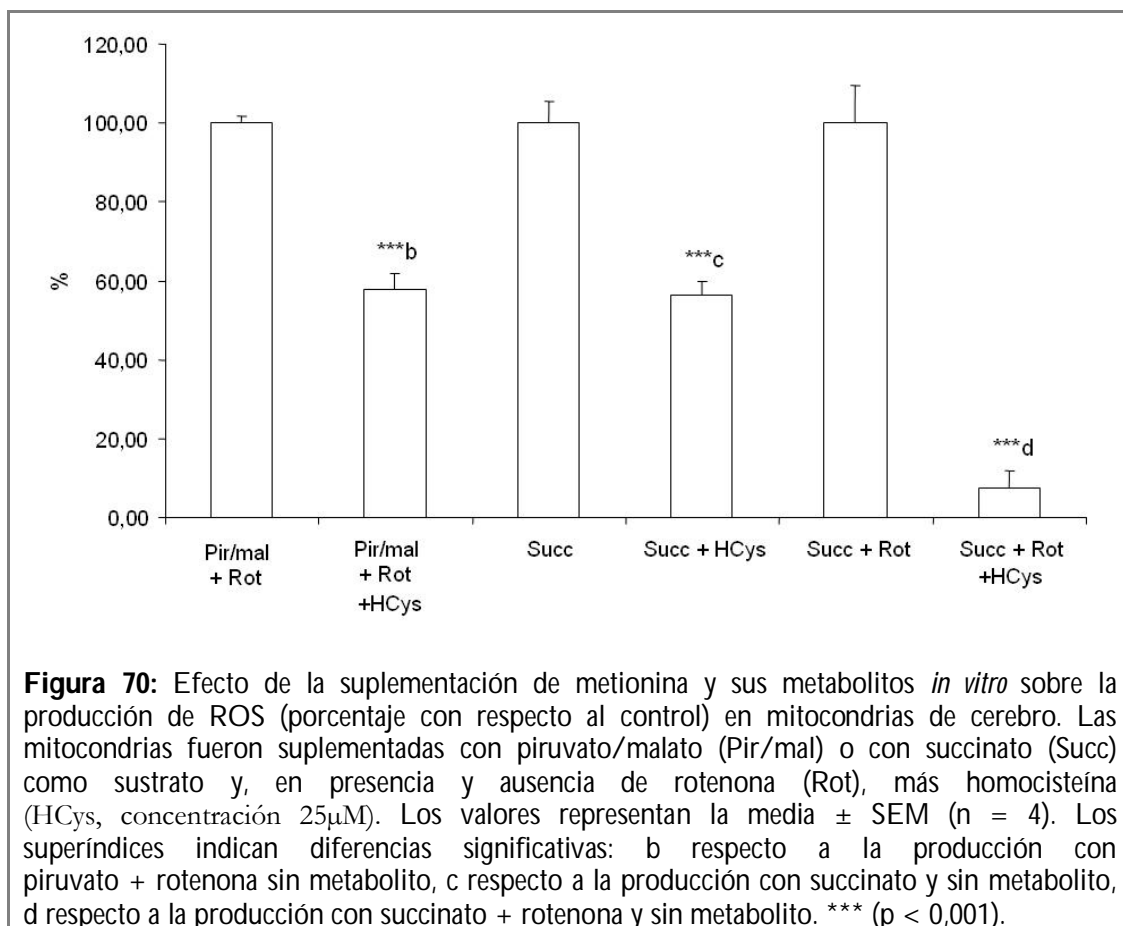
Se pudo observar un descenso significativo de la producción de ROS en presencia de homocisteína (100 $\mu$ M y 25 $\mu$ M) con todas las combinaciones de sustratos e inhibidores utilizadas. Así pues, parece que la homocisteína a las concentraciones utilizadas es capaz de disminuir la producción de ROS tanto a nivel del complejo I como a nivel del complejo II de mitocondrias de cerebro (tabla 46; figura 69, 70).



**Tabla 46:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre la producción de ROS (nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min x mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de cerebro.

	Producción de ROS
<b>Pir/mal + Rot</b>	1,427 ± 0,026
<b>Pir/mal + Rot +HCys (25 μM)</b>	0,827 ± 0,057 <sup>***b</sup>
<b>Succ</b>	1,150 ± 0,062
<b>Succ + HCys (25 μM)</b>	0,648 ± 0,039 <sup>***c</sup>
<b>Succ + Rot</b>	0,240 ± 0,023
<b>Succ + Rot +HCys (25 μM)</b>	0,018 ± 0,010 <sup>***d</sup>

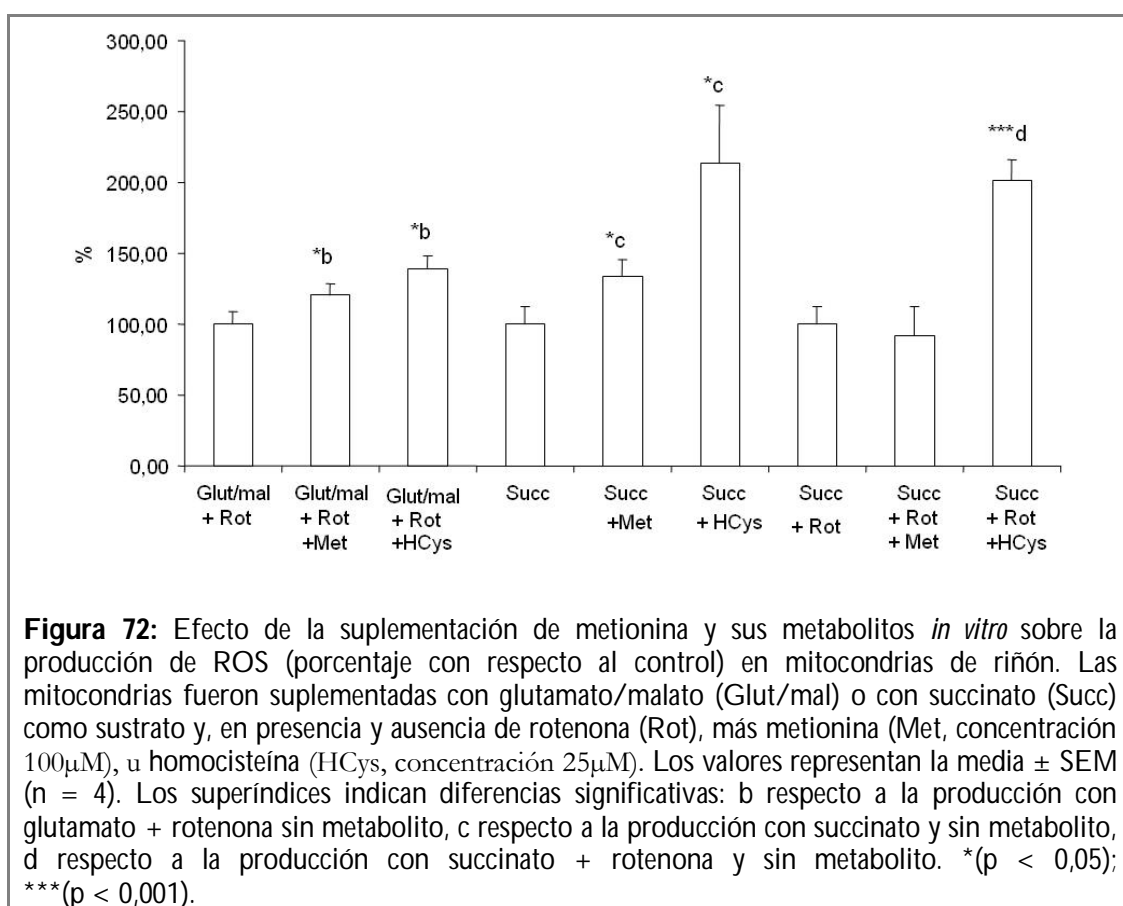
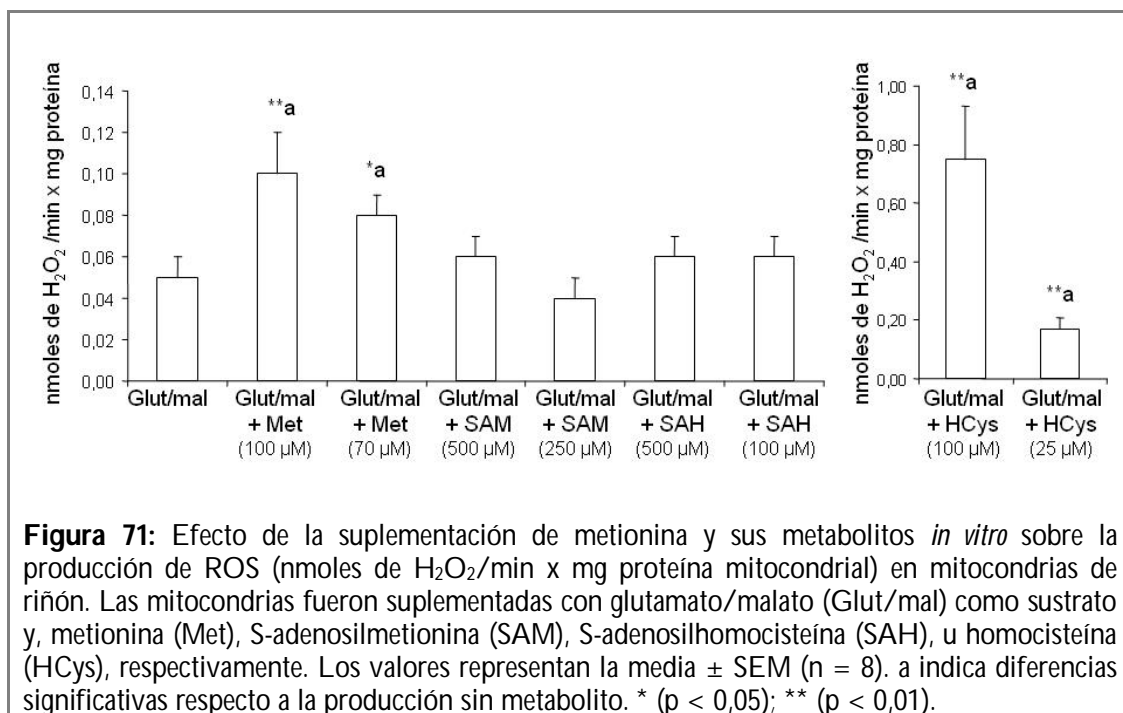
Las mitocondrias fueron suplementadas con piruvato/malato (Pir/mal) o con succinato (Succ) como sustrato y, en presencia y ausencia de rotenona (Rot), más homocisteína (HCys, concentración 25μM). Los valores representan la media ± SEM (n = 4). Los superíndices indican diferencias significativas: b respecto a la producción con piruvato + rotenona sin metabolito, c respecto a la producción con succinato y sin metabolito, d respecto a la producción con succinato + rotenona y sin metabolito. \*\*\* (p < 0,001).



## ▪ Riñón

En las pruebas con mitocondrias de riñón se utilizaron las mismas condiciones que en el caso de las mitocondrias de hígado.

En este órgano se detectó un incremento significativo de la producción de ROS en presencia de metionina (100  $\mu$ M y 70  $\mu$ M) y de homocisteína (100  $\mu$ M y 25  $\mu$ M). El incremento en presencia de metionina se produjo cuando se utilizó como sustrato glutamato/malato con y sin rotenona o succinato con rotenona como sustrato. En el caso de la homocisteína el incremento se produjo con todas las combinaciones de sustratos e inhibidores utilizadas. Así pues, parece que la metionina a las concentraciones utilizadas puede incrementar la producción de radicales libres a nivel del complejo I y que la homocisteína es capaz de producir dicho incremento tanto a nivel del complejo I como del complejo III (tabla 47 y figura 71, 72).



**Tabla 47:** Efecto de la suplementación de metionina y sus metabolitos *in vitro* sobre la producción de ROS (nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min x mg proteína mitocondrial) en mitocondrias de riñón.

	Producción de ROS
<b>Glut/mal + Rot</b>	0,603 ± 0,054
<b>Glut/mal + Rot +Met (100 µM)</b>	0,728 ± 0,048 <sup>*b</sup>
<b>Glut/mal + Rot +HCys (25 µM)</b>	0,840 ± 0,055 <sup>*b</sup>
<b>Succ</b>	0,688 ± 0,086
<b>Succ + Met (100 µM)</b>	0,923 ± 0,079 <sup>*c</sup>
<b>Succ + HCys (25 µM)</b>	1,468 ± 0,281 <sup>*c</sup>
<b>Succ + Rot</b>	0,063 ± 0,008
<b>Succ + Rot +Met (100 µM)</b>	0,058 ± 0,013
<b>Succ + Rot +HCys (25 µM)</b>	0,127 ± 0,009 <sup>***d</sup>

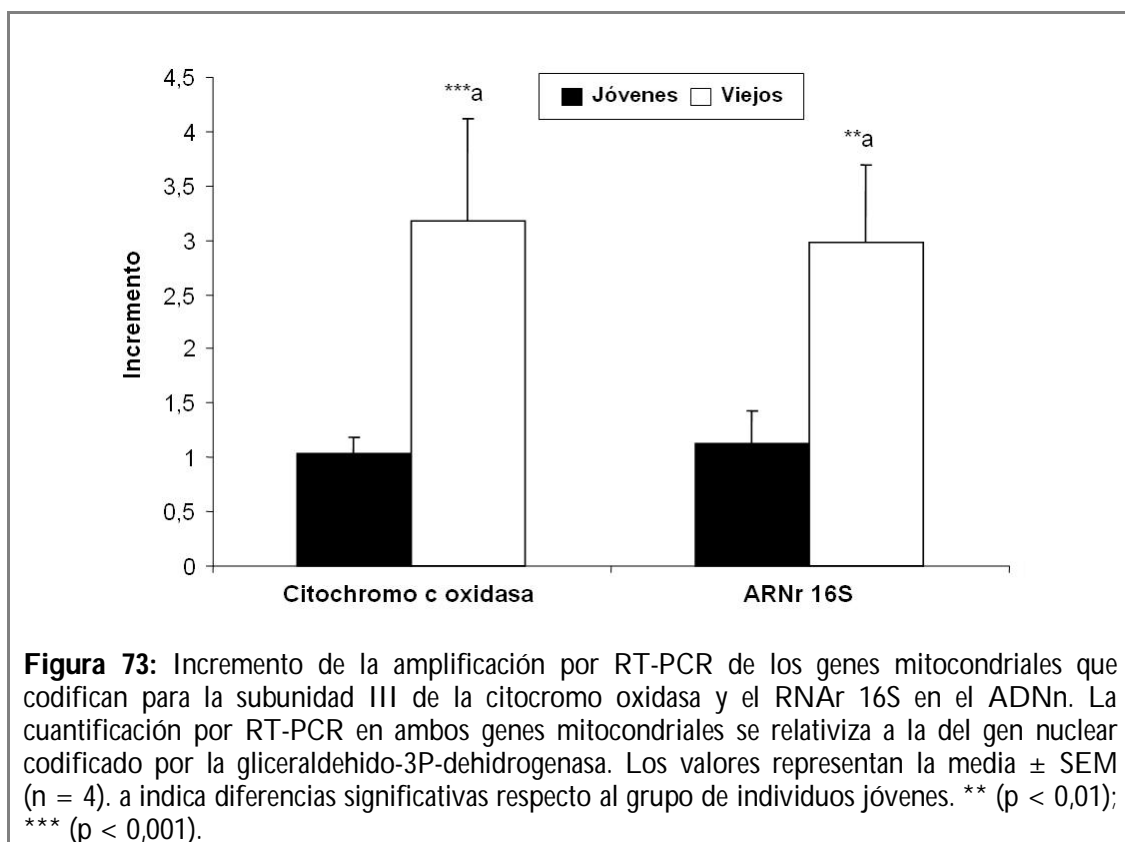
Las mitocondrias fueron suplementadas con glutamato/malato (Glut/mal) o con succinato (Succ) como sustrato y, en presencia y ausencia de rotenona (Rot), más metionina (Met, concentración 100µM), u homocisteína (HCys, concentración 25µM). Los valores representan la media ± SEM (n = 4). Los superíndices indican diferencias significativas: b respecto a la producción con glutamato + rotenona sin metabolito, c respecto a la producción con succinato y sin metabolito, d respecto a la producción con succinato + rotenona y sin metabolito. \*(p < 0,05); \*\*\*(p < 0,001).

## 2.- DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE ADN MITOCONDRIAL EN EL ADN NUCLEAR

### 2.1.- PCR en tiempo real (RT-PCR)

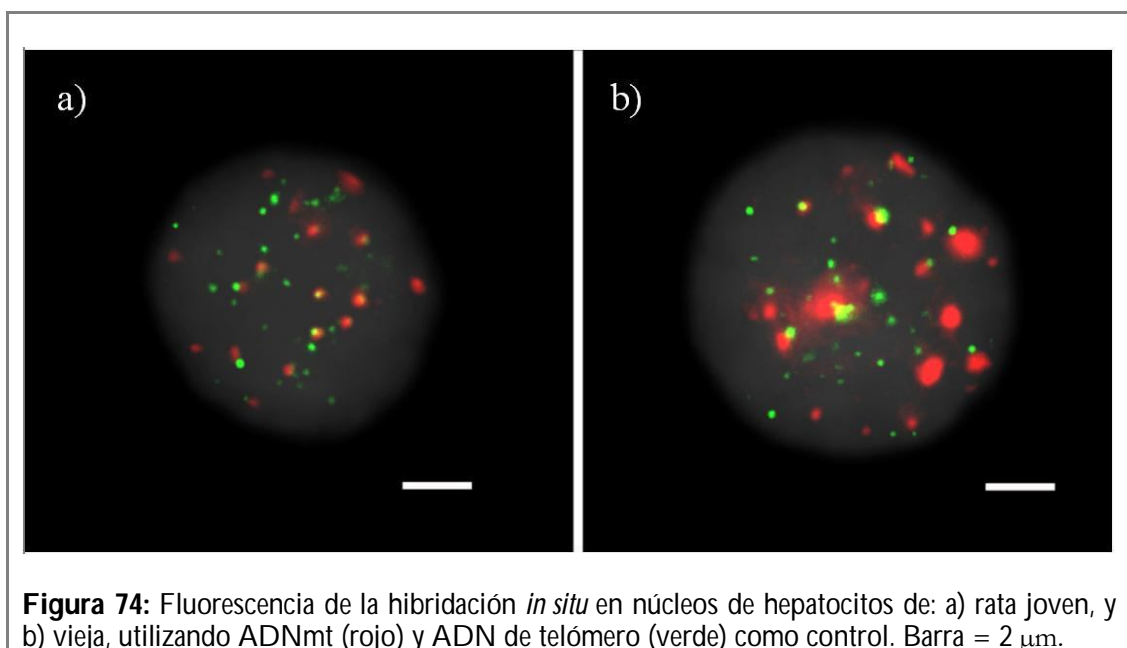
Se produjo la amplificación de los genes de de la subunidad III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (COX III) y de ARNr 16S tanto en núcleos de ratas jóvenes como en los de ratas viejas. Como control se utilizó, en ambos casos, la amplificación del gen nuclear para la gliceraldehido-3P-deshidrogenasa. La amplificación de ambos genes mitocondriales fue unas 3 veces mayor en los núcleos de ratas viejas que

de ratas jóvenes (Figura 73). El incremento de la amplificación en ratas viejas frente a ratas jóvenes fue estadísticamente significativo en ambos genes mitocondriales.



## 2.2.- Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

Se observaron numerosas señales de ADNmt claramente definidas en los núcleos de hepatocitos y, tanto el área como el brillo de las señales de ADNmt, parecían mayores en el caso de los individuos viejos que en el de los individuos jóvenes (figura 74). Para realizar el análisis estadístico del FISH cuantitativo se midieron las señales de ADNmt en células correspondientes a 3 individuos viejos y a 3 individuos jóvenes. Como control se utilizó el FISH de las secuencias de telómero, de modo que las posibles diferencias en el nivel de poliploidía podrían ser detectadas por la variación significativa en el número de señales de telómero.



**Figura 74:** Fluorescencia de la hibridación *in situ* en núcleos de hepatocitos de: a) rata joven, y b) vieja, utilizando ADNmt (rojo) y ADN de telómero (verde) como control. Barra = 2 µm.

La tabla 48 muestra los valores de las medidas realizadas y correspondientes a los análisis estadísticos. Aunque el número de señales de ADNmt fue similar en los núcleos de individuos de ambas edades, tanto el área como la intensidad de estas señales fueron significativamente superiores en los núcleos de individuos viejos.

El área, la intensidad y el número de señales de telómero por núcleo no presentaron diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, el área y la intensidad total de las señales de los núcleos experimentaron un incremento significativo en los animales viejos frente a los jóvenes.

Ninguna de las variables analizadas en el FISH presentaron diferencias significativas entre individuos pertenecientes al mismo grupo de edad.

**Tabla 48:** Análisis cuantitativo de los resultados de la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).

	Jóvenes	Viejos
<b>N° de señales de ADNmt (UA)</b>	13,65 ± 0,29 (n = 161) <sup>b</sup>	13,69 ± 0,28 (n = 163) <sup>b</sup>
<b>Área de señales de ADNmt (μm<sup>2</sup>)</b>	0,8796 ± 0,017 (n = 2.200) <sup>c</sup>	0,9946 ± 0,018 (n = 2.117) <sup>c, a***</sup>
<b>Intensidad de señales de ADNmt (UA)</b>	27.366 ± 720 (n = 2.200) <sup>c</sup>	33.613 ± 820 (n = 2.117) <sup>c, a***</sup>
<b>Área del núcleo (μm<sup>2</sup>)</b>	218,5 ± 5,8 (n = 180) <sup>b</sup>	247,6 ± 6,1 (n = 173) <sup>b, a***</sup>
<b>Intensidad del núcleo (UA)</b>	2,04x10 <sup>7</sup> ± 1,37x10 <sup>6</sup> (n = 180) <sup>b</sup>	2,72x10 <sup>7</sup> ± 1,14x10 <sup>6</sup> (n = 173) <sup>b, a***</sup>
<b>N° de señales de telómero por núcleo (UA)</b>	39,28 ± 2,01 (n = 50) <sup>b</sup>	36,16 ± 1,21 (n = 103) <sup>b</sup>
<b>Área de las señales de telómero (μm<sup>2</sup>)</b>	0,419 ± 0,009 (n = 1.716) <sup>d</sup>	0,425 ± 0,007 (n = 2.663) <sup>d</sup>
<b>Intensidad de las señales de telómero (UA)</b>	9.203 ± 297 (n = 1.716) <sup>d</sup>	9.286 ± 247 (n = 2.663) <sup>d</sup>

Los valores representan la media ± SEM. UA = unidades arbitrarias. a indica diferencias significativas respecto al grupo de ratas jóvenes, b indica el n° de núcleos medidos, c indica el número de señales de ADNmt medidas, d indica el número de señales de ADN de telómero medidas. \*\*\* (p<0,001).

# Discusión

## 1.- SUPLEMENTACIÓN DE METIONINA

La metionina es un aminoácido esencial en mamíferos que se ingiere normalmente con las proteínas de la dieta y se transporta en el plasma hasta ser incorporado por los tejidos. El hígado captura una alta proporción de aminoácidos sulfurados a través de la circulación portal y juega un papel principal en el metabolismo de la metionina.

Estudios previos han demostrado que la restricción de metionina, incrementa la longevidad máxima en ratas (Richie *et al*, 1994; Zimmerman *et al*, 2003) y ratones (Miller *et al*, 2005). Resultados parecidos han sido descritos más recientemente en *Drosophila melanogaster* con aumentos de longevidad después de tratamientos de restricción proteica (Mair *et al*, 2005; Min & Tatar, 2006) y de restricción de metionina (Troen *et al*, 2007). Además de su efecto sobre la longevidad máxima, la restricción de metionina también retrasa muchos cambios asociados al envejecimiento y enfermedades degenerativas en roedores. Entre estos, la restricción de metionina reduce la masa de grasa visceral y previene aumentos asociados al envejecimiento de triglicéridos y colesterol en sangre (Malloy *et al*, 2006). En ratones, la restricción de metionina retrasa el desarrollo de cataratas, minimiza los cambios de células T asociados al envejecimiento y reduce los niveles de glucosa, insulina e IGF-1 en sangre (Miller *et al*, 2005).

Varios experimentos desarrollados en rata han demostrado que la restricción de metionina también es responsable del descenso en la producción mitocondrial de radicales libres y el daño oxidativo al ADN mitocondrial que tienen lugar durante la restricción dietética (Sanz *et al*, 2006a; Caro *et al*, 2008, 2009).

Por otro lado, la suplementación de metionina en la dieta causa daño en diferentes órganos; incrementa la peroxidación lipídica y altera tanto los niveles de hierro como los de varias enzimas antioxidantes en hígado, lo que indicaría un incremento del estrés oxidativo que podría conducir a la hepatotoxicidad (Lynch & Strain, 1989; Toborek *et al*, 1996; Mori & Hirayama, 2000; Park *et al*, 2008). Este tratamiento también genera daño por acumulación de hierro en el bazo (Benevenga *et al*, 1976) y fibrosis tubulointersticial en el riñón (Kumagai *et al*, 2002).

Las dietas suplementadas con proteínas o con metionina incrementan los niveles de homocisteína en plasma de roedores (Hidiroglou *et al*, 2004; Velez-Carrasco *et al*, 2008) y humanos (Verhoef *et al*, 2005). La elevación de los niveles de homocisteína en plasma puede causar enfermedades vasculares como la aterosclerosis (Matthias *et al*, 1996; Troen *et al*, 2003; Guo *et al*, 2008) y la hipertensión (Robin *et al*, 2004). Además puede acelerar el envejecimiento del sistema vascular (Fau *et al*, 1998) y posiblemente del cerebro (Ho *et al*, 2001; Algaidi *et al*, 2006; Tyagi *et al*, 2009).

Dado que en la actualidad el contenido de metionina en las dietas occidentales excede considerablemente la cantidad diaria recomendada para adultos (El RDA para las proteínas en humanos son 0,8 g de proteína por kg de peso corporal por día; Lopez-Torres & Barja, 2008a), estas poblaciones están sometidas a suplementación de metionina. Por lo tanto, es importante determinar los mecanismos de toxicidad de este aminoácido que actualmente no están claros y analizar si la suplementación de metionina produce efectos contrarios a los de su restricción.

Los datos obtenidos en la presente tesis indican que la suplementación de metionina, no modifica significativamente el peso de los animales. La restricción moderada de metionina (una disminución del 0,86 al 0,52 % de metionina en dieta) no produce una modificación significativa del peso corporal en estudios realizados en rata (Caro *et al*, 2009). Por otro lado, la restricción intensa de metionina (una disminución del 0,86 al 0,17 % de metionina en dieta) produce una disminución del peso corporal de los animales asociado a una reducción drástica de la grasa visceral de los mismos (Malloy *et al*, 2006). Así pues, al contrario que ocurre en la restricción intensa de metionina y al igual que ocurre en la restricción moderada de este aminoácido, la suplementación de metionina no produce la modificación significativa del peso corporal en rata tras 7 semanas de tratamiento.

En trabajos previos de suplementación con metionina en rata se observó una disminución del peso de los animales tratados frente a los animales controles (Benevenga *et al*, 1976; Fau *et al*, 1998; Mori & Hirayama, 2000). En estos trabajos el suministro de comida fue *ad libitum* y se observó una ingesta significativamente inferior en los animales suplementados al menos durante los 3 primeros meses de tratamiento (Benevenga *et al*, 1976; Mori & Hirayama, 2000). Sin embargo, en la presente tesis se suministró a los animales control la misma cantidad de comida que tomaban los animales suplementados

(*pair feeding*), lo que conllevó la ausencia de diferencias significativas entre el peso de los animales de ambos grupos. Por consiguiente, parece que la suplementación de metionina no produce una disminución del peso de los animales directamente y que sería la reducción en la ingesta la que conduciría a una reducción del peso corporal en otros estudios de suplementación de metionina.

Los estudios de restricción de metionina en dieta indican que dicho tratamiento no modifica significativamente el consumo de oxígeno en mitocondrias hepáticas (Caro *et al*, 2008). En nuestro caso parece que la suplementación de metionina incrementa significativamente el consumo de oxígeno de las mitocondrias de hígado en estado 3 cuando se utiliza como sustrato glutamato/malato (sustrato del complejo I) o succinato con rotenona (sustrato del complejo II). Dicho tratamiento también incrementa el consumo de oxígeno de las mitocondrias de corazón en estado 3 y 4 cuando se utiliza el sustrato del complejo II. Por el contrario, parece que la suplementación de metionina no modifica el consumo de oxígeno en las mitocondrias de cerebro mientras que la restricción de dicho aminoácido incrementaría este parámetro en dicho órgano (Caro *et al*, 2009).

La restricción de metionina (Sanz *et al*, 2006a; Caro *et al*, 2008, 2009), al igual que la restricción dietética (Sohal *et al*, 1994; Sohal & Weindruch, 1996; Gredilla *et al*, 2001a,b) y de proteínas (Sanz *et al*, 2004), disminuye la producción mitocondrial de radicales libres. Dado que esta generación mitocondrial de especies reactivas correlaciona con la longevidad máxima (Barja *et al*, 1994b; Lambert *et al*, 2007; Robert *et al*, 2007), la reducción en la producción de radicales libres podría ser responsable del incremento de longevidad observado. Así pues, un incremento en la producción de especies reactivas en la mitocondria podría incrementar el estrés oxidativo y llegar a reducir la longevidad.

La suplementación de metionina en la dieta produce un incremento significativo de la producción de radicales libres sólo en las mitocondrias del hígado de rata, mientras que no se producen variaciones significativas de este parámetro en las mitocondrias del resto de órganos estudiados. El incremento en la producción de radicales libres de las mitocondrias hepáticas se produce al utilizar sustratos del complejo I (piruvato/malato y glutamato/malato), mientras que no se observa cuando se utiliza el sustrato del complejo II (succinato). Como los principales productores de radicales libres en la cadena de transporte de electrones se encuentran en el complejo I (Barja, 1999a; Herrero & Barja, 2000; Gredilla

*et al* 2001b; Kudin *et al*, 2005; Muller *et al*, 2008) y en el complejo III (Boveris *et al*, 1976; Barja, 1999a; Kudin *et al*, 2005), podemos concluir que este incremento en la producción de radicales libres en las mitocondrias de hígado tiene lugar a nivel de complejo I. Estos resultados parecen estar en concordancia con los obtenidos en experimentos previos de restricción de metionina en hígado, donde se observaba un descenso significativo de la producción de radicales libres a nivel de complejo I en este órgano (Sanz *et al*, 2006a; Caro *et al*, 2008). Sin embargo, aunque la restricción de metionina es capaz de disminuir significativamente la producción de especies reactivas a nivel del cerebro y del riñón (Caro *et al*, 2009), la suplementación de este aminoácido en dieta no produce el efecto contrario. Por consiguiente, parece que la suplementación de este aminoácido en dieta sólo afecta a la producción mitocondrial de radicales libres en el hígado, mientras que la restricción también afectaría a la producción de cerebro y riñón (Caro *et al*, 2008, 2009).

En cualquier caso, el incremento de la generación de especies reactivas a nivel de las mitocondrias del hígado podría constituir un mecanismo posible para explicar la hepatotoxicidad que se produce en los animales sometidos a suplementación con metionina quizás debido a una elevada sensibilidad de este órgano a dicho tratamiento.

Los datos de nuestro trabajo indican que la suplementación de metionina incrementa significativamente el % FRL a nivel del complejo I de las mitocondrias de hígado, mientras que no modifica este parámetro en las mitocondrias de ninguno de los demás órganos estudiados.

Como ya hemos comentado, la suplementación de metionina produce un incremento significativo en el consumo mitocondrial de oxígeno en estado 3 cuando se utilizan sustratos del complejo I y II en este órgano. Sin embargo, como el % FRL se incrementa igualmente en estas mitocondrias a nivel de complejo I, el incremento de la producción de radicales libres a nivel de dicho complejo no se debe al aumento del consumo de oxígeno de las mitocondrias de hígado. Por lo tanto, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en diversos experimentos de restricción de dieta (Gredilla *et al*, 2001a; Lopez-Torres *et al*, 2002), de proteínas (Sanz *et al*, 2004) y de metionina (Sanz *et al*, 2006a; Caro *et al*, 2008, 2009), en los que las variaciones en la producción de radicales libres de oxígeno no dependen del consumo de oxígeno mitocondrial.

No hay variaciones significativas del % FRL en el resto de los órganos estudiados. Por lo tanto, aunque se produce un incremento significativo del consumo de oxígeno en el caso del corazón cuando se utilizan sustratos del complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, éste no afecta a la fuga de radicales libres en dicho órgano.

Se sabe que la paloma presenta una producción mitocondrial de radicales libres menor que la rata, específicamente a nivel del complejo I (Barja *et al*, 1994a; Herrero & Barja, 1997a,b). Lo mismo ocurre cuando comparamos los periquitos y canarios con el ratón (Herrero & Barja, 1998). Estas diferencias en la producción de ROS se han atribuido al menor contenido en complejo I que presentan las mitocondrias de paloma comparadas con las de la rata (St-Pierre *et al*, 2002) y las de periquitos y canarios comparadas con las de ratón (Pamplona *et al*, 2005). Se ha observado que tanto la restricción de proteína como de metionina pueden reducir los niveles de los complejos I y IV en las mitocondrias de corazón, de cerebro y de hígado (Sanz *et al*, 2006a; Ayala *et al*, 2007; Caro *et al*, 2009) de rata. También se ha descrito la disminución de los niveles del complejo III después de la restricción de metionina en cerebro (Naudi *et al*, 2007) e hígado (Caro *et al*, 2008) de rata. Por lo tanto la variación de los niveles de los complejos multiproteicos de la cadena de transporte de electrones podría ser el mecanismo responsable del incremento en la producción de radicales libres en el complejo I de las mitocondrias de hígado tras la suplementación de metionina.

Como ya se ha comentado, los principales productores de radicales libres en la mitocondria son el complejo I y el complejo III. Sin embargo, se analizaron los cuatro complejos multiproteicos porque las variaciones de cualquiera de ellos podrían afectar al grado de reducción de los mismos, lo cual modificaría la generación de especies reactivas.

Nuestros resultados indican que la suplementación de metionina produce el descenso en los niveles del complejo IV en mitocondrias de hígado y cerebro, así como de todos los complejos mitocondriales en riñón.

También se observa un incremento significativo de la concentración de la subunidad de 29,6 kDa del complejo III de las mitocondrias hepáticas, mientras que los niveles de la subunidad 48,5 kDa de este complejo no presenta variaciones significativas. Como el incremento en la concentración de una de las subunidades nos sería suficiente para

producir el aumento de los niveles del complejo entero, la concentración de dicho complejo no se alteraría en las mitocondrias hepáticas de los animales suplementados con metionina.

No se modificaron los niveles de los productores de radicales libres en la cadena de transporte de electrones (complejos I y III) de las mitocondrias de hígado después de 7 semanas de suplementación de metionina. Por lo tanto el incremento en la producción de radicales libres en mitocondrias de hígado tras el tratamiento no parece deberse a la variación en la concentración de dichos productores de radicales libres y tendrá que atribuirse a cambios cualitativos más que a cambios cuantitativos en los complejos mitocondriales productores de ROS.

La disminución observada en la concentración del complejo IV en mitocondrias de hígado tras la suplementación con metionina podría alterar el grado de reducción de los complejos de la cadena de transporte electrónico que le preceden, lo que modificaría la producción mitocondrial de radicales libres y podría explicar el aumento de producción de ROS por el complejo I. Sin embargo, aunque este mecanismo sería válido para el caso del hígado, no lo es para el cerebro porque las mitocondrias de este último órgano experimentan una reducción de los niveles del complejo IV sin presentar variaciones significativas en la generación mitocondrial de especies reactivas.

El incremento en la producción de radicales libres por parte del complejo I de las mitocondrias de hepáticas también puede ser causado por modificaciones cualitativas en los complejos mitocondriales. Estas modificaciones podrían consistir en cambios estructurales en las subunidades de dichos complejos ya sea por splicing alternativo, por procesamiento postraduccional o cualquier otro proceso que produzca los cambios estructurales que faciliten el incremento en la generación de especies reactivas por parte del complejo I sin alterar los niveles de dicho complejo en la mitocondria.

Sorprendentemente, en el caso del riñón se produce una disminución significativa de los cuatro complejos mitocondriales de la cadena de transporte electrónico en los animales sometidos a suplementación de metionina, que no afecta al consumo de oxígeno ni a la producción de radicales libres. La modificación de los niveles de todos los complejos mitocondriales simultáneamente podría evitar que se produzcan cambios en la generación

de radicales libres en el caso del riñón. Otra posible explicación sería la existencia de modificaciones cualitativas en los complejos multiproteicos de la cadena de transporte electrónico que eviten los cambios en la producción de radicales libres y el consumo de oxígeno a pesar de la disminución en los niveles de dichos complejos.

En nuestro trabajo hemos observado que los niveles del factor de inducción de la apoptosis (AIF) disminuyen en riñón, mientras que no presentan variaciones significativas en el resto de los órganos. El AIF además de tener funciones apoptóticas, es requerido para la fosforilación oxidativa (Porter & Urbano, 2006), y para la biogénesis y mantenimiento del complejo I (Vahsen *et al*, 2004) en la mitocondria. Así pues, la disminución del contenido del complejo I en riñón tras la suplementación de metionina podría ser explicada por la reducción de los niveles de AIF que tiene lugar en este órgano que sucede tras dicho tratamiento. Del mismo modo, en el resto de órganos estudiados no varían los niveles de AIF y tampoco se modifica el contenido en complejo I de las mitocondrias de estos órganos.

Podemos concluir que el incremento de la producción de radicales libres a nivel de complejo I en hígado tras la suplementación de metionina en dieta puede ser debido a la elevación del grado de reducción de dicho complejo causada por la disminución de los niveles del complejo IV hepático, a cambios cualitativos en la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias del hígado que modifiquen la producción de especies reactivas a nivel de complejo I, o a una combinación de ambas modificaciones. El hecho de que el incremento en la producción de especies reactivas sea a nivel de complejo I es consistente con los resultados de estudios previos de restricción de metionina, donde la disminución en la producción mitocondrial de radicales libres tiene lugar a nivel de dicho complejo (Sanz *et al*, 2006a; Caro *et al*, 2008; 2009). Sin embargo, el mecanismo por el que se altera la generación de especies reactivas parece ser distinto en ambos tratamientos, ya que mientras que en la restricción de metionina el descenso en la producción de radicales libres en complejo I va acompañado de la reducción de los niveles de varios de los complejos mitocondriales entre los que se encuentra el complejo I (Sanz *et al*, 2006a; Caro *et al*, 2008), en la suplementación de metionina el incremento en la generación de especies reactivas va acompañado solamente de la variación de los niveles del complejo IV.

La suplementación con metionina podría ser perjudicial debido a la metionina en sí misma o a los metabolitos generados directamente por su metabolización, como es el caso de la S-adenosilmetionina (SAM) y la S-adenosilhomocisteína (SAH) (Regina *et al*, 1993).

Algunos estudios indican que los aminoácidos pueden llegar a activar rutas de señalización intracelulares que inhiben la proteólisis autofágica y que presentan un efecto sinérgico con la señalización dependiente de insulina (Blommaart *et al*, 1995), por lo tanto parece que los aminoácidos pueden interactuar con la señalización dependiente de insulina e incluso llegar a estimular la transducción de la señal por sí mismos (van Sluijters *et al*, 2000). Nuestros datos indican que la suplementación de metionina en dieta incrementa la concentración de este aminoácido en los cuatro órganos estudiados. Así pues, es posible que la activación por parte de la metionina de alguna ruta de señalización desencadene los efectos producidos por la suplementación de este aminoácido en dieta sobre la producción de radicales libres. Sin embargo, los cambios en la generación mitocondrial de especies reactivas sólo se producen en hígado, mientras que el incremento de los niveles de metionina se produce en todos los órganos estudiados. Por lo tanto, si se produce la activación de una ruta de señalización intracelular por parte de la metionina, dicha ruta produciría efectos diferentes en los distintos órganos, de forma que solamente incrementaría la producción de radicales libres en el caso del hígado.

Los niveles de SAM se incrementaron tras la suplementación de metionina tanto en hígado como en corazón, mientras que los de SAH lo hicieron en todos los órganos estudiados. Tanto la elevación de los niveles de SAM como de SAH podría ser responsable del incremento de la producción de radicales libres en hígado. Sin embargo, como los niveles de estos metabolitos también se incrementan en órganos donde no se producen variaciones en la generación de especies reactivas, la influencia de estos metabolitos sobre dichos parámetros variaría en función del órgano de estudio.

El incremento en la producción mitocondrial de radicales libres y el % FRL en el hígado de ratas suplementadas con metionina también podría ser resultado de una respuesta regulada en lugar de un efecto directo de un metabolito de la metionina. Dado que la metionina es un donador de grupos metilos, los cambios en la metilación del ADN podrían ser, aunque fuera de forma parcial, el origen de las variaciones en la expresión génica descritas después de la suplementación de metionina (Fukagawa & Galbraith, 2004;

---

Park *et al*, 2008). En nuestro caso, el potencial de metilación (medido como el cociente SAM/SAH) se reduce sólo en corazón mientras que no varía en el resto de los órganos estudiados. Como en el corazón no se produce la modificación mitocondrial de radicales libres, parece que las variaciones del potencial de metilación no son responsables de los efectos de la suplementación de metionina en dieta sobre la generación de especies reactivas.

Por último tenemos que valorar la posible participación en el aumento de generación de ROS después de la suplementación con metionina de una ruta alternativa para la degradación de la metionina en la que no se producen SAM y SAH. Esta ruta alternativa es la ruta de transaminación en la que la metionina se metaboliza por la acción de las transaminasas para formar ácido metiltiobutírico. Existen indicios de que esta ruta de transaminación de la metionina es la responsable de la toxicidad de la misma en los hepatocitos de ratón (Dever & Elfarra, 2008). El ácido metiltiobutírico generará ácido 3-metiltiopropiónico que a su vez se puede metabolizar a sustancias altamente tóxicas y volátiles como el metanotiol, el cual puede ser responsable de la inhibición de enzimas implicadas en la protección contra el daño peroxidativo de forma similar a la metionina (Finkelstein & Benevenga, 1986). Aunque las transaminasas necesarias para el inicio de esta ruta están presentes en músculo esquelético, corazón e hígado, la mayor actividad de esta enzima se encuentra en este último órgano (Scislowski & Pickard, 1993). Así pues, el catabolismo de la metionina por la ruta de transaminación podría explicar la mayor sensibilidad del hígado a la suplementación de metionina, ya que produciría metabolitos que podrían ser responsables de los efectos adversos de dicho tratamiento, entre los que se podrían encontrar el incremento en la producción de radicales libres.

El daño oxidativo al ADN mitocondrial presenta una correspondencia con la producción mitocondrial de radicales libres. Así pues, estudios en diversos órganos de paloma y rata demostraron que la paloma presenta una menor producción de radicales libres (Barja *et al*, 1994a; Herrero & Barja, 1997a,b) y daño al ADN (Herrero & Barja, 1999) en sus mitocondrias que la rata. Las investigaciones en periquito, canario y ratón confirmaron que tanto la producción mitocondrial de radicales libres (Herrero & Barja, 1998) como los niveles de 8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG; Herrero & Barja, 1999) son mayores en mamíferos que en aves de similar tamaño corporal. Por lo tanto, parece existir una relación entre la generación de especies reactivas en la mitocondria

y el daño oxidativo al ADN mitocondrial al comparar especies de vida larga con especies de vida corta. Esta correspondencia también se ha observado en estudios previos de restricción dietética (Gredilla *et al*, 2001a; Lopez-Torres *et al*, 2002), restricción de proteínas (Sanz *et al*, 2004) y restricción de metionina (Sanz *et al*, 2006a; Caro *et al*, 2008), donde el descenso en la producción mitocondrial de radicales libres y los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial discurren de forma paralela en hígado de rata.

La suplementación de metionina produjo un incremento del daño oxidativo en el ADN mitocondrial del tejido hepático, que concuerda con el incremento en la generación de radicales libres que se produjo en este órgano tras el tratamiento.

Este tratamiento no modificó la producción mitocondrial de radicales libres ni los niveles de 8-oxodG del ADN mitocondrial en corazón, cerebro y riñón de rata. Por lo tanto, estos resultados confirman la correspondencia existente entre estos dos parámetros, y están en concordancia con estudios previos de restricción de lípidos (Sanz *et al*, 2006b) e hidratos de carbono (Sanz *et al*, 2006c), en los que al no variar la producción de radicales libres, tampoco se modificaron los niveles de 8-oxodG.

Por otra parte el complejo I es responsable de los cambios en la producción de radicales libres descritos tanto en el presente estudio de suplementación de metionina, como en los estudios citados de restricción de dieta (Gredilla *et al*, 2001b; Lopez-Torres *et al*, 2002), proteínas (Sanz *et al*, 2004) y de metionina (Sanz *et al*, 2006a; Caro *et al*, 2008; 2009). Esta producción de radicales libres del complejo I es particularmente interesante ya que, se sabe que está específica y completamente dirigida hacia la matriz mitocondrial (Kudin *et al*, 2005) donde se localiza el ADN mitocondrial. Así pues, la gran proximidad o incluso el contacto entre los lugares de generación de especies reactivas y el ADN mitocondrial podría ser la explicación de la correspondencia entre estos dos parámetros.

Los datos de la presente tesis indican que la suplementación de metionina produce la reducción significativa de los niveles de marcadores de daño oxidativo, lipoxidativo y glicoxidativo a proteínas en cerebro y en riñón, mientras que no produce variaciones de estos parámetros en hígado y corazón.

En el caso del corazón, la ausencia de cambios en la producción mitocondrial de radicales libres está en concordancia con el mantenimiento de los niveles de los marcadores de daño oxidativo, lipoxidativo y glicoxidativo a proteínas.

Por el contrario, las mitocondrias de hígado experimentan un incremento en la producción de radicales libres a nivel de complejo I que no se traduce en un incremento en los niveles de los marcadores de daño oxidativo, lipoxidativo y glicoxidativo a proteínas en dicho órgano.

Existen situaciones, como la inhibición de determinadas enzimas antioxidantes como la catalasa (Lopez-Torres *et al*, 1993a) o el ejercicio moderado en el entrenamiento crónico (Gomez-Cabrera *et al*, 2008), en las que el incremento del estrés oxidativo puede inducir incrementos de los niveles de determinadas enzimas antioxidantes endógenas, entre la que se incluyen la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa o la catalasa, y otros antioxidantes no enzimáticos, entre los que se encuentra el glutatión reducido. Este aumento de las defensas antioxidantes puede conducir a una disminución del estrés oxidativo, que se traduciría en una reducción de los niveles de los marcadores de daño oxidativo. Se ha descrito que la suplementación de metionina en dieta es capaz de producir el incremento de los niveles de diversas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa en el hígado de ratas (Seneviratne *et al*, 1999; Mori & Hirayama, 2000), ratones (Park *et al*, 2008) y conejos (Toborek *et al*, 1996). Sin embargo, en otro estudio no se produjeron cambios en las actividades de dichas enzimas (Stefanello *et al*, 2005), pero en este último experimento la metionina fue añadida *in vitro* a homogenados de hipocampo de rata por lo que estas compensaciones adaptativas previamente mencionadas no podrían tener lugar. En algunos casos estas inducciones adaptativas de enzimas antioxidantes se pierden cuando la suplementación de metionina se prolonga en el tiempo (6 meses), lo que correlaciona con un incremento de la peroxidación lipídica (Mori & Hirayama, 2000) que no se observa mientras la inducción de enzimas antioxidantes tiene lugar. Por consiguiente, es posible que la suplementación de metionina induzca una respuesta adaptativa en la que se incrementen los niveles de las defensas antioxidantes hepáticas, lo cual podría evitar las variaciones significativas de los niveles de los marcadores de daño oxidativo, lipoxidativo y glicoxidativo a proteínas, a pesar del incremento de la producción mitocondrial de radicales libres observado en dicho órgano.

Otra posibilidad para explicar la ausencia de cambios en los niveles de los marcadores de daño oxidativo a proteínas sería la activación de los sistemas catabólicos implicados en la reparación de daño a proteínas, lo que amortiguaría el posible incremento en estos marcadores por el aumento del estrés oxidativo.

La suplementación de metionina reduce los niveles de los marcadores de daño oxidativo, lipooxidativo y glicoxidativo a proteínas en cerebro y riñón, aunque no varía de forma significativa la producción mitocondrial de radicales libres en estos órganos. Sin embargo, el tratamiento produce una elevación de los niveles de metionina y de SAH en ambos. Por lo tanto, es posible que este aumento en los niveles de metionina o de SAH induzca el incremento de las enzimas antioxidantes o la activación de los sistemas catabólicos de reparación en estos tejidos, que permitiría la reducción de los niveles de los marcadores de daño a proteínas.

Entre las macromoléculas biológicas, los PUFA son las que muestran mayor sensibilidad al daño oxidativo inducido por los radicales libres. Dicha sensibilidad a la oxidación aumenta exponencialmente en función del número de dobles enlaces por molécula de ácido graso, de forma que un bajo grado de insaturación en los ácidos grasos podría ser ventajoso por disminuir su sensibilidad a la peroxidación lipídica. De acuerdo con este hecho, se ha descrito que los individuos de las especies animales longevas tienen un menor grado de insaturación de los ácidos grasos de sus tejidos en general y de sus mitocondrias en particular, que los individuos pertenecientes a especies de vida corta (Pamplona *et al*, 1996). El menor DBI observado en las especies longevas es debido a cambios en el tipo de ácidos grasos insaturados que participan en la composición de las membranas. De esta forma, hay una redistribución sistemática entre los niveles de PUFAs presentes, en tejido y en mitocondria, desde los altamente insaturados ácido araquidónico (20:4n-6, AA) y docohexanóico (22:6n-3, DHA), en especies de vida corta, a los menos insaturados, ácido linoléico (18:2n-6, LA) y, en algunos casos, linolénico (18:3n-3, LNA), en las especies longevas a nivel mitocondrial y tisular (Pamplona *et al*, 2002a).

Estudios previos han descrito que la restricción de metionina al 80 % disminuye el DBI y el PI de las membranas hepáticas (Caro *et al*, 2008, 2009), mientras que la restricción al 40 % no produce variaciones de estos parámetros en hígado, cerebro y riñón de rata

(Caro *et al*, 2008). Al igual que la restricción de metionina al 80 %, la suplementación de este aminoácido en dieta produce un descenso significativo del DBI y del PI en el hígado. El descenso de estos dos parámetros se produce por una redistribución de los ácidos grasos, similar a la que tiene lugar entre especies de vida larga y corta, de forma que en el hígado de los animales suplementados los niveles de los ácidos grasos más insaturados como el adrénico (22:4n-6), araquidónico (20:4n-6), eicosapentanoico (20:5n-3), dihomo- $\gamma$ -linoleico (20:3n-6) y  $\alpha$ -linolénico (18:3n-3) disminuyen y los de los menos insaturados como el linoleico (18:2n-6) y oleico (18:1n-9) aumentan.

En el caso del cerebro, la suplementación con metionina produce un incremento significativo de los PUFA $\alpha$ -6, sin embargo esta modificación no llega a alterar ni el DBI ni el PI. Estos dos parámetros tampoco se modificaron en corazón ni en riñón.

Los cambios producidos por la suplementación de metionina en el DBI y el PI muestran una correspondencia con los cambios causados por dicho tratamiento en la producción mitocondrial de radicales libres. De este modo, se produce un descenso en el DBI y el PI únicamente en el hígado, que es el tejido donde se incrementa la producción de radicales libres, mientras que en el resto de los tejidos estudiados no se modifican estos dos parámetros.

El descenso del grado de insaturación de los ácidos grasos producido por el exceso de metionina en dieta podría ser una respuesta adaptativa que permitiría una reducción de la sensibilidad a la peroxidación lipídica sin alterar la fluidez/microviscosidad de la membrana celular y que podría compensar, al menos en parte, el aumento de la producción de radicales libres observado en el hígado.

Alternativamente, el aumento en producción de ROS en hígado podría causar el descenso del DBI y el PI hepáticos a través de un aumento de peroxidación lipídica, proceso que actúa a través de la degradación de ácidos grasos poliinsaturados. La suplementación con metionina produce un incremento de la peroxidación lipídica en hígado de ratas (Lynch & Strain, 1989; Mori & Hirayama, 2000), ratones (Park *et al*, 2008) y conejos (Toborek *et al*, 1996), que podría estar causado por el aumento de la generación de radicales libres que se produce en dicho órgano tras el tratamiento, tal y como indican los resultados de esta tesis. Este incremento en la peroxidación lipídica se detecta cuando la

duración de la suplementación con metionina es superior a 3 meses (Toborek *et al*, 1996; Mori & Hirayama, 2000; Park *et al*, 2008). Así pues, la disminución en el DBI y el PI producida por la suplementación con metionina protegería las membranas hepáticas los primeros meses de tratamiento, pero no podría evitar el incremento en la peroxidación lipídica en tratamientos más prolongados en el tiempo.

En los estudios de Lynch & Strain (1989) se observa un incremento de peroxidación lipídica tras 7 semanas de tratamiento, utilizando una dieta control con 0,2 g/100 g frente a una dieta suplementada con 2,0 g/100 g. El nivel de metionina en la dieta suplementada es similar al que utilizamos en los experimentos de esta tesis (2,5 g/100 g), sin embargo la cantidad de metionina de la dieta control es inferior a 0,5 g/100 g utilizados en las dietas restringidas en metionina al 40% en los experimentos de Caro *et al* (2008). Estos niveles de metionina producen una reducción de la generación de radicales libres en el hígado (Caro *et al*, 2008), lo que podría causar las diferencias detectadas por Lynch & Strain (1989) en los niveles de peroxidación lipídica entre grupos experimentales y explicar las discrepancias entre estos estudios y los de Mori & Hirayama (2000) en los que el incremento en los niveles de peroxidación lipídica se observa cuando la duración del tratamiento es superior a 3 meses.

Varios estudios describen alteraciones de la biosíntesis y el metabolismo de los lípidos tras la suplementación con metionina; descensos en los niveles de triglicéridos hepáticos (Mori & Hirayama, 2000; Park *et al*, 2008) y HDL-C plasmáticos (Velez-Carrasco *et al*, 2008). Además, los niveles altos de homocisteína, uno de los metabolitos intermediario en el catabolismo de la metionina, inducirían estrés en el retículo endoplasmático (Werstuck *et al*, 2001), lo que conduciría a la alteración de las rutas biosintéticas del colesterol y los triglicéridos mediante la activación de la expresión de genes de la biosíntesis de lípidos, que podrían relacionar los niveles elevados de homocisteína con la aterosclerosis. Esta alteración de las rutas biosintéticas de lípidos podría ser la responsable del descenso del DBI y del PI observado en las membranas hepáticas.

En nuestro estudio, el descenso del grado de instauración de los ácidos grasos hepáticos sería adaptativo y podría compensar, al menos en parte el aumento de producción de ROS observado en el hígado.

De forma alternativa, el descenso en la insaturación de los ácidos grasos del hígado podría ser consecuencia directa del incremento en la generación de especies reactivas en la mitocondria. De este modo, como los radicales libres causan daño a los ácidos grasos insaturados, podrían acelerar su catabolismo o incluso llegar a destruirlos, produciendo la disminución en los niveles de estos ácidos grasos. Sin embargo, como no todos los ácidos grasos altamente insaturados descienden con la suplementación de metionina en hígado, éste no sería el único mecanismo que genere el descenso de DBI y PI en este órgano.

Hasta ahora hemos estudiado el efecto de la suplementación de metionina en dieta sobre la producción mitocondrial de radicales libres en particular y el estrés oxidativo en general. Con este modelo hemos estudiado todos los efectos que produce la suplementación de metionina en dieta tras 7 semanas de tratamiento. Sin embargo, no podemos discriminar si los efectos sobre la generación mitocondrial de radicales libres se producen por interacciones directas con la mitocondria a corto plazo o si por el contrario se producen de forma indirecta por interacciones con otros elementos celulares a tiempos más largos.

Se ha descrito que la producción de especies reactivas por el complejo I mitocondrial se incrementa en respuesta a la oxidación del glutatión mitocondrial, de modo que la adición de glutatión oxidado (GSSG) incrementa la tasa de generación de radical superóxido por parte de dicho complejo (Taylor *et al*, 2003). El GSSG reacciona con las subunidades de 75 y de 51 kDa del complejo I formando uniones reversibles proteína-glutatión que correlacionan con un incremento significativo de la producción de radicales libres en este complejo (Taylor *et al*, 2003). De este modo, la glutatiónilización reversible de subunidades específicas del complejo I podría ser propuesta como mecanismo alternativo para regular la producción de radicales libres por parte del dicho complejo. Además, el efecto mencionado de la adición de GSSG podría explicar la correlación directa observada entre el índice GSSG/GSH y los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial en tejidos de ratón viejo (Asuncion *et al*, 1996), ya que un incremento en este índice aumentaría la producción mitocondrial de radicales libres a nivel del complejo I, lo que elevaría el daño oxidativo al ADN mitocondrial. Sin embargo, hay que señalar que las concentraciones de GSSG utilizadas en el estudio de Taylor *et al* (2003) están dentro del rango de lo suprafisiológico.

La suplementación de metionina incrementa los niveles de metionina, SAM y SAH en diversos órganos. Así pues, al igual que sucede en el caso del GSSG, tanto la metionina como SAM o SAH podrían interactuar directamente con los complejos mitocondriales modificando la producción de radicales libres.

Las dietas ricas en proteínas o en metionina incrementan los niveles de homocisteína en plasma de roedores y humanos (Hidiroglou *et al*, 2004; Verhoef *et al*, 2005; Velez-Carrasco *et al*, 2008). Además la homocisteína tiene un grupo tiol libre que puede ser oxidado dando lugar a la generación de uniones por puentes disulfuro, ya sea entre proteínas diferentes o entre subunidades de la misma proteína. Por consiguiente, la interacción de la homocisteína con las subunidades del complejo I por el mismo mecanismo que el GSSG podría ser responsable, al menos en parte, de los efectos de la suplementación de metionina sobre el estrés oxidativo mitocondrial.

Así pues, la variación de la concentración tisular de metionina, SAM, SAH u homocisteína, podría modificar la producción mitocondrial de radicales libres por la interacción directa de estas moléculas con las propias mitocondrias.

Como la administración de dietas suplementadas con metionina no nos permiten determinar si este aminoácido, la SAM, la SAH o la homocisteína interactúan directamente con las mitocondrias produciendo efectos sobre la generación de especies reactivas a corto plazo, nos propusimos estudiar detalladamente el efecto directo *in vitro* de la metionina, la SAM, la SAH y la homocisteína sobre la producción mitocondrial de radicales libres.

La adición de metionina *in vitro* incrementa significativamente la producción de radicales libres en mitocondrias de hígado al utilizar tanto el sustrato del complejo I (glutamato/malato) como el sustrato del complejo II (succinato más rotenona). Sin embargo, cuando utilizamos el inhibidor del complejo I (rotenona) con glutamato/malato, no observamos variaciones en la producción de radicales libres. Estos resultados indican que se produce un incremento en la generación de especies reactivas por la interacción directa de la metionina con las mitocondrias de hígado y que este aumento tiene lugar a nivel del complejo III.

En el caso del riñón, la adición de metionina *in vitro* produce un incremento de la generación de especies reactivas cuando se utiliza el sustrato del complejo I con y sin rotenona, que no tiene lugar cuando se utiliza el sustrato del complejo II. Por lo tanto, la interacción directa de la metionina con las mitocondrias de riñón produce un incremento de la producción de radicales libres específicamente a nivel del complejo I.

Como las mitocondrias de corazón y cerebro, que están compuestos en gran parte por tejidos postmitóticos, no responden a la adición de metionina *in vitro*, podemos concluir que la metionina es capaz de interactuar directamente con las mitocondrias procedentes de los órganos compuestos por tejidos mitóticos, produciendo un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno. Como las dietas suplementadas con metionina aumentan la concentración de este aminoácido tanto en hígado como en riñón, el incremento de la producción de radicales libres por interacción directa de la metionina con la mitocondria podría ser responsable de parte de los efectos deletereos producidos por el exceso de metionina en la dieta.

Los estudios de Tyagi *et al* (2009) indican que la suplementación con metionina durante 24 horas de cultivos de endotelio cerebral de ratón produce un incremento en la producción intracelular de radicales libres. Este experimento se realizó en cultivos de endotelio, que es un tejido mitótico, por lo que estaría en concordancia con el incremento encontrado tras la adición de metionina *in vitro* a las mitocondrias procedentes de órganos compuestos por tejidos mitóticos.

Como ya hemos comentado, el aumento en la producción de radicales libres en el caso del hígado, a diferencia del riñón, tiene lugar a nivel del complejo III. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las mitocondrias están funcionalmente especializadas en los diferentes tejidos, de forma que el proteoma mitocondrial difiere de un tipo celular a otro. Un ejemplo claro lo tenemos en las mitocondrias del tejido adiposo pardo y del tejido adiposo blanco. El proteoma de las mitocondrias del primero es distinto al proteoma de las mitocondrias del segundo, de forma que las mitocondrias están adaptadas a la función de cada tejido (Forner *et al*, 2009). Por consiguiente, es posible que las características del proteoma de las mitocondrias de riñón, que serán diferentes a las del hígado, favorezca el incremento de la producción de radicales libres a nivel del complejo I en lugar del complejo III en presencia de metionina.

Hay que destacar que los datos de suplementación de metionina en dieta muestran que dicho tratamiento es capaz de incrementar la producción de radicales libres a nivel de complejo I en mitocondrias de hígado. Por lo tanto, aparentemente estos resultados de la suplementación de metionina en la dieta no concuerdan con los resultados del experimento *in vitro*, sin embargo existiría una explicación que sería consistente con todos los resultados. En el caso del experimento de la suplementación de metionina en dieta, las diferencias observadas en la producción mitocondrial de radicales libres serían debidas a las modificaciones a largo plazo en la estructura de la cadena de transporte de electrones que tardan semanas en manifestarse. Además es probable que estas modificaciones se deban a cambios que tienen lugar a nivel de expresión génica, ya sea de las propias proteínas de los complejos mitocondriales o de aquellas que participan en su procesamiento postraduccional. De este modo, dichos cambios se conservarían tras el aislamiento de dichas mitocondrias, en el que se eliminaría prácticamente todo el entorno de las mismas. Por el contrario, en los experimentos *in vitro* veríamos las variaciones de la producción mitocondrial de radicales libres que reflejan el efecto directo y a corto plazo de la metionina sobre la cadena de transporte electrónico. Así pues, la suplementación de metionina en dieta parece que es capaz de incrementar la producción de radicales libres del complejo I en mitocondrias de hígado a través de la modificación a largo plazo de la estructura de la cadena de transporte electrónico y además, dado que eleva la concentración de metionina en el tejido, podría ser capaz de incrementar la generación de especies reactivas a nivel de complejo III interaccionando directamente con las mitocondrias.

En el caso del riñón, el incremento de la ingesta de metionina no produce ningún efecto sobre la producción mitocondrial de radicales libres a través de la modificación estructural a largo plazo de la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, dado que este tratamiento eleva la concentración de metionina en el tejido, parece que es capaz de producir el aumento en la generación de especies reactivas a nivel del complejo I por interacción directa con la mitocondria. Este incremento en la producción de especies reactivas podría explicar el daño renal producido por el exceso de metionina en la dieta (Kumagai *et al*, 2002).

En la restricción de metionina, el descenso en la producción mitocondrial de radicales libres y los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial transcurre de forma paralela

(Sanz *et al*, 2006a; Caro *et al*, 2008; 2009). También sucede en la suplementación de metionina en hígado, donde el incremento en la producción mitocondrial de radicales libres va paralelo al incremento en los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial. Dicha manipulación experimental es capaz de incrementar la concentración de la propia metionina en riñón y la metionina es capaz de producir un incremento de la producción mitocondrial de radicales libres a nivel del complejo I por señalización directa. Por lo tanto, debería aumentar el daño oxidativo al ADN mitocondrial en este órgano tras la suplementación de metionina en dieta. Sin embargo, la cantidad de 8-oxodG presente en el ADN mitocondrial depende tanto de los niveles de generación como en los de reparación del daño oxidativo a dicho ADN. Así pues, es posible que la ausencia de cambios en los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial de riñón en las ratas suplementadas con metionina se deba a un incremento en la actividad de los sistemas de reparación de dicho ADN, lo que facilitaría la ausencia de cambios en los niveles de esta base alterada aunque se produjera un aumento del daño sobre el ADN mitocondrial del riñón.

La metionina *in vitro* reduce el consumo de oxígeno de las mitocondrias de corazón y de riñón sólo en estado 3. Sin embargo, esta modificación en el consumo de oxígeno no sucede en estado 4, por lo que no afectaría a la producción de radicales libres, que se mide en dicho estado 4.

Las mitocondrias de hígado, corazón y cerebro, tratadas con homocisteína *in vitro* reducen su producción mitocondrial de radicales libres cuando se utiliza el sustrato del complejo I con y sin rotenona y el sustrato del complejo II con rotenona. Por lo tanto, podemos concluir que la homocisteína interacciona directamente con las mitocondrias de hígado, cerebro y riñón produciendo una reducción de la producción de radicales libres tanto a nivel del complejo I como a nivel del complejo III.

También desciende el consumo de oxígeno de las mitocondrias de corazón en presencia de homocisteína. Esta reducción tiene lugar en estado 4, sin embargo su magnitud es insuficiente para explicar el descenso en la producción de radicales libres que se produce en las mitocondrias de este órgano.

El trabajo de Chang *et al* (2004) realizado en mitocondrias de corazón de rata parece indicar que el tratamiento con homocisteína *in vitro* incrementa la producción mitocondrial

de radicales libres. Sin embargo, en este estudio se utilizan concentraciones de homocisteína más elevadas que en el nuestro, por lo que estas concentraciones, al ser más altas, producirían el aumento de la generación de especies reactivas en la mitocondria. La homocisteína es un compuesto capaz de causar la alteración del estado redox, generar carbonilos proteicos y favorecer la transferencia de átomos de hidrógeno generando radicales libres (Sibrian-Vazquez *et al*, 2010). Por lo tanto, es posible que el incremento de los radicales libres detectado en los ensayos con estas mitocondrias de corazón sea debido a efectos oxidantes producidos directamente por la elevada concentración de homocisteína en la prueba, en lugar de al incremento de la producción de radicales por parte de la mitocondria.

En el caso de las mitocondrias de riñón, el tratamiento con homocisteína *in vitro* incrementa la producción de radicales libres con todos los sustratos e inhibidores empleados. Por lo tanto podemos concluir que la homocisteína es capaz de interactuar directamente con las mitocondrias de riñón incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno tanto a nivel del complejo I como a nivel del complejo III. Como la adición de homocisteína hace descender el consumo de oxígeno en estado 4 de las mitocondrias de riñón, el incremento en la producción de radicales libres es aún más notable.

Como ya se ha comentado, las mitocondrias están adaptadas a la función de cada tejido, por lo que el proteoma mitocondrial difiere de un tipo celular a otro (Forner *et al*, 2009). Por consiguiente, es posible que las características del proteoma de las mitocondrias de riñón favorezca el incremento de la producción de radicales libres, mientras que las del proteoma mitocondrial del resto de los órganos estudiados favorezca la reducción de dicha producción, cuando se eleva la concentración de homocisteína.

Aunque la homocisteína es capaz de provocar estos efectos, no se ha determinado si su concentración se incrementa en estos tejidos tras la suplementación de metionina en dieta. Por lo tanto, es posible que dicho tratamiento no modifique la concentración de homocisteína en estos tejidos o si lo hace ésta no se eleve hasta los niveles que se utilizaron en los experimentos de suplementación *in vitro* de la presente tesis.

En conclusión, aunque la homocisteína produce incremento del daño oxidativo en el organismo, no parece que esto se deba a un incremento en la producción de radicales libres a nivel de la mitocondria, salvo en el caso del riñón donde se incrementa espectacularmente la generación de especies reactivas.

Las mitocondrias de los cuatro órganos estudiados no modifican su producción de radicales libres con ningún sustrato ni inhibidor cuando son tratadas con SAM o SAH *in vitro*, por lo tanto podemos concluir que estos dos metabolitos no son capaces de modificar la producción de radicales libres por interacción directa con la mitocondria.

Se ha demostrado que la metionina es capaz de afectar a la producción de radicales libres tanto a corto como a largo plazo, así como al estrés oxidativo en general. Sin embargo, serán necesarios más estudios para esclarecer los mecanismos por los cuales la metionina produce estos efectos y las consecuencias de su toxicidad en los seres vivos.

## **2.- DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE ADN MITOCONDRIAL EN EL ADN NUCLEAR**

El ADN mitocondrial recibe daño constantemente por el estrés oxidativo crónico generado en la mitocondria (Sastre *et al*, 2000; Sastre *et al*, 2003; Barja, 2004a). Este daño oxidativo al ADN mitocondrial correlaciona con la longevidad máxima tanto intra como inter-específicamente (Barja & Herrero, 2000; Barja, 2004b).

Los radicales libres generados continuamente en la mitocondria durante el transporte electrónico pueden dañar el ADN mitocondrial (Asunción *et al*, 1996; Barja & Herrero, 2000) generando desde mutaciones puntuales hasta grandes deleciones a lo largo de la vida de los individuos (Miquel *et al*, 1980; Crott *et al*, 2005; Sato *et al*, 2007). Aunque ambos tipos de alteraciones afectan a la información codificada en este ADN, estudios en ratones mutantes para la polimerasa gamma, que presentan un ritmo de envejecimiento acelerado, indican que las mutaciones puntuales no limitan la longevidad (Vermulst *et al*, 2007) y que son las grandes deleciones en el ADN mitocondrial las que causan el envejecimiento prematuro en estos ratones (Vermulst *et al*, 2008). Parece, por

tanto, que las grandes deleciones son las alteraciones del ADN mitocondrial determinantes en el proceso de envejecimiento.

Las células poseen numerosas copias de ADN mitocondrial. Por lo tanto, para que se comprometan las funciones mitocondriales, es necesario que la mayoría de las copias del ADN mitocondrial estén mutadas. Aunque existe una expansión clonal de las copias de ADN mitocondrial con deleciones (Kraytsberg *et al*, 2003) y se ha demostrado que la cantidad de células con el ADN mitocondrial delecionado en la *substantia nigra* es elevada en humanos ancianos (Kraytsberg *et al*, 2006; Bender *et al*, 2006), la proporción de las células homoplásmicas para el ADN mitocondrial mutado es muy baja en la mayoría de los tejidos de los animales viejos situándose entre el 0,5 y el 2 % (Falkenberg *et al*, 2007). Actualmente no está claro cómo esta pequeña cantidad de células con su ADN mitocondrial mutado puede estar relacionada con el proceso de envejecimiento.

Por otro lado, se sabe que la transferencia de secuencias de ADN mitocondrial al núcleo ha ocurrido repetidamente durante la evolución de los eucariotas (Blanchard & Lynch, 2000). Se ha descubierto que hay ADN mitocondrial insertado en los cromosomas de maíz cuya posición varía dramáticamente entre 10 líneas diferentes (Lough *et al*, 2008), por lo que parece que se está incorporando y perdiendo ADN mitocondrial en el ADN nuclear constantemente.

Los radicales libres producidos en la mitocondria pueden llegar a romper el ADN mitocondrial, provocando deleciones y liberando fragmentos de este ADN. El hallazgo de fragmentos de ADN altamente oxidado en mitocondrias aisladas de hígado de rata (Suter & Richter, 1999) parece confirmarlo. Estos fragmentos de ADN podrían llegar a escapar de la mitocondria para ser posteriormente integrados en el genoma nuclear de células somáticas (Richter, 1988). La acumulación de fragmentos de ADN mitocondrial en el núcleo, que se produciría a lo largo de la vida del individuo, podría cambiar la información codificada en el mismo ADN nuclear y, consecuentemente, contribuir tanto a la formación de células tumorales como al proceso de envejecimiento (Richter, 1988).

En nuestro trabajo, la técnica de la PCR en tiempo real (RT-PCR) se utilizó para detectar los genes mitocondriales de la citocromo c oxidasa III (COX III) y RNA ribosómico 16S (RNAr 16S), lo cual permitió detectar y cuantificar la cantidad de ADN

mitocondrial presente en el ADN nuclear. Los resultados obtenidos con la amplificación de ambos genes están en concordancia y parecen indicar que existen fragmentos de estos genes mitocondriales en el ADN nuclear de hepatocitos de rata y que su presencia se incrementa con la edad. La presencia de estos genes mitocondriales en el núcleo de hepatocitos parece ser unas tres veces superior en ratas viejas al compararlas con las jóvenes.

Usando ADN mitocondrial purificado como sonda en hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se pudo visualizar el ADN mitocondrial presente en los núcleos de hepatocitos. Las señales de ADN mitocondrial muestran una forma definida en los núcleos, lo que indica que el ADN mitocondrial no está diseminado a lo largo de los cromosomas, sino que está presente en *loci* determinados. Aunque el número de señales de ADN mitocondrial fue el mismo en núcleos jóvenes y viejos, tanto el área como la intensidad de las mismas fue significativamente mayor en los últimos. Por lo tanto, basándonos en estos datos podemos concluir que existen secuencias de ADN mitocondrial en los núcleos de hepatocitos de rata y que la cantidad de este ADN mitocondrial se incrementa con la edad. Dado que el número de señales no fue estadísticamente diferente entre ratas jóvenes y viejas, se presentan dos explicaciones posibles: que se produzcan inserciones adicionales de fragmentos de ADN mitocondrial que ocurren siempre en la misma posición o que las inserciones de ADN mitocondrial se amplifiquen en los núcleos viejos.

El número, el área y la intensidad de las señales de telómero no presentan cambios significativos entre los núcleos de ratas jóvenes y viejas, por lo que parece que no hay diferencias en el número de cromosomas entre los dos grupos. Sin embargo, se ha descrito que el núcleo del hepatocito puede ser altamente poliploide (Epstein & Gatens, 1967). Como la intensidad de señal y el área del núcleo completo fue significativamente superior en ratas viejas que en jóvenes, podemos concluir que ha tenido lugar un proceso de amplificación de ADN o endorreduplicación, en el que no se ha producido la modificación del número de cromosomas.

Los resultados del FISH no pueden determinar si el ADN mitocondrial es amplificado de los *loci* presentes en los individuos jóvenes o si se incorpora nuevo ADN mitocondrial en *loci* definidos del genoma nuclear donde ya existe ADN mitocondrial presente. Sin embargo, los resultados obtenidos en la RT-PCR apoyarían la segunda

---

posibilidad porque la magnitud del incremento en presencia de COX III y ARNr 16S en el núcleo de ratas viejas parece ser claramente superior a la amplificación del ADN nuclear.

Si efectivamente se produjera la inserción de fragmentos de ADN mitocondrial en el ADN nuclear durante el envejecimiento, esta no ocurriría al azar porque el número de señales de dicho ADN mitocondrial en el FISH no aumenta en ratas viejas respecto a las jóvenes. Por lo tanto, es posible que haya secuencias definidas para la inserción del ADN mitocondrial en el ADN nuclear. Estas secuencias específicas de integración actuarían como un mecanismo de regulación de los efectos deletéreos finales de la inclusión de ADN mitocondrial en el genoma nuclear. Así pues, además de controlar cuantitativamente la intensidad del proceso completo mediante la modulación de la tasa de generación de fragmentos de ADN mitocondrial, también habría un segundo mecanismo de control marcando los sitios de inserción con secuencias específicas.

Tanto la técnica de RT-PCR como la de FISH han detectado secuencias de ADN mitocondrial en núcleos de animales jóvenes. Por lo tanto, aunque las secuencias de ADN mitocondrial se insertarían en el ADN nuclear a lo largo de la vida, estas secuencias ya están presentes en núcleos de individuos jóvenes y sanos. Durante la gestación se produce un estrés oxidativo intenso. El rápido incremento de la  $pO_2$  en la placenta que tiene lugar durante el tránsito gestación/nacimiento puede conducir a un estrés oxidativo fisiológico (Jauniaux *et al*, 2000). Este marcado incremento en la  $pO_2$  durante la transición feto-neonatal está también asociado a una marcada oxidación del glutatión (Pallardo *et al*, 1991). Además, la placenta es rica en mitocondrias y ácidos grasos poliinsaturados, lo que favorece la generación de especies reactivas (Gitto *et al*, 2002; Casanueva & Viteri, 2003). Este marcado estrés oxidativo que se produce durante el desarrollo embrionario puede dañar el ADN mitocondrial, generando fragmentos de ADN que se podrían incorporar al genoma nuclear incluso antes del nacimiento. Así pues, el estrés oxidativo prenatal explicaría la presencia de secuencias de ADN mitocondrial en núcleos de individuos jóvenes.

Los radicales libres producidos en la mitocondria alterarían la información codificada en el ADN de la mitocondria de forma directa y en el ADN del núcleo a través de la generación de fragmentos de ADN mitocondrial. Dado que la gran mayoría de los genes celulares están presentes en el núcleo, las consecuencias deletéreas de las mutaciones

inducidas por la posible inserción de fragmentos de ADN mitocondrial en el ADN nuclear podrían ser muy relevantes para el fenómeno del envejecimiento, ya que conducirían a un incremento en el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas, estarían implicadas en el proceso fisiológico del envejecimiento y explicarían el mosaicismo como un rasgo del envejecimiento celular (Richter, 1988; Sastre *et al*, 2003).

Según este modelo, la mitocondria podría ser la fuente principal del proceso de envejecimiento, mientras que el núcleo sería su objetivo final. Aunque sólo un pequeño número de células albergarían ADN mitocondrial delecionado en homoplasmia, la gran mayoría de ellas presentaría el ADN nuclear mutado por la inserción de fragmentos de este ADN mitocondrial, lo que podría deberse a que los radicales libres (que generarían los fragmentos) se producen en la mitocondria de forma constante en todas las células aerobias normales (sin necesidad de estar mutadas para el ADN mitocondrial). De este modo, una gran cantidad de células de los tejidos en los animales viejos podrían verse afectadas por estas inserciones. Este detalle es importante porque la producción mitocondrial de radicales libres y los errores que ocurren durante la replicación de dicho ADN suceden en células aerobias normales donde el ADN mitocondrial no está mutado, que son la gran mayoría de las células presentes en tejidos viejos. Así pues, los fallos de los intentos previos de detección de un número suficientemente alto de células mutadas en animales viejos podrían ser debidos a que la búsqueda se centraba en células con el ADN mitocondrial mutado en lugar de células con ADN nuclear mutado por fragmentos de ADN originados en la mitocondria.

Aunque en este estudio se presente la posible inserción de fragmentos de ADN mitocondrial en el ADN nuclear como uno de los posibles mecanismos clave del envejecimiento en rata y se observe el incremento de la cantidad de secuencias de ADN mitocondrial en el ADN nuclear en células hepáticas con la edad, los datos presentados no demuestran inequívocamente que se produce la inserción de ADN mitocondrial en el ADN nuclear a lo largo de la vida del individuo. Así pues, serán necesarios más estudios para confirmar la presencia de dichos fragmentos de ADN mitocondrial en las células de otros organismos, la integración de los mismos en el genoma nuclear durante el envejecimiento y, si esta última afirmación fuera correcta, para desentrañar el mecanismo por el cual estos fragmentos de ADN mitocondrial serían trasladados e integrados en el núcleo.

# Conclusiones

- Tanto la producción de radicales libres como el daño al ADN de las mitocondrias de hígado se incrementan por la suplementación de metionina en dieta, lo que puede ser responsable de la hepatotoxicidad generada por este tratamiento.
- La suplementación de metionina en dieta produce una disminución significativa de los cuatro complejos mitocondriales de la cadena de transporte electrónico y del Factor Inductor de la Apoptosis en el riñón de rata, que no afecta al consumo de oxígeno ni a la producción de radicales libres por parte de las mitocondrias de este órgano.
- El metabolismo de la metionina es alterado por la suplementación de la misma en dieta en todos los órganos de rata estudiados, de forma que se incrementan las concentraciones de metionina, y S-adenosilhomocisteína en cerebro y riñón, así como las de metionina, S-adenosilmetionina y S-adenosilhomocisteína en hígado y corazón.
- Los marcadores de daño oxidativo, lipoxidativo y glicoxidativo a proteínas se ven reducidos en cerebro y riñón de rata tras la suplementación de metionina en la dieta, ya sea por la inducción adaptativa de enzimas antioxidantes o de los sistemas catabólicos implicados en la reparación del daño a proteínas en estos órganos.
- El DBI y el PI de los ácidos grasos de las membranas celulares hepáticas experimentan una disminución significativa tras la suplementación de metionina en la dieta, lo cual puede proporcionar protección a dichas membranas frente al aumento del daño oxidativo.
- La metionina es capaz de incrementar el estrés oxidativo interaccionando directamente con las mitocondrias de los tejidos mitóticos estudiados, de forma que provoca un incremento de la producción de radicales libres específicamente a nivel del complejo I en riñón y del complejo III en hígado.

- La homocisteína es capaz de interactuar directamente con las mitocondrias de los órganos de rata incrementando la producción de radicales en mitocondrias de riñón y disminuyendo la misma en hígado, corazón y cerebro, tanto a nivel de complejo I como a nivel de complejo III de la cadena de transporte electrónico.
- El ADN nuclear del hígado de rata presenta inserciones de ADN mitocondrial en regiones localizadas del genoma, cuya presencia se incrementa con la edad de los animales. Dicho incremento puede contribuir al envejecimiento.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- 
- Agarwal S & Sohal RS (1995). **Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging.** *Mech Ageing Dev*, 85:55-63.
  - Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW (1997). **N<sup>ε</sup>-(carboxietyl)-lisyne, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins.** *Biochemical J*, 324:565-570.
  - Albring M, Griffith J, Attardi G (1977). **Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication.** *Proc Nat Acad USA*; 74:1348-1352.
  - Algaidi SA, Christie LA, Jenkinson AM, Whalley L, Riedel G, Platt B (2006). **Long-term homocysteine exposure induces alterations in spatial learning, hippocampal signalling and synaptic plasticity.** *Exp Neurol*; 197(1):8-21.
  - Ames BN, Hollstein MC, Cathcart (1982). **Lipid peroxidation and oxidative damage to DNA.** En: *Lipid Peroxides in Biology and Medicine*. Acad Press. New Cork.
  - Andersson SG, Karlberg O, Canbäck B, Kurland CG (2003). **On the origin of mitochondria: a genomics perspective.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 358(1429):165-177.
  - Asunción JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre, J, Viña J (1996). **Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA.** *FASEB J*, 10: 333-338.
  - Ayala V, Naudí A, Sanz A, Caro P, Portero-Otin M, Barja G, 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(4):352-360.
  - Barja de Quiroga G, Lopez-Torres M, Perez-Campo R (1992). **Free radicals and aging.** *Emerit and B Chance (Ed)*, Birkhäuser , Basel.
  - Barja G, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, Lopez-Torres M (1994a). **Low mitochondrial free radical production per unit O<sub>2</sub> consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds.** *Free Rad Res*, 21: 317-328.

- 
- Barja G, Cadenas S, Rojas C, Lopez-Torres M, Perez-Campo R (1994b). **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 (1996). **Los radicales libres mitocondriales como factores determinantes de la velocidad de envejecimiento.** *Rev Esp Geriatr Gerontol*; 31:153-161.
  - Barja G (1997). **Radicales libres y antioxidantes.** En: *Bioquímica y Fisiopatología del Estrés Oxidativo*. ed. M. Cascales. Real Academia de Farmacia, Madrid.
  - Barja G & 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 and Biomembr*; 30:235-243.
  - 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 oxigen radical production.** En: *Methods in aging research*. B.P. Yu editor. CRC Press. Boca Ratón.
  - Barja G (2000). **The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate.** *Aging Clin Exp Res*; 12:342-355.
  - Barja G & 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 (2001). **Ubiquinone and oxidative stress: antioxidant and possible prooxidant function.** En: *Mitochondrial ubiquinone (Coenzyme Q10): biochemical, functional, medical and therapeutic aspects in human health and diseases*. Ebadi M, Marwah J, Chropra R eds. Prominent press. Scotsdale, Arizona.
  - Barja G (2002a). **Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity.** *Free Rad Biol Med*; 33:1167-1772.

- 
- Barja G (2002b). **The quantitative measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in isolated mitochondria.** *J Bioenerg Biomembr*; 34:227-233.
  - Barja G (2004a). **Free radicals and aging.** *TRENDS in Neurosc*; 27:595-600.
  - Barja G (2004b). **Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism?** *Biol Reviews Camb Philos Soc*; 79(2):235-251.
  - Barja G, Portero-Otín M, 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.
  - Barja G (2007). **Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies.** *Rejuvenation Res*; 10:215-224.
  - Beckman KB & Ames BN (1998). **The free radical theory of aging matures.** *Physiological Reviews*; 78:547-581.
  - Behne D & Kyriakopoulos A (2001). **Mammalian selenium-containing proteins.** *Annu Rev Nutr*; 21:453-473.
  - Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson JS, Betts J, Klopstock T, Taylor RW, Turnbull DM (2006). **High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease.** *Nat Genet*; 38(5):515-517.
  - Benevenga NJ, Yeh M-H, Lalich JJ (1976). **Growth depression and tissue reaction to the consumption of excess dietary methionine and S-methyl-L-cysteine.** *J Nutr*; 106(12):1714-1720.
  - Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME (2004). **Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production.** *Am J Physiol*; 286:852-861.

- 
- Benzi G, Moretti A (1995). **Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system.** *Free Radic Biol Med*; 19(1):77-101.
  - Bielski BHJ, Arudi RI, Sutherland MW (1983). **A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with unsaturated fatty acids.** *J Biol Chem*; 258:4759-4761.
  - Blanchard JL, Lynch M (2000). **Organellar genes. Why do they end up in the nucleus?** *Trends Genetics*; 16:315-320.
  - Blommaart EF, Luiken JJ, Blommaart PJ, van Woerkom GM, Meijer AJ (1995). **Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes.** *J Biol Chem*; 270(5):2320-2326.
  - Bohr VA (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.
  - Boveris A & Chance B (1972). **The cellular production of hydrogen peroxide.** *Biochem J*; 128:617-630.
  - Boveris A & Chance B (1973). **The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.** *Biochem J*; 134:707-716.
  - Boveris A, Cadenas E, Stoppani OM (1976). **Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide.** *Biochem J*; 153:435-444.
  - Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ (1999). **Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide.** *Methods Enzymol*; 301:188-198.
  - Brandt U (1997). **Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction.** *Biochim Biophys Acta*; 1318:79-91.
  - Bradford MM (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem*; 72:248-254.

- 
- Carp H, Miller F, Hoidal JR, 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.
  
  - Caro P, Gómez J, Lopez-Torres M, Sánchez I, Naudi A, Jove M, Pamplona R, Barja G (2008). **Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver.** *Biogerontology*; 9(3):183-196.
  
  - Caro P, Gomez J, Sanchez I, Naudi A, Ayala V, Lopez-Torres M, Pamplona R, Barja G (2009). **Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria.** *Rejuvenation Res*; 12(6):421-434.
  
  - Carroll J, Fearnley IM, Shanon RJ, Hirst J, Walker JE (2003). **Analysis of the subunit composition of Complex I from bovine heart mitochondria.** *Mol Cell Proteomics*; 2:117-126.
  
  - Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Runswick MJ, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE (2005). **The post-translational modifications of the nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria.** *Mol Cell Proteomics*; 4:693-699.
  
  - Casanueva E, Viteri FE (2003). **Iron and oxidative stress in pregnancy.** *J Nutr*; 133:1700S-1708S.
  
  - Chance B & Williams GR (1956). **The respiratory chain and oxidative phosphorylation.** *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*; 17:65-134.
  
  - Chance B, Sies H, Boveris A (1979). **Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.** *Physiol Rev*; 59:527-605.
  
  - Chang L, Zhao J, Xu J, Jiang W, Tang CS, Qi YF (2004). **Effects of taurine and homocysteine on calcium homeostasis and hydrogen peroxide and superoxide anions in rat myocardial mitochondria.** *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 31(4):237-243.

- 
- Chou JY (2000). **Molecular genetics of hepatic methionine adenosyltransferase deficiency.** *Pharmacol Ther*, 85(1):1-9.
  - Ciorba MA, Heinemann SH, Weissbach H, Brot N, Hoshi T (1997). **Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:9932-9937.
  - Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, Smith SR, Ravussin E (2007). **Calorie Restriction Increases Muscle Mitochondrial Biogenesis in Healthy Humans.** *PLoS Med*; 4(3):1-10.
  - Cook HW (1996), **Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes.** En: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and biomembranes.* Vance DE & Vance JE, editors. Amsterdam: Elsevier.
  - Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC (1992). **Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age.** *Nature Genet*; 2:324-329.
  - Crott JW, Choi SW, Branda RF, Mason JB (2005). **Accumulation of mitochondrial DNA deletions is age, tissue, and folate-dependent in rats.** *Mut Res*; 570:63-70.
  - Cutler RG (1984). **Antioxidant, aging and longevity.** En: *Free Radicals in Biology vol 11.* W Pryor Ed.
  - Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997). **Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.** *Biochem J*; 324 (Pt 1):1-18.
  - de Grey ADNJ (1999). **The mitochondrial free radical theory of aging.** En: *Molecular Biology Intelligence Unit.* RG Landes Company. Austin, Texas, USA.
  - de Grey ADNJ (2002). **HO<sub>2</sub><sup>\*</sup>: the forgotten radical.** *DNA Cell Biol*; 21:251-257.
  - Dever JT, Elfarra AA (2008). **L-methionine toxicity in freshly isolated mouse hepatocytes is gender-dependent and mediated in part by transamination.** *J Pharmacol Exp Ther*; 326(3):809-817.

- 
- Devlin AM, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Rozen R, Lentz SR (2004). **Effect of Mthfr genotype on diet-induced hyperhomocysteinemia and vascular function in mice.** *Blood*; 103(7):2624-2629.
  - Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, Barja G, Leeuwenburgh C (2003). **Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart.** *Amer J Physiol*; 284:471-480.
  - Dufour E, Larsson NG (2004). **Understanding aging: revealing order out of chaos.** *Biochim Biophys Acta*; 1658:122-132.
  - Epstein CJ, Gatens EA (1967). **Nuclear ploidy in mammalian parenchymal liver cells.** *Nature*; 214:1050-1051.
  - Everitt AV, Roth GS, Le Couter DG, Hilmer SN (2005). **Caloric restriction versus drug therapy to delay the onset of aging diseases and extend life.** *Age*; 27(1):39-48.
  - Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM (2007). **DNA replication and transcription in mammalian mitochondria.** *Annu Rev Biochem*; 76:679-699.
  - Fau D, Peret J, Hadjiisky P (1998). **Effects of ingestion of high protein or excess methionine diets by rats for two years.** *J Nutr*; 118(1):128-133.
  - Finkelstein A, Benevenga NJ (1986). **The effect of methanethiol and methionine toxicity on the activities of cytochrome c oxidase and enzymes involved in protection from peroxidative damage.** *J Nutr*; 116(2):204-215.
  - Finkelstein JD, Martin JJ (1986). **Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess.** *J Biol Chem*; 261(4):1582-1587.
  - Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957). **A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.** *J Biol Chem*; 226:497-509.
  - Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JO (2004). **Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 101(17):6659-6663.

- 
- Fontana L, Klein S, Holloszy JO (2006). **Long-term low-protein, low-calorie diet and endurance exercise modulate metabolic factors associated with cancer risk.** *Am J Clin Nutr*; 84(6):1456-1462.
  - Forner F, Kumar C, Lubert CA, Fromme T, Klingenspor M, Mann M (2009). **Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions.** *Cell Metab*; 10(4):324-335.
  - Fukagawa NK, Galbraith RA (2004). **Advancing age and other factors influencing the balance between amino acid requirements and toxicity.** *J Nutr*; 134 (6 Suppl):1569S-1574S.
  - Flurkey K, Papaconstantinou J, Miller RA, Harrison DE (2001). **Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 98(12):6736-6741.
  - Garrow TA (2001). **Betaine-dependent remethylation.** En: Carmel R, Jacobsen DW, eds. **Homocysteine in health and disease.** Cambridge, United Kingdom: *Cambridge University Press*.
  - Gellisen G, Bradfield JY, White BN, Wyatt GR (1983). **Mitochondrial DNA sequences in the nuclear genome of a locust.** *Nature*; 301:631-634.
  - Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, Lenaz G (2001). **The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2.** *FEBS Lett*; 505:364-368.
  - Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO (1954). **Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common.** *Science*; 119:623-626.
  - Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan DX, Gitto P, Barberi S, Barberi I (2002). **Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period.** *Biol Neonate*; 81:146-157.
  - Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J (2008). **Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training.** *Free Radic Biol Med*; 44(2):126-131.

- 
- Gomez J, Caro P, Naudí A, Portero-Otín M, Pamplona R, 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.
  
  - Goto M (1997). **Hierarchical deterioration of body systems in Werner's syndrome: Implications for normal ageing.** *Mech Ageing Dev*; 98:239-254.
  
  - Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949). **Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction.** *J Biol Chem*; 177:751-766.
  
  - Graham J, Ford T, Rickwood D (1994). **The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of iodixanol.** *Anal Biochem*; 220:367-373.
  
  - Gredilla R, Barja G, 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, 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.
  
  - Gredilla R & Barja G (2005). **Minireview: The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity.** *Endocrinology*; 146:3713-3717.
  
  - Guo YH, Chen FY, Wang GS, Chen L, Gao W (2008). **Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates vascular reverse remodeling of balloon-injured arteries in rat.** *Chin Med J (Engl)*; 121(22):2265-2271.
  
  - Halliwell B (1998) **Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies.** *Free Rad Res*; 29:469-486.
  
  - Hamilton ML, Remmen HV, Drake JA, Yang H, Mao-Guo Z, Kewitt K, Walter C, Richardson A (2001). **Does oxidative damage to DNA increase with age?** *Proc Natl Acad Sci*; 98:10469-10474.

- 
- Harman D (1956). **A theory based on free radical and radical chemistry.** *J Gerontol*; 11:298-300.
  - Harman D (1972). **The biological clock: the mitochondria?** *J Am Geriatr Soc*; 20:99-117.
  - 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 Res*; 147:77-83.
  - Harper AE (1968). **Diet and plasma amino acids.** *Am J Clin Nutr*; 21(5):358-366.
  - Harper AE, Benevenga NJ, Wohlhueter RM (1970). **Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids.** *Physiol Rev*; 50(3):428-558.
  - Harris SB, Weindruch R, Smith GS, Mickey MR, Walford RL (1990). **Dietary restriction alone and in combination with oral ethoxyquin/2-mercaptoethylamine in mice.** *J Gerontol*; 45(5):B141-147.
  - Hayflick L (1998) **Aging is not a disease.** *Aging Clin Exp Res*; 10(2):146.
  - Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, Rood J, Nguyen T, Martin CK, Volaufova J, Most MM, Greenway FL, Smith SR, Deutsch WA, Williamson DA, Ravussin E for the Pennington CALERIE Team (2006). **Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial.** *JAMA*; 295(13):1539-1548.
  - Herrero A & Barja G (1997a). **Sites and mechanism 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 & Barja G (1997b). **ADP regulation of mitochondrial free radical production is different with Complex I- or Complex II- linked substrates: implications for the exercise paradox and brain hypermetabolism.** *J Bioenerg Biomembr*; 29:243-251.
  - Herrero A & Barja G (1998). **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved.** *Mech Ageing Dev*; 103:133-146.

- 
- Herrero A & Barja G (1999). **8-oxo-deoxyguanosine levels in heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of two mammals and three birds in relation to their different rates of aging.** *Aging Clin Exp Res*; 11:294-300.
  - Herrero A & 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 GS, Long L, Zhao X, Madere R, Cockell K, Belonge B, Ratnayake WM, 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(12):730-740.
  - Hinchliffe P, Sazanov LA (2005). **Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I.** *Science*; 309:771-774.
  - Hirst J, King MS, Pryde KR (2008). **The production of reactive oxygen species by complex I.** *Biochem Soc Trans*; 36:976-980.
  - Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB (2001). **Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress.** *J Neurochem*; 78(2):249-253.
  - Hoffman DL, Salter JD, Brookes PS (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.
  - Huang TT, Carlson EJ, Gillespie AM, Shi Y, Epstein CJ (2000). **Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*; 55(1):B5-9.
  - Hulbert AJ (2005). **On the importance of fatty acid composition of membranes for aging.** *J Theor Biol*; 234(2):277-288.
  - Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA (2007). **Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals.** *Physiol Rev*; 87(4):1175-1213.

- 
- Iwasaki K, Gleiser CA, Masoro EJ, McMahan CA, Seo EJ, Yu BP (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(1):B13-21.
  - Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JA, Hawkins R, van Duijn W, Verspaget HW, London J, Holstege JC (2000). **Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1.** *Neurobiol Dis*; 7(6 Pt B):623-643.
  - Jana C, Das N, Sohal RS (2001). **Selectivity of protein oxidative damage during aging in *Drosophila melanogaster*.** *Biochem J*; 306:209-216.
  - Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ (2000). **Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure.** *Am J Pathol*; 157:2111-2122.
  - Judge S, Judge A, Grune T, Leeuwenburgh (2004). **Short-term CR decreases cardiac mitochondrial oxidant production but increases carbonyl content.** *Am J Physiol*; 286:254-259.
  - Juretic N (1995). **Mitochondrial DNA rearrangements: intracellular information system.** *FEBS Letters*; 362:337-341.
  - Khorakova M, Deil Z, Khausman Dzh, Matsek K (1990). **Effect of carbohydrate-enriched diet and subsequent food restriction on life prolongation in Fischer 344 male rats.** *Fiziol Zh*; 36(5):16-21.
  - Kirkwood TBL (1997). **The origins of human ageing.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 352:1765-1772.
  - Kirkwood TBL & Austad N (2000). **Why do we age?** *Nature*; 408:233-238.
  - Knecht KJ, Dunn JA, McFarland KF, McCance DR, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW (1991). **Effects of diabetes and aging on N<sup>ε</sup>-(carboximethyl)lysine levels in human urine.** *Diabetes*; 40:190-196.

- 
- Knight JA (1995). **The process and theories of aging.** *Ann Clin Lab Sci*; 25:1-12.
  - Kraysberg Y, Nekhaeva E, Bodyak NB, Khrapko K (2003). **Mutation and intracellular clonal expansion of mitochondrial genomes: two synergistic components of the aging process?** *Mech Ageing Dev*; 124:49-53.
  - Kraysberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K (2006). **Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons.** *Nat Genet*; 38(5):518-520.
  - Krinsky NI (1993). **Micronutrients and their influence on mutagenicity and malignant transformation.** *Ann N Y Acad Sci*; 686:229-242.
  - Ku HH, Brunk UT, Sohal RS (1993). **Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species.** *Free Rad Biol Med*; 15:621-627.
  - Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004). **Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria.** *J Biol Chem*; 279:4127-4135.
  - Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Kunz WS (2005). **Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria.** *Biomed Pharmacother*; 59(4):163-168.
  - Kukat A, Trifunovic A (2008). **Somatic mtDNA mutations and aging - Facts and fancies.** *Exper Gerontol*; 44(1-2):101-105.
  - Kumagai H, Katoh S, Hirokawa K, Kimura M, Hishida A, Ikegaya N (2002). **Renal tubulointerstitial injury in weanling rats with hyperhomocysteinemia.** *Kidney Int*; 62(4):1219-1228.
  - Kushnareva Y, Murphy AN, 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.

- 
- Lai JC, Clark JB (1979). **Preparation of synaptic and nonsynaptic mitochondria from mammalian brain.** *Methods Enzymol*; 55:51-60.
  - Lambert AJ, Brand MD (2004). **Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).** *J Biol Chem*; 279(38):39414-39420.
  - Lambert AJ, Boysen HM, Buckingham JA, Yang T, Podlutzky A, Austad SN, Kunz TH, Buffenstein R, Brand MD (2007). **Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms.** *Aging Cell*; 6:607-618.
  - Latorre A, Moya A, Ayala A (1986). **Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*.** *PNAS USA*; 83:8649-8653.
  - Lee CM, Lopez ME, Weindruch R, Aiken JM (1998). **Association of age-related mitochondrial abnormalities with skeletal muscle fiber atrophy.** *Free Rad Biol Med*; 25:964-972.
  - Lee CK, Pugh TD, Klopp RG, Edwards J, Allison DB, Weindruch R, Prolla TA (2004). **The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme Q10 and caloric restriction on life span gene expression patterns in mice.** *Free Radic Biol Med*; 36:1043-1057.
  - Leto S, Kokkonen GC, Barrows CH Jr (1976). **Dietary protein, life-span and biochemical variables in female mice.** *J Gerontol*; 31:144-148.
  - Levine RL (2002). **Carbonil modified proteins in cellular regulation, aging, and disease.** *Free Rad Bio Med*; 32:790-796.
  - Lynch SM, Strain JJ (1989). **Increased hepatic lipid peroxidation with methionine toxicity in the rat.** *Free Radic Res Commun*; 5(4-5):221-226.
  - Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002). **Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain.** *J Neurochem*; 80:780-787.
  - Loft S & Poulsen HE (1996). **Cancer risk and oxidative DNA damage in man.** *J Mol Med*; 74:297-312.

- 
- Loft S, Poulsen HE (1999). **Markers of oxidative damage to DNA: antioxidants and molecular damage.** *Methods Enzymol*; 300:166-184.
  - Lopez-Torres M, Pérez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G (1993a). **Simultaneous induction of sod, glutathione reductase, GSH, and ascorbate in liver and kidney correlates with survival during aging.** *Free Radic Biol Med*; 15(2):133-142.
  - Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G (1993b). **Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and basal and maximum aerobic capacity.** *Mech Ageing Dev*, 70(3):177-199.
  - Lopez-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G (2002). **Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria.** *Free Rad Biol Med*; 32:882-889.
  - Lopez-Torres M, Barja G (2008a). **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(11):1337-1347.
  - Lopez-Torres M, Barja G (2008b). **Restricción calórica, estrés oxidativo y longevidad.** *Rev Esp Geriatr Gerontol*; 43(4):252-260.
  - Loschen G, Flohe L, Chance B (1971). **Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria.** *FEBS Lett*; 18:261-264.
  - Lough AN, Roark LM, Kato A, Ream TS, Lamb JC, Birchler JA, Newton KJ (2008). **Mitochondrial DNA transfer to the nucleus generates extensive insertion site variation in maize.** *Genetics*; 178:47-55.
  - Mair W, Piper MDV, Partridge L (2005). **Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*.** *PLOS Biology*; 3:1305–1311.
  - Malloy VL, Krajcik RA, Bailey SJ, Hristopoulos G, Plummer JD, 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(4):305-314.

- 
- Margulis L (1970). **Origin of eukaryotic cells.** *New Haven: Yale University Press.*
  - Marnett LJ (1999). **Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde.** *Mutation Res; 424:83-95.*
  - Martin GM & Oshima J (2000). **Lessons from human progeroid syndromes.** *Nature 408:263-266.*
  - Martin W (2003). **Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks.** *Proc Natl Acad Sci USA; 100:8612-8614.*
  - Masoro EJ, Shimokawa I, Yu BP (1991). **Retardation of the aging processes in rats by food restriction.** *Ann NY Acad Sci; 621:337-352.*
  - Masoro EJ (1996). **The biological mechanism of aging: is it still an enigma?** *Age; 19:141-145.*
  - Masoro EJ & Austad SN (1996). **The evolution of the antiaging action of dietary restriction: a hypothesis.** *J Gerontol Biol Sci; 51A:B387-391.*
  - Matthias D, Becker CH, Riezler R, Kindling PH (1996). **Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine.** *Atherosclerosis; 122(2):201-216.*
  - McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2006). **Mitochondria: more than just a powerhouse.** *Curr Biol; 16(14):R551-560.*
  - McCay CM, Crowell MF, Maynard LA (1935). **The effect of retarded growth upon the length of the life-span and ultimate body size.** *J Nutr; 10:63-79.*
  - McCord JM & Fridovich I (1969). **Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein).** *J Biol Chem; 244:6049-6055.*
  - Mela L, Seitz S (1979). **Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue.** *Methods Enzymol; 55:39-46.*

- 
- Melse-Boonstra A, Holm PI, Ueland PM, Olthof M, Clarke R, 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.
  - Meyer TE, Kovács SJ, Ehsani AA, Klein S, Holloszy JO, Fontana L (2006). **Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans.** *J Am Coll Cardiol*; 47(2):398-402.
  - Mihara M, Uchiyama M (1978). **Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test.** *Anal Biochem*; 86(1):271-278.
  - Miller RA, Buehner YC, Harper JM, Sigler R, 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(3):119-125.
  - Min KJ, Tatar M (2006). **Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster*.** *Mech Ageing Dev*; 127(7):643-646.
  - Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr (1980). **Mitochondrial role in cell aging.** *Exp Gerontol*; 15:579-591.
  - Miquel J (1991). **An integrated theory of aging as a result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells.** *Arch Gerontol Geriatr*; 12:99-117.
  - Mitchell P (1975). **Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle.** *FEBS Lett*; 56:1-6.
  - Mockett RJ, Sohal RS, Orr WC (1999). **Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not normoxia.** *FASEB J*; 13(13):1733-1742.
  - Mori N, Hirayama K (2000). **Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver.** *J Nutr*; 130(9):2349-2355.

- 
- Moskovitz J, Bar-Noy S, Williams WM, Requena J, Berlett BS, Stadtman ER (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 FL, Mele J, Van Remmen H (2004a). **Proving the in vivo relevance of oxidative stress in aging using Knockout and transgenic mice.** In: Von Zglinicki T (Ed). *Aging at molecular level*. Kluwer, Boston.
  
  - Muller FL, Liu Y, Van Remmen H (2004b). **Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane.** *J Biol Chem*; 279:49064-49073.
  
  - Muller FL, Liu Y, Abdul-Ghani MA, Lustgarten M.S, Bhattacharya A, Jang YC, 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.
  
  - Naudi A, Caro P, Jove M, Gómez J, Boada J, Ayala V, Portero-Otin 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 Res*; 10(4):473-484.
  
  - Navarro A & Boveris A (2007). **The mitochondrial energy transduction system and the aging process.** *Am J Physiol Cell Physiol*; 292:670-686.
  
  - Navas P, Villalba JM, Cordoba F (1994). **Ascorbate function at the plasma membrane.** *Biochim Biophys Acta*; 1197:1-13.
  
  - Nohl H & Stolze L (1992). **Ubisemiquinones of the mitochondrial respiratory chain do not interact with molecular oxygen.** *Free Radi Res Commun*; 19:406-419.
  
  - Okuyama H, Kobayashi T, Watanabe S (1997). **Dietary fatty acids. The n-6/n-3 balance and chronic elderly diseases. Excess linoleic acid and relative n-3 deficiency syndrome seen in Japan.** *Prog Lipid Res*; 35:409-457.

- 
- Olovnikov AM (1971). **Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides.** *Dokl Akad Nauk SSSR*; 201:1496-1499.
  - Orentreich N, Matias JR, DeFelice A, Zimmerman JA (1993). **Low methionine ingestion by rats extends life span.** *J Nutr*; 123:269-274.
  - Orgel LE (1963). **The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 49:517-521.
  - Pallardo FV, Sastre J, Asensi M, Rodrigo F, Viña J (1991). **Physiological changes in glutathione metabolism in foetal and newborn rat liver.** *Biochem J*; 274:891-893.
  - Pamplona R, Prat J, Cadenas S, Rojas C, Perez-Campo R, Lopez Torres M, Barja G (1996). **Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case.** *Mech Ageing Dev*; 86(1):53-66.
  - Pamplona R, Portero-Otín M, Requena JR, Thorpe SR, Herrero A, Barja G (1998). **Mitochondrial membrane peroxisability index is inversely related to maximum life span in mammals.** *J Lipid Res*; 39:1989-1994.
  - Pamplona R, Portero-Otín M, Riba D, Ledo F, Gredilla R, Herrero A, Barja G (1999a). **Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the canary and the parakeet than in the mouse.** *Aging Clin Expert Res*; 11:44-49.
  - Pamplona R, Portero-Otín M, Requena JR, Thorpe SR, Herrero A, Barja G (1999b). **A low fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipooxidation-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-Otín M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A, Barja G (2000a). **Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals.** *Mech Ageing Dev*; 112(3):169-183.
  - Pamplona R, Portero-Otín M, Riba D, Requena JR, Thorpe SR, López-Torres M, Barja G (2000b). **Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life span.** *J Gerontol*; 55A:B286-291.

- 
- Pamplona R, Barja G, Portero-Otín 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-Otín M, Bellmunt MJ, Gredilla R, Barja G (2002b). **Aging increases N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)-lysine and caloric restriction decreases N<sup>ε</sup>-(carboxyethyl)-lysine and N<sup>ε</sup>-(malondialdehyde)-lysine in rat heart mitochondrial proteins.** *Free Radic Res*; 36: 47-54.
  - Pamplona R, Portero-Otín M, Requena J, Gredilla R, Barja G (2002c). **Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after four months of caloric restriction than in age-matched controls.** *Mech Ageing Dev*; 123(11): 1437-1446.
  - Pamplona R & 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.
  - Pamplona R, Portero-Otín M, Sanz A, Requena J, Barja G (2004). **Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondria NA in liver and brain.** *Exp Gerontol*; 39:725-733.
  - Pamplona R, Portero-Otín M, Sanz A, Ayala V, Vasileva E, Barja G (2005). **Protein and lipid oxidative damage and complex I content are lower in the brain of parakeets and canaries than in mice. Relation to aging rate.** *AGE*; 27:267-280.
  - Pamplona R, Barja G (2006). **Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection.** *Biochim Biophys Acta*; 1757(5-6):496-508.
  - Pamplona R, Barja G (2007). **Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity.** *Ageing Res Rev*; 6(3):189-210.
  - Pamplona R (2009). **La vida humana ante el proceso de envejecimiento.** *Rev Esp Geriatr Gerontol*; 44(4):225-330.

- 
- Park CM, Cho CW, Rosenfeld ME, Song YS (2008). **Methionine supplementation accelerates oxidative stress and nuclear factor kappaB activation in livers of C57BL/6 mice.** *J Med Food*; 11(4):667-674.
  
  - Pearl R (1928). **The rate of living.** *University of London Press*, London.
  
  - Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G (1998). **The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach.** *J Comp Physiol B*; 168:149-158.
  
  - Pertoft H, Rubin K, Kjellen L, Laurent TC, Klingeborn B (1977). **The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll(TM).** *Exp Cell Res*; 110:449-457.
  
  - Porter AG, Urbano AG (2006). **Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells?** *Bioessays*; 28(8):834-843.
  
  - Priestley J (1775). **The discovery of the oxygen.** Part I, Vol II, Sections III-V. *J. Priestley ed. The alembic club, Edinburgh.*
  
  - Puzianowska-Kuznicka M & Kuznicki J (2005). **Genetic alterations in accelerated ageing syndromes. Do they play a role in natural ageing?** *Int J Biochem Cell Biol*; 37(5):947-960.
  
  - Qu B, Halliwell B, Ong CN, Lee BL, Li QT (2000). **Caloric restriction prevents oxidative damage induced by the carcinogen clofibrate in mouse liver.** *FEBS Lett*; 473:85-88.
  
  - Rao AM, Drake MR, Stipanuk MH (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 HHF, Tsai L, Stadman ER (2000). **Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 97:611-616.
  
  - Regina M, Korhonen VP, Smith TK, Alakuijala L, Eloranta TO (1993). **Methionine toxicity in the rat in relation to hepatic accumulation of S-adenosylmethionine: prevention by dietary stimulation of the hepatic transsulfuration pathway.** *Arch Biochem Biophys*; 300(2):598-607.

- 
- Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR (1997). **Quantification of malondialdehyde and 4-hidroxy-nonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoproteins.** *Biochem J*; 322:317-325.
  - Requena JR, Cho CC, Levine RL, Stadman ER (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.
  - Richie JP Jr, Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy V, Orentreich N, Zimmerman JA (1994). **Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats.** *FASEB J*; 8(15):1302-1307.
  - Richter R (1987). **Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes.** *Chem Phys Lipids*; 44:175-189.
  - Richter C, Park JW, Ames BN (1988). **Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 85:6465-6467.
  - Richter C (1988). **Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging?** *FEBS Letters*; 241:1-5.
  - Richter C (1995). **Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing.** *Int J Biochem Cell Biol*; 27:647-653.
  - Robert KA, Brunet-Rossinni A, Bronikowski AM (2007). **Testing the 'free radical theory of aging' hypothesis: physiological differences in long-lived and short-lived colubrid snakes.** *Aging Cell*; 6:395-404.
  - Robin S, Maupoil V, Laurant P, Jacqueson A, Berthelot A (2004). **Effect of a methionine-supplemented diet on the blood pressure of Sprague-Dawley and deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats.** *Br J Nutr*; 91(6):857-865.
  - Robinson BH (1998). **Human Complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals en the pathogenicity of the defect.** *Bioch Biophys Acta*; 1364:271-286.
  - Romero F, Viña JA (1983). **Simple procedure to prepare isolated hepatocytes.** *Biochem Educ*; 11:135-136.

- 
- Rubner M (1908). **Das problem der lebensdauer und seine beziehungen zu wachstum und ernahrung.** R. Oldenburg, Muenchen, Germany.
  - Ruch W, Cooper PH, 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.** *Journal of Immunological Methods*, 63:347-357.
  - Ruiz MC, Ayala V, Portero-Otín M, Requena JR, Barja G, 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(10):1106-1114.
  - Saborido A, Soblechero L, Megias A (2005). **Isolated respiring heart mitochondria release reactive oxygen species in states 4 and 3.** *Free Radic Res*, 39:921-931.
  - Sanz A, Caro P, 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, Ibañez J, Gomez J, Gredilla R, Barja G (2005). **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, Ayala V, Portero-Otin M, Pamplona M, 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(8):1064-1073.
  - Sanz A, Caro P, Sanchez JG, Barja G (2006b). **Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage.** *Ann N Y Acad Sci*; 1067:200-209.
  - Sanz A, Gomez J, Caro P, Barja G (2006c). **Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage.** *J Bioenerg Biomembr*, 38(5-6):327-33.
  - Sanz A, Pamplona R, Barja G (2006d). **Is the mitochondrial free radical theory of aging intact?** *Antioxid Redox Signal*; 8(3-4):582-599.

- 
- Saran M & Bors W (1990). **Radical reactions in vivo- an overview.** *Radiat Envir Biophys*, 29:249-262.
  - Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Vina J (2000). **Mitochondria, oxidative stress and aging.** *Free Rad Res*, 32:189-198.
  - Sastre J, Pallardo FV, Viña J (2003). **The role of mitochondrial oxidative stress in aging.** *Free Rad Biol Med*, 35:1-8.
  - Sato A, Nakada K, Shitara H, Kasahara A, Yonekawa H, Hayashi JI (2007). **Deletion-Mutant mtDNA Increases in Somatic Tissues but Decreases in Female Germ Cells With Age.** *Genetics*, 177:2031-2037.
  - Sazanov LA, Hinchliffe P (2006). **Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*.** *Science*, 311:1430-1436.
  - Scheele CW (1777). **Chemische Abhandlung von der luft und dem feuer. Uppsala and Liepzip.** Section 2. In Scheele CW. The collected papers of carl Wilhem Scheele *Bell and Sons*, London, 1931.
  - Schweigert FJ (2001). **Inflammation-induced changes in the nutritional biomarkers serum retinol and carotenoids.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 4(6):477-481.
  - Scislawski PW, Pickard K (1993). **Methionine transamination--metabolic function and subcellular compartmentation.** *Mol Cell Biochem*, 129(1):39-45.
  - Seneviratne CK, Li T, Khaper N, Singal PK (1999). **Effects of methionine on endogenous antioxidants in the heart.** *Am J Physiol*, 277(6 Pt 2):H2124-2128.
  - Shay JW, Werbin H (1992). **New evidence for the insertion of mitochondrial DNA into the human genome: significance for cancer and aging.** *Mut Res*, 275:227-235.
  - Shimokawa I, Higami Y, Yu BP, Masoro EJ, Ikeda T (1996). **Influence of dietary components on occurrence of and mortality due to neoplasms in male F344 rats.** *Aging (Milano)*, 8(4):254-262.

- 
- Sibrian-Vazquez M, Escobedo JO, Lim S, Samoei GK, Strongin RM (2010). **Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 107(2):551-554.
  - Sies H & Cadenas E (1983). **Biological basis of detoxication of oxygen free radicals.** En: *Biological Basis of detoxication.* Caldwell J & Iakoby WB eds. Acad Press San Diego.
  - Sies H (1999). **Glutathione and its role in cellular functions.** *Free Radic Biol Med*; 27:916-921.
  - Sohal RS, Svensson I, Brunk T (1990). **Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species.** *Mech Ageing Dev*; 53:209-215.
  - Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, 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.
  - Sohal RS & Weindruch R (1996). **Oxidative stress, caloric restriction and aging.** *Science*; 273:59-63.
  - Soong NW, Hinton DR, Cortopassi G, Arnheim N (1992). **Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain.** *Nature Genet*; 2:318-323.
  - Speakman JR (2003). **Oxidative phosphorylation, mitochondrial proton cycling, free-radical production and aging.** *Advances in Cell Aging and Gerontology*; 14:35-68.
  - Stadie WC & Haugaard N (1945). **Oxygen poisoning. V. The effect of high oxygen pressure upon enzymes: succin dehydrogenase and cytochrome oxydase.** *J Biol Chem*; 161:175-180.
  - Stadtman ER, Moskovitz J, Levine RL (2003). **Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences.** *Antioxid Redox Signal*; 5(5):577-582.
  - Stefanello FM, Chiarani F, Kurek AG, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT (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(7):651-656.

- 
- Stipanuk MH (2004). **Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine.** *Annu Rev Nutr*, 24:539-577.
  - Strehler BL (1962). **Time, cells ad aging.** *Academic Press*, New York.
  - St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002). **Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain.** *J Biol Chem*, 277:44784-44790.
  - Sun L, Akha AAS, Miler RA, Harper JM (2009). **Life-Span Extension in Mice by Prewaning Food Restriction and by Methionine Restriction in Middle Age.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*; 64A(7):711-722.
  - Suter M, Richter C (1999). **Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases.** *Biochemistry*, 38(1):459-464.
  - Taylor ER, Hurrell F, Shannon RJ, Lin TK, Hirst J, Murphy MP (2003). **Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation.** *J Biol Chem*, 278(22):19603-19610.
  - Tjoe G & Haugaard N (1972). **Oxygen inhibition of cristalline glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and disappearance of enzyme sulfhydryl groups.** *Life Sci*, 11:329-335.
  - Toborek M, Kopieczna-Grzebieniak E, Drózd M, Wieczorek M (1996). **Increased lipid peroxidation and antioxidant activity in methionine-induced hepatitis in rabbits.** *Nutrition*, 12(7-8):534-537.
  - Troen AM, Lutgens E, Smith DE, Rosenberg IH, Selhub J (2003). **The atherogenic effect of excess methionine intake.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 100(25):15089-15094.
  - Troen AM, French EE, Roberts JF, Selhub J, Ordovas JM, Parnell LD, Lai CQ (2007). **Lifespan modification by glucose and methionine in Drosophila melanogaster fed a chemically defined diet.** *Age (Dordr)*; 29(1):29-39.
  - Trumpower BL (1990). **The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc 1 complex.** *J Biol Chem*; 265:11409-11412.

- 
- Turrens JF, Alexandre A, Lahniger AL (1985). **Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria.** *Arch Biochem Biophys*; 237:408-414.
  - Tyagi N, Moshal KS, Sen U, Vacek TP, Kumar M, Hughes WM Jr, Kundu S, Tyagi SC (2009). **H<sub>2</sub>S protects against methionine-induced oxidative stress in brain endothelial cells.** *Antioxid Redox Signal*; 11(1):25-33.
  - Tyler D (1992). **The mitochondrion in health and disease.** VHC Publishers, INC.
  - Vahsen N, Candé C, Brière JJ, Bénil P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schägger H, Rustin P, Kroemer G (2004). **AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation.** *EMBO J*; 23(23):4679-4689.
  - van Sluijters DA, Dubbelhuis PF, Blommaart EF, Meijer AJ (2000). **Amino-acid-dependent signal transduction.** *Biochem J*; 351 Pt 3:545-550.
  - Velez-Carrasco W, Merkel M, Twiss CO, Smith JD (2008). **Dietary methionine effects on plasma homocysteine and HDL metabolism in mice.** *J Nutr Biochem*; 19(6):362-370.
  - Verhoef P, van Vliet T, Olthof MR, Katan MB (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(3):553-558.
  - Vermulst M, Bielas JH, Kujoth GC, Ladiges WC, Rabinovitch PS, Prolla TA, Loeb LA (2007). **Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice.** *Nat Genet*; 39(4):540-543.
  - Vermulst M, Wanagat J, Kujoth GC, Bielas JH, Rabinovitch PS, Prolla TA, Loeb LA (2008). **DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice.** *Nat Genet*; 40(4):392-394.
  - Wanagat J, Cao Z, Pathare P, Aiken JM (2001). **Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting and oxidative damage in sarcopenia.** *FASEB J*; 15:322-332.

- 
- Wang E, Wong A, Cortopassi G (1997). **The rate of mitochondrial mutagenesis is faster in mice than humans.** *Mutation Res*; 377:157-166.
  
  - Weibel ER (2002). **Physiology: the pitfalls of power laws.** *Nature*; 417:131-132.
  
  - Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC (2001). **Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways.** *J Clin Invest*; 107(10):1263-1273.
  
  - Weiss EP, Racette SB, Villareal DT, Fontana L, Steger-May K, Schechtman KB, Klein S, Holloszy JO for the Washington University School of Medicine CALERIE Group (2006). **Improvements in glucose tolerance and insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake: a randomized controlled trial.** *Am J Clin Nutr*; 84(5):1033-1042.
  
  - Witte AV, Fobker M, Gellner R, Knecht S, Flöel A (2009). **Caloric restriction improves memory in elderly humans.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 106(4):1255-1260.
  
  - Witting LA & Horwit MK (1964). **Effect of the degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency induced creatinuria.** *J Nutr*; 82:19-25.
  
  - Yan L, Vatner DE, O'Connor JP, Ivessa A, Ge H, Chen W, Hirotsu S, Ishikawa Y, Sadoshima J, Vatner SF (2007). **Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress.** *Cell*; 130(2):247-258.
  
  - Yokota F, Esashi T, Suzue R (1978). **Nutritional anemia induced by excess methionine in rat and the alleviative effects of glycine on it.** *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*; 24(5):527-533.
  
  - Yoshikawa S, Shinzawa-Itoh K, Tsukihara T (1998). **Crystal structure of bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 angstrom resolution.** *J Bioenerg Biomembr*; 30:7-14.
  
  - Young TA, Cunningham CC, Bailey SM (2002). **Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol.** *Arch Biochem Biophys*; 405:65-72.

- Yu BP (1996). **Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction.** *Free Rad Biol Med*; 21:651-668.
- Zara V, Conte L, Trumpower BL (2009). **Biogenesis of the yeast cytochrome bc(1) complex.** *Biochim Biophys Acta*; 1793:89-96.
- Zeisel SH, Mar MH, Howe JC, Holden JM (2003). **Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods.** *J Nutr*; 133:1302-1307.
- Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N (2003). **Nutritional control of aging.** *Exp Gerontol*; 38(1-2):47-52.