

Lesión oxidativa de proteínas de hígado y corazón de rata durante el proceso de envejecimiento

V. Ayala, E. Vasileva, E. Fernández, M.T. Modol, M.J. Bellmunt, J. Prat, J.R. Requena, M. Portero-Otín y R. Pamplona

Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Universidad de Lleida. Lleida. España.

RESUMEN

Objetivos: el proceso de envejecimiento afecta a todos los organismos y es de suponer que sus mecanismos básicos estén conservados entre especies. La oxidación de proteínas se ha propuesto como uno de estos mecanismos básicos enlazando los radicales derivados del oxígeno con el proceso básico de envejecimiento. Así, si la lesión oxidativa de proteínas está implicada en el envejecimiento, los animales con edades avanzadas deberían presentar valores basales elevados de lesión proteínica en comparación con animales más jóvenes. Sin embargo, la información disponible sobre esta predicción es limitada considerando la utilización de marcadores químicos específicos.

Material y método: en este estudio, la concentración basal de diferentes marcadores de lesión proteínica [oxidación [semialdehídos glutámico y aminoacético], glucosilación [carboximetil-lisina], mixto de gluco y lipoxidación [carboximetil-lisina] y lipoxidación [malondialdehído-lisina]], así como el perfil de ácidos grasos de membrana, han sido determinados en el hígado y corazón de ratas macho adultas jóvenes (8 meses) y edad avanzada (30 meses).

Resultados: los resultados mostraron incrementos significativos de los marcadores de oxidación y glucosilación en el grupo de animales de 30 meses tanto en hígado como en corazón. Con relación a la lesión lipoxidativa, también se detectó un aumento significativo de ésta en el grupo de edad avanzada, probablemente asociado al incremento del índice de dobles enlaces y peroxidabilidad mostrados por las membranas celulares del hígado y corazón. Comparativamente, el corazón mostró grados de lesión oxidativa y lipoxidativa significativamente superiores a los del hígado. Los niveles de lesión glucosilativa fueron superiores en hígado que en corazón. Asimismo, el corazón mostró mayor sensibilidad al envejecimiento, como lo demuestran los mayores incrementos porcentuales en lesión oxidativa, gluco y lipoxidativa.

Conclusiones: estos resultados, en el contexto de la teoría del envejecimiento basada en el estrés oxidativo, además de poner de manifiesto las diferencias existentes entre órganos, refuerzan el papel del grado de insaturación de membrana, así como de los mecanismos homeostáticos que regulan el valor basal de modificación oxidativa en dicho proceso biológico.

Palabras clave

N^ε-(carboximetil)lisina. N^ε-(carboximetil)lisina. Índice de peroxidabilidad. N^ε-(malondialdehído)lisina. Oxidación proteínica. Reacción de Maillard. Semialdehído aminoacético. Semialdehído glutámico.

Protein oxidative damage in rat liver and heart during the ageing process

ABSTRACT

Objectives: ageing affects all organisms and its basic mechanisms can be expected to be conserved across species. Protein oxidation has been proposed as one of the basic mechanisms linking oxygen radicals with the basic ageing process. If oxidative damage to proteins is involved in ageing, aged animals should show higher steady-state levels of specific markers of this kind of damage than younger adult animals. However, the evidence available on this prediction is limited when the use of specific chemical markers is considered.

Material and method: we measured steady-state levels of markers of different kinds of protein damage-oxidation (glutamic and aminoacetic semialdehydes), glycosylation (carboxyethyl-lysine), mixed glyco- and lipoxidation (carboxymethyl-lysine), and lipoxidation (malondialdehydelysine), as well as fatty acid profile in the livers and hearts of young adult (8 months old) and aged (30 months old) male rats.

Results: oxidative and glycoxidative markers were significantly increased in both the liver and heart of aged rats. Lipoxidation damage was also significantly increased in aged rats. This result was probably associated with the significantly increased double bond and peroxidizability indexes found in liver and heart cell membranes. Steady-state levels of oxidation and lipoxidation damage were significantly higher in the heart than in the liver. In contrast, glycosylation damage was greater in the liver than in the heart. Accumulation rates of protein damage were higher in the heart than in the liver during aging.

Conclusions: in the context of the oxidative stress theory of ageing, these results reveal differences between organs and reinforce the role of membrane unsaturation as well as the homeostatic mecha-

Correspondencia: Dr. R. Pamplona.
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. Facultat de Medicina.
Universitat de Lleida.
Montserrat Roig, 2. 25008 Lleida. España.
Correo electrónico: reinald.pamplona@cmb.udl.es.

Recibido el 05-07-05; aceptado el 11-07-05.

Este trabajo ha sido subvencionado parcialmente con fondos del Ministerio de Educación y Ciencia (BFI2003-01287) y la Generalitat de Catalunya (2001SGR00311) a R.P.; y una ayuda del Ministerio de Sanidad (FIS, PI020891) a M.P.

nisms that maintain the steady-state level of protein damage in this biological process.

Key words

N^ε-(carboxyethyl)lysine. N^ε-(carboxymethyl)lysine. Peroxidizability Index. N^ε-(malondialdehyde)lysine. Protein Oxidation. Maillard reaction. Amino adipic Semialdehyde. Glutamic Semialdehyde.

INTRODUCCIÓN

¿Cuáles son los componentes estructurales y los mecanismos fisiológicos que determinan el proceso de envejecimiento? ¿Por qué los humanos podemos alcanzar los 122 años y una rata, en el mejor de los casos, sólo llegar a los 4? La fase posreproductiva de la vida de virtualmente todas las especies multicelulares se caracteriza por la pérdida progresiva de eficiencia de las funciones fisiológicas máximas. En consecuencia, la capacidad para mantener la homeostasis se encuentra atenuada, lo que conlleva, además de un incremento del riesgo de desarrollar cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, a la muerte del individuo. La idea de que las especies moleculares reactivas derivadas del oxígeno (*reactive oxygen species* [ROS]), y especialmente las de origen mitocondrial¹⁻³, están causalmente relacionadas con el proceso básico de envejecimiento representa, hoy por hoy, la teoría con una mayor capacidad explicativa y predictiva de dicho proceso fisiológico⁴⁻⁶. Las evidencias experimentales que nutren esta teoría proceden de varios paradigmas: a) estudios comparativos entre especies animales que difieren en su longevidad máxima y, consecuentemente, en sus tasas de envejecimiento; b) los cambios asociados a la edad que tienen lugar en un individuo durante el envejecimiento, y c) las manipulaciones experimentales, como por ejemplo la restricción calórica y las alteraciones genéticas que modifican la longevidad de una especie dada.

La lesión oxidativa de proteínas se ha propuesto como uno de los mecanismos básicos que enlazan los ROS con el proceso básico de envejecimiento⁷⁻⁹, entendiendo por lesión una modificación química, no enzimática e irreversible. Así, un estado oxidativo elevado debería contribuir a una aceleración de la lesión molecular que conllevaría a una acumulación de la misma con la edad y, en definitiva, al deterioro estructural y funcional del sistema. La lesión oxidativa de proteínas puede ser consecuencia de su exposición directa a especies radicales reactivas (como los ROS)¹⁰; o bien puede proceder de reacciones con compuestos carbonílicos reactivos derivados de la oxidación de aminoácidos, hidratos de carbono o ácidos grasos poliinsaturados, dando lugar a la formación de productos de gluco y lipoxidación avanzada, respectivamente, también conocido globalmente como reacción de Maillard o reacción carbonilo-amino¹¹.

A pesar de que hay evidencias que sugieren la existencia de una acumulación de la lesión oxidativa de proteínas con la edad, dicha conclusión no es inequívoca dada la li-

mitación de datos que utilizan marcadores químicos específicos. Por ello, con el objeto de examinar las características moleculares relacionadas con la lesión oxidativa, hemos utilizado métodos de cromatografía de gases/espectrometría de masas para definir el estado basal de lesión oxidativa proteínica. En el presente estudio, hemos detectado y cuantificado marcadores de diferentes tipos de lesión en las proteínas del hígado y el corazón de ratas macho de animales adultos (8 meses) y de edad avanzada (30 meses). Dichos marcadores caracterizan diversos tipos de lesión: semialdehído glutámico (SAG) y semialdehído amino adipico (SAAA), como indicadores de oxidación *sensu stricto*; N^ε-carboxietil-lisina (CEL), como marcador de gluc oxidación; N^ε-carboximetil-lisina (CML) como marcador mixto de reacciones de gluco y lipoxidación, y N^ε-malondialdehído-lisina (MDAL) como indicador de lipoxidación. También se ha determinado el perfil en ácidos grasos de los lípidos de membrana con el objeto de calcular el índice de insaturación de éstas, ya que puede modular los niveles de lesión proteínica y la longevidad. De hecho, se ha sugerido que el grado de insaturación de las membranas celulares desempeña un papel clave en el envejecimiento, ya que modula la lesión oxidativa y lipoxidativa de las macromoléculas¹². Así, un elevado grado de insaturación de membrana está asociado con un nivel basal de lesión lipoxidativa también elevado^{12,13} y el grado de insaturación correlaciona negativamente con la longevidad máxima de una especie¹⁴.

MATERIAL Y MÉTODO

Reactivos

Los reactivos procedían de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) si no se indica específicamente otra procedencia. [2H₈] lisina fue adquirida de CDN Isotopes (CDN Isotopes Inc., Canadá). CML y [2H₄]-CML, CEL y [2H₄]-CEL, y MDAL y [2H₈]-MDAL se prepararon según métodos descritos previamente¹⁵⁻¹⁷, al igual que SAG y [2H₅]-SAG, y SAAA y [2H₄]-SAAA¹⁸.

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 8 y 30 meses de edad, que correspondían al grupo adulto joven y viejo, respectivamente. Los animales fueron adquiridos a la edad de 3 meses, alimentados *ad libitum* y mantenidos a 22 ± 2 °C bajo un régimen controlado de luz: oscuridad (12:12), una humedad relativa del 55 ± 10% y siguiendo las directrices del comité de ética y experimentación animal. Los animales fueron sacrificados por decapitación, y se les extrajo el hígado y el corazón. Se procedió inmediatamente a obtener una porción de ambos órganos, del lóbulo hepático derecho y las cavidades ventriculares, de todos los animales utilizados en el experimento, y se congelaron inmediatamente a -80 °C. Todas las muestras se obtuvieron *post mortem* en un tiempo inferior a los 3 min.

Preparación de las muestras

Las muestras tanto de hígado como de corazón fueron sumergidas y lavadas inmediatamente en tampón de homogeneización a 4 °C (10 mM Hepes, 1 μ M BHT [2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol], 1 mM DETAPAC [ácido dietileno-triaminopentaacético], 1 mM ácido fítico, 0,5 μ g/ml leupeptina, 0,5 μ g/ml aprotinina, 0,7 μ g/ml pepstatina, 40 μ g/ml PMSF [fluoruro de fenilmetanosulfonio] y 1,1 mM EDTA, ajustado a un pH 7,4). Este primer paso se siguió de la homogeneización en 25 ml de tampón de homogeneización/g de tejido con un sistema tipo Potter-Elvehjem (Glas-Col, Terre Haute, IN). El homogenado fue posteriormente centrifugado a 750 x g durante 5 min a 4 °C para eliminar los restos tisulares. Una alícuota de los sobrenadantes se separó y se utilizó para los diferentes análisis. La concentración de proteína fue determinada mediante el método de Bradford¹⁹ utilizando los reactivos de BioRad (BioRad, Munich, Alemania) y albúmina bovina sérica como estándar. Los homogenados se congelaron inmediatamente a -80 °C para posteriores análisis.

Determinación de SAG, SAAA, CML, CEL y MDAL por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La concentración de SAG, SAAA, CML, CEL y MDAL se determinó en las fracciones de homogenado crudo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como se ha descrito previamente²⁰. Brevemente, las muestras, con un contenido total de 500 μ g de proteína, fueron delipidadas utilizando cloroformo:metanol (2:1 v/v) en presencia de 0,01% de hidroxitolueno butilado, y las proteínas se precipitaron mediante la adición de ácido tricloroacético a una concentración final del 10% (v/v), seguido de centrifugación. Las proteínas precipitadas fueron inmediatamente reducidas durante toda la noche mediante la adición de 1 ml de una disolución de 500 mM de NaBH₄ en 0,2 M tampón borato, pH 9,2, añadiendo una gota de hexanol como agente antiespumoso. Se procedió de nuevo a la precipitación de las proteínas, se añadieron los estándares internos marcados isotópicamente ([²H₈]-lisina, [²H₄]-CML, [²H₄]-CEL, [²H₈]-MDAL, [²H₅]-SAG, y [²H₄]-SAAA) y se procedió a la hidrólisis de las proteínas mediante la adición de 1 ml de 6 M HCl e incubación a 155 °C durante 30 min; posteriormente se procedió al secado de las muestras *in vacuo*. Los derivados N,O-trifluoroacetil metil éster del hidrolizado de proteínas se llevó a cabo como se ha descrito previamente¹⁵. El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890 equipado con una columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) acoplado a un detector de espectrometría de masas Hewlett-Packard modelo 5973A. El puerto de inyección se mantuvo a 275 °C; el programa de temperatura fue de 5 min a 110 °C; después, 2 °C/min hasta 150 °C; 5 °C/min hasta 240 °C; 25 °C/min hasta 300 °C, y una meseta final a 300 °C durante 5 min. La cuantificación se realizó mediante la estandarización externa utilizando curvas de estándares construi-

das a partir de la mezcla de estándares deuterados y no deuterados. La detección y la cuantificación de los diferentes analitos se llevó a cabo mediante la monitorización selectiva de iones específicos. Los iones utilizados fueron: lisina y [²H₈]-lisina, *m/z* 180 y 187, respectivamente; SAG y [²H₅]-SAG, *m/z* 280 y 285, respectivamente; SAAA y [²H₄]-SAAA, *m/z* 294 y 298, respectivamente; CML y [²H₄]-CML, *m/z* 392 y 396, respectivamente; CEL y [²H₄]-CEL, *m/z* 379 y 383, respectivamente, y MDAL y [²H₈]-MDAL, *m/z* 474 y 482, respectivamente. Las concentraciones de los diferentes compuestos se expresaron como el cociente μ mol SAG, SAAA, CML, CEL o MDAL/mol lisina.

Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Para el análisis de los ácidos grasos, se procedió a la extracción de los lípidos totales del homogenado con cloroformo:metanol (2:1, v/v) en presencia de un 0,01% (p/v) de BHT¹². Brevemente, se extrajo la fase de cloroformo y se evaporó en un flujo de nitrógeno, y los ácidos grasos fueron transesterificados mediante su incubación con 2,5 ml al 5% (v/v) de HCl metanólico a 75 °C durante 90 min. Los ésteres metílicos de ácidos grasos resultantes fueron extraídos mediante la adición de 1 ml de una disolución saturada de NaCl y 2,5 ml de n-pentano. La fase de n-pentano se separó y se evaporó con nitrógeno. El residuo se disolvió en 75 μ l de hexano y se utilizó 1 μ l para el análisis. La separación de los diferentes ésteres metílicos de ácidos grasos se efectuó con una columna capilar SP2330 (30 m x 0,25 mm x 0,20 μ m) en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 Series II. Como detector se utilizó un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5973A en el modo de impacto electrónico. El puerto de inyección se mantuvo a 220 °C, y el detector a 250 °C; el programa de temperatura fue de 2 min a 100 °C; después, 10 °C/min hasta 200 °C; 5 °C/min hasta 240 °C, y una meseta final a 240 °C durante 10 min. La identificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos se efectuó previamente mediante la comparación con estándares auténticos y según los espectros de masas. Los resultados se expresan como mol %.

A partir de la composición en ácidos grasos, se procedió al cálculo de los siguientes índices: porcentaje total ácidos grasos saturados (AGS); porcentaje total ácidos grasos insaturados (AGI); porcentaje total ácidos grasos monoinsaturados (AGMI); porcentaje total de ácidos grasos poliinsaturados de las series n-3 y n-6 (AGPI n-3 y n-6); longitud media de cadena (LMC) = $[(\Sigma\% \text{Total}_{14} \times 14) + (\Sigma\% \text{Total}_{16} \times 16) + (\Sigma\% \text{Total}_{18} \times 18) + (\Sigma\% \text{Total}_{20} \times 20) + (\Sigma\% \text{Total}_{22} \times 22)]/100$; índice de dobles enlaces (IDE) = $[(\Sigma \text{mol\% monoenoicos}) + (2 \times \Sigma \text{mol\% dienoicos}) + (3 \times \Sigma \text{mol\% trienoicos}) + (4 \times \Sigma \text{mol\% tetraenoicos}) + (5 \times \Sigma \text{mol\% pentaenoicos}) + (6 \times \Sigma \text{mol\% hexaenoicos})]$, e índice de peroxidabilidad (IP) = $[(0,025 \times \Sigma \text{mol\% monoenoicos}) + (\Sigma \text{mol\% dienoicos}) + (2 \times \Sigma \text{mol\% trienoicos}) + (4 \times \Sigma \text{mol\% tetraenoicos}) + (6 \times \Sigma \text{mol\% pentaenoicos}) + (8 \times \Sigma \text{mol\% hexaenoicos})]$.

TABLA 1. Marcadores de oxidación en proteínas de hígado y corazón de rata de 8 y 30 meses de edad

	8 meses	Hígado 30 meses	p	8 meses	Corazón 30 meses	p
Semialdehído glutámico	1.942 ± 102	2.298 ± 99	0,014	3.304 ± 207	4.470 ± 182	0,006
Semialdehído aminoadéptico	146 ± 5	183 ± 4	0,001	210 ± 10	310 ± 21	0,006

Unidades: $\mu\text{mol/mol}$ lisina.Los valores se expresan como media \pm error estándar para una n = 8 especímenes por grupo.

TABLA 2. Marcadores de glucooxidación y lipoxidación en proteínas de hígado y corazón de rata de 8 y 30 meses de edad

	8 meses	Hígado 30 meses	p	8 meses	Corazón 30 meses	p
N ϵ -carboxietil-lisina	1.006 ± 45	1.211 ± 13	0,005	451 ± 7	542 ± 20	0,005
N ϵ -carboximetil-lisina	1.153 ± 20	1.375 ± 205	0,001	1.204 ± 67	1.652 ± 50	0,002

Unidades: $\mu\text{mol/mol}$ lisina.Los valores se expresan como media \pm error estándar para una n = 8 especímenes por grupo.

Análisis estadístico

Para las diferentes comparaciones se utilizó como prueba estadística la t de Student, que se aplicó una vez la normalidad de la distribución de las variables fue confirmada mediante el estadístico de one-sample Kolmogorov-Smirnov, utilizando el programa SPSS-PC (SPSS, Chicago, IL). En todos los casos se utilizó un valor de $p < 0,05$ como criterio de significación estadística.

estaba asociado con diferencias relevantes en los valores basales de los diversos marcadores de lesión proteínica. Así, los 5 marcadores utilizados mostraron valores significativamente elevados (del orden de un 120-150%) tanto en el hígado como en el corazón en el grupo de ratas viejas comparados con el grupo de animales adultos jóvenes (tablas 1 y 2; figs. 1 y 2). No obstante, los mayores incrementos siempre se observaron en corazón y en la concentración de MDAL.

RESULTADOS

Concentraciones basales de los diferentes marcadores de lesión proteínica

La comparación del hígado y corazón de ratas adultas jóvenes y viejas reveló que el proceso de envejecimiento

En términos de comparación interórgano, los marcadores de oxidación proteínica SAG y SAAA, el marcador de lipoxidación MDAL, y el marcador mixto de gluco y lipoxidación CML, todos ellos mostraron valores significativamente más elevados en corazón que en el hígado, independientemente del grupo de edad (tablas 1 y 2; figs. 1 y 2). Por el contrario, CEL mostró unos valores más elevados en hígado que en corazón.

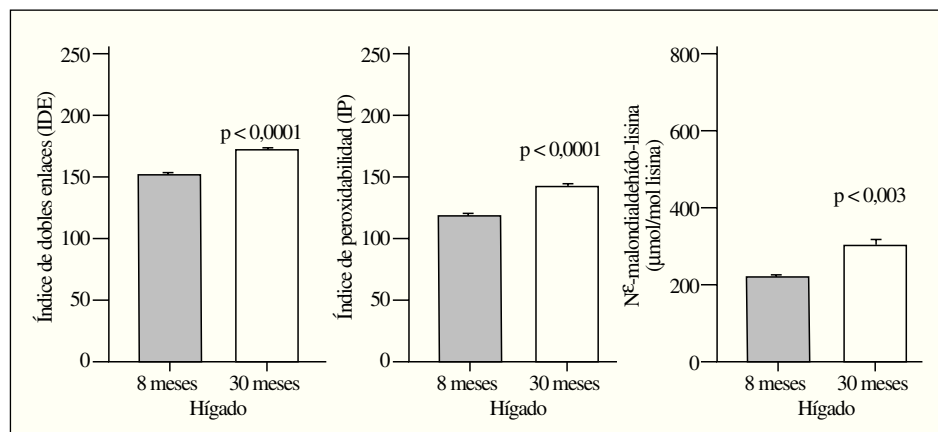


Figura 1. Parámetros del grado de insaturación de membrana (índice de dobles enlaces e índice de peroxidabilidad) y de lesión lipoxidativa a proteínas (MDAL) en el hígado de ratas adultas jóvenes (8 meses) comparado con ratas viejas (30 meses). Se muestran las medias \pm error estándar de la media de 8 individuos por grupo.

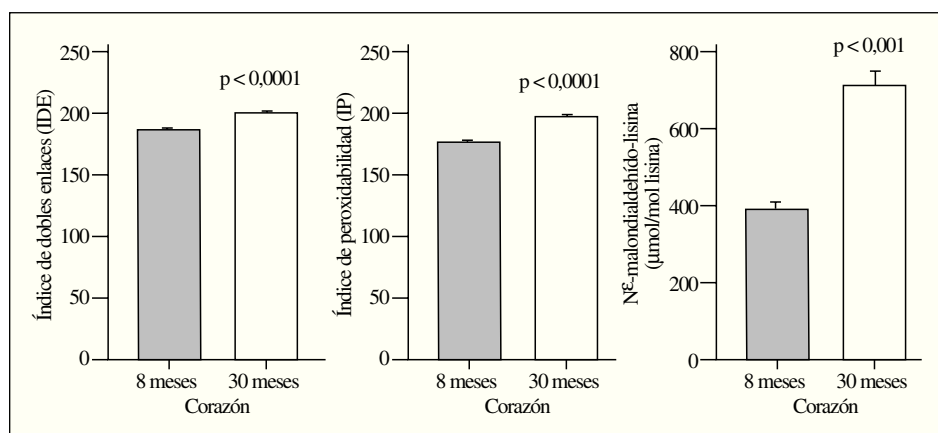


Figura 2. Parámetros del grado de insaturación de membrana (índice de dobles enlaces e índice de peroxidabilidad) y de lesión lipoxidativa a proteínas (MDAL) en corazón de ratas adultas jóvenes (8 meses) comparado con ratas viejas (30 meses). Se muestran las medias \pm error estándar de la media (EEM) de 8 individuos por grupo.

Insaturación de membrana y perfil de ácidos grasos

La composición en ácidos grasos de membrana de los dos órganos estudiados, independientemente de la edad, mostró que sus membranas biológicas mantienen un promedio de longitud de cadena similar (18 átomos de carbono), siendo la proporción global de ácidos grasos saturados e insaturados similar (el 40 frente al 60%, respectivamente). Con la edad se observó, tanto en el hígado como en el corazón, un aumento significativo en el número de dobles enlaces y el índice de peroxidabilidad, asociándose dichos cambios a una redistribución del tipo de ácidos grasos en términos de incrementos especialmente significativo en la proporción de AGPI n-3 (tablas 3 y 4).

DISCUSIÓN

Los ROS de origen mitocondrial pueden contribuir de forma significativa a la lesión de macromoléculas intra y extracelulares; esta producción de ROS es un determinante crítico de la longevidad media y máxima de una especie^{5,6}. Se sabe que los ROS pueden oxidar cualquier tipo de macromolécula, y las proteínas son una diana importante. La lesión oxidativa de las proteínas puede ser consecuencia de la exposición directa a las especies reactivas derivadas del oxígeno, así como del nitrógeno y el cloro, y generar productos de oxidación como los semialdehídos glutámico (resultante de la oxidación de prolina y arginina) y aminoadípico (resultante de la oxidación de lisina), entre muchos otros¹⁰. Las modificaciones proteínicas también pueden proceder de la reacción con compuestos carbonílicos reactivos de bajo peso molecular derivados de la oxidación de aminoácidos, hidratos de carbono o ácidos grasos poliinsaturados. Estos compuestos carbonílicos pueden reaccionar primariamente con cadenas laterales de lisina, arginina y cisteína, y conducir a la formación de compuestos denominados productos de glucación y lipoxidación avanzada (*advanced glycation endproducts* [AGE], y *advanced lipoxidation endproducts*), como CML, CEL y MDAL¹¹.

TABLA 3. Perfil de ácidos grasos (mol %) en lípidos de hígado de rata adulta joven (8 meses) y edad avanzada (30 meses)

	8 meses	30 meses	p
14:00	0,52 \pm 0,02	0,41 \pm 0,06	0,166
16:00	25,16 \pm 0,16	23,66 \pm 0,60	0,053
16:1n-7	2,88 \pm 0,22	3,75 \pm 0,11	0,015
18:00	11,96 \pm 0,65	9,18 \pm 0,15	0,006
18:1n-9	18,79 \pm 0,42	18,99 \pm 0,24	0,692
18:2n-6	19,42 \pm 0,38	18,45 \pm 0,33	0,107
18:3n-3	0,39 \pm 0,06	0,32 \pm 0,03	0,335
20:2n-6	0,23 \pm 0,04	0,23 \pm 0,01	0,911
20:3n-6	0,29 \pm 0,01	0,30 \pm 0,02	0,746
20:4n-6	15,46 \pm 0,12	17,46 \pm 0,11	0,000
20:5n-3	0,19 \pm 0,03	0,19 \pm 0,01	0,935
22:4n-6	0,35 \pm 0,02	0,67 \pm 0,10	0,024
22:5n-6	0,23 \pm 0,03	0,51 \pm 0,11	0,050
22:5n-3	0,59 \pm 0,06	0,61 \pm 0,06	0,804
22:6n-3	3,48 \pm 0,06	5,21 \pm 0,09	0,000
AGS	37,64 \pm 0,54	33,25 \pm 0,67	0,002
AGI	62,35 \pm 0,54	66,74 \pm 0,67	0,002
AGMI	21,67 \pm 0,34	22,75 \pm 0,32	0,063
AGPI	40,67 \pm 0,52	43,99 \pm 0,44	0,003
AGPI n-3	4,67 \pm 0,09	6,34 \pm 0,15	0,000
AGPI n-6	36,00 \pm 0,47	37,64 \pm 0,39	0,037
LCM	17,92 \pm 0,01	18,08 \pm 0,01	0,000

Para detalles véase la sección experimental.

Los valores se expresan como media \pm error estándar para una n = 8 especímenes por grupo.

Sin embargo, continúa siendo un problema no resuelto si la presencia y cantidad de proteínas modificadas oxidativamente desempeña un papel causal en el proceso de envejecimiento o si simplemente refleja un epifenómeno. Si la lesión oxidativa proteínica desempeña un papel mecánico determinante en el proceso de envejecimiento debería mantenerse en los paradigmas experimentales del envejecimiento. Esto es: a) la diferente longevidad má-

TABLA 4. Perfil de ácidos grasos (mol %) en lípidos de corazón de rata adulta joven (8 meses) y edad avanzada (30 meses)

	8 meses	30 meses	p
14:00	0,49 ± 0,03	0,50 ± 0,04	0,906
16:00	17,54 ± 0,42	16,87 ± 0,15	0,187
16:1n-7	0,94 ± 0,05	1,45 ± 0,06	0,001
18:00	22,04 ± 1,02	20,38 ± 0,64	0,221
18:1n-9	12,93 ± 0,59	14,20 ± 1,07	0,338
18:2n-6	14,39 ± 0,25	8,98 ± 0,29	0,000
20:3n-6	0,40 ± 0,04	0,45 ± 0,03	0,419
20:4n-6	22,55 ± 0,33	25,35 ± 0,54	0,005
22:4n-6	0,52 ± 0,04	0,70 ± 0,07	0,074
22:5n-6	0,67 ± 0,13	1,09 ± 0,22	0,161
22:5n-3	0,95 ± 0,09	1,64 ± 0,29	0,067
22:6n-3	6,53 ± 0,07	8,34 ± 0,18	0,000
AGS	40,08 ± 0,60	37,75 ± 0,54	0,028
AGI	59,91 ± 0,60	62,24 ± 0,54	0,028
AGMI	13,87 ± 0,60	15,66 ± 1,06	0,194
AGPI	46,04 ± 0,07	46,57 ± 0,83	0,548
AGPI n-3	7,49 ± 0,12	9,98 ± 0,33	0,000
AGPI n-6	38,55 ± 0,14	36,58 ± 0,75	0,053
LCM	18,41 ± 0,01	18,60 ± 0,01	0,000

Para detalles véase la sección experimental.

Los valores se expresan como media ± error estándar para una n = 8 especímenes por grupo.

xima que caracteriza una especie; b) los cambios que tienen lugar en un individuo durante el envejecimiento; c) las intervenciones fisiológicas/farmacológicas que modulan la velocidad de envejecimiento, como, por ejemplo, la restricción calórica, y d) la diferente longevidad de cepas y mutantes específicos para una determinada especie. El presente estudio se enmarca en el segundo paradigma, es decir, en aquellas evidencias relacionadas con cambios en el grado de lesión proteica con el envejecimiento.

Desde un punto de vista simplista, 2 rutas básicas podrían ser la causa del impacto de los ROS en el envejecimiento: a) las rutas o vías que afectan al flujo neto de ROS en el organismo o en tejidos estratégicos, y b) las vías que contribuyen a la reparación o recambio de aquellas estructuras lesionadas. Con esta premisa, si la teoría del envejecimiento basada en el estrés oxidativo es correcta, una de sus predicciones debería ser que los grados de lesión oxidativa de las macromoléculas deberían aumentar con la edad, y aún más en aquellos tejidos especialmente sensibles al proceso de envejecimiento, como los tejidos posmitóticos. Durante las últimas 4 décadas se han llevado a cabo numerosos estudios utilizando un amplio espectro de organismos (desde invertebrados a humanos) con el objeto de responder si los grados de lesión oxidativa aumentan con la edad^{8,9}. Dado que las proteínas son un componente mayoritario en los sistemas biológicos y desempeñan un papel clave en numerosos procesos ce-

lulares, un aumento relacionado con la edad en los valores de oxidación proteínica es evidente que debería ser importante fisiológicamente para un organismo. Para evaluar esta circunstancia, diversos estudios, así como el presente trabajo, han evaluado los grados de lesión proteínica en diferentes órganos a diferentes edades.

Los niveles de modificación proteínica se han examinado en proteínas extracelulares como el colágeno, así como en proteínas intracelulares de órganos tales como el cerebro, el hígado, el corazón, el riñón y el músculo esquelético, entre otros, tanto de humanos como de roedores y otras especies animales²¹. A pesar de que, globalmente, las evidencias parecen indicar una acumulación con la edad de la lesión oxidativa a proteínas, esta conclusión no es inequívoca. Ello es debido, principalmente, a que la mayoría de dichas evidencias se han obtenido utilizando como marcador el contenido en carbonilos; los datos con marcadores específicos son muy limitados y adolecen de un uso sistematizado y, en algunos casos, ofrecen incluso resultados contradictorios. El problema con la determinación de carbonilos se debe a que dicha determinación representa un amplio rango de modificaciones proteínicas e incluso de otros componentes, incluyendo reacciones mediadas por radicales y reacciones no oxidativas¹⁰. Esto resulta un problema particularmente importante cuando se evalúa la lesión oxidativa a proteínas, puesto que es probable que la lesión de proteínas específicas de rutas metabólicas críticas pudiera ser crucial en términos de las consecuencias fisiológicas derivadas de un aumento de la lesión oxidativa. Por lo tanto, es evidente que se necesitan estudios más sistemáticos con marcadores específicos con el objeto de clarificar las diferencias observadas entre órganos y especies con la edad. En este contexto, nuestro estudio demuestra un aumento con el envejecimiento de marcadores específicos de modificación proteínica relacionados con diferentes modalidades de lesión química como son la lesión oxidativa directa y la modificación química secundaria a la lesión oxidativa de hidratos de carbono y ácidos grasos poliinsaturados. Las diferencias interórgano observadas en la concentración de los diferentes marcadores están relacionadas con diferencias metabólicas (p. ej., tasa de producción mitocondrial de radicales libres, concentración de sustratos glicolíticos y grado de insaturación de los ácidos grasos precursores ambos de compuestos carbonílicos, y tasas de recambio de proteínas lesionadas, entre otros factores) conducentes a diferentes estados prooxidativos. Esto podría explicar las diferencias al alza en las concentraciones basales de diferentes marcadores entre tejidos posmitóticos tales como corazón, cerebro o músculo esquelético, cuando se los compara con órganos como por ejemplo el hígado (posmitótico facultativo).

En resumen, nuestro estudio constata la existencia de un aumento con el envejecimiento de la lesión oxidativa a proteínas y el grado de insaturación de membrana, y que dichos cambios son más significativos en el corazón, como órgano posmitótico. Sin embargo, a pesar de que la

mayoría de estudios, incluidos el presente, indican un aumento con el envejecimiento de la lesión oxidativa a proteínas, estos datos avalan, pero no demuestran, un papel clave para la lesión de proteínas en este proceso. Por tanto, es primordial potenciar investigaciones que comprueben que la modulación de la velocidad de envejecimiento y, consecuentemente, el aumento o la disminución de la longevidad, se asocian o no con una reducción o aumento de la lesión proteinica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Harman D. A theory based on free radical and radical chemistry. *J Gerontol.* 1956;11:298-300.
2. Harman D. The biological clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 1972;20:145-47.
3. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson J. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol.* 1980;15:579-91.
4. Beckman KB, Ames B. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998;78:547-81.
5. Barja G. Free radicals and aging. *Trends in Neurosci.* 2004;27:595-600.
6. Barja G. Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Rev.* 2004;79:235-51.
7. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997;272:20313-16.
8. Sohal RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:37-44.
9. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev.* 2004;125:811-26.
10. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997;324:1-18.
11. Thorpe SR, Baynes JW. Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives. *Amino Acids.* 2003;25:275-81.
12. Pamplona R, Portero-Otin M, Sanz A, Requena J, Barja G. Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exp Gerontol.* 2004;39:725-33.
13. Herrero A, Portero-Otin M, Bellmunt MJ, Pamplona R, Barja G. Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H_2O_2 production and lipid and protein oxidative damage. *Mech Ageing Dev.* 2001;122:427-43.
14. Pamplona R, Barja G. Aging rate, free radical production, and constitutive sensitivity to lipid peroxidation: insights from comparative studies. En: Von Zglinicki T, editor. *Biology of aging and its modulation series.* Vol. 1. Aging at the molecular level. New York: Kluwer Academic Publisher; 2003. p. 47-64.
15. Knecht KJ, Dunn JA, McFarland KF, McCance DR, Lyons TJ, Thorpe SR, et al. Effects of diabetes and aging on N^{ϵ} -(Carboxymethyl)lysine levels in human urine. *Diabetes.* 1991;40:190-6.
16. Ahmed MU, Brinkmann-Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N^{ϵ} -(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J.* 1997;324:565-70.
17. Requena JR, Fu MX, Amed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, et al. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoproteins. *Biochem J.* 1997;322:317-25.
18. Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:69-74.
19. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
20. Pamplona R, Dalfó E, Ayala V, Bellmunt MJ, Prat J, Ferrer I, et al. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycoxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem.* 2005;280:21522-30.
21. Linton S, Davies MJ, Dean RT. Protein oxidation and ageing. *Exp Gerontol.* 2001;36:1503-18.