

Efecto del peróxido de hidrógeno en la producción mitocondrial de radicales libres en relación con el envejecimiento*

A. Sanz-Montero, R. Gredilla, A. Herrero y G. Barja de Quiroga

Departamento de Fisiología. Fisiología Animal II. Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. España.

RESUMEN

Objetivos: el objetivo del presente estudio fue determinar si las mitocondrias dañadas oxidativamente, con un control respiratorio disminuido, producen más radicales libres que en condiciones normales. Esto es importante en relación con propuestas actuales sobre la teoría mitocondrial de envejecimiento por radicales libres.

Material y método: las mitocondrias fueron expuestas *in vitro* a un generador artificial de radicales libres. Se valoró el consumo de oxígeno mitocondrial en reposo (estado 4, sin ADP) y en estado activo (estado 3, con ADP). A partir de estos dos parámetros se obtuvo el valor del control respiratorio, que nos indica el grado de funcionalidad de las mitocondrias. Paralelamente, se midió la producción de H_2O_2 en la misma suspensión mitocondrial.

Resultados: el complejo I se vio más afectado por el daño inducido por radicales libres que los complejos II/III. Sin embargo, no se detectaron cambios estadísticamente significativos en la producción de especies reactivas del oxígeno en ninguno de los complejos respiratorios estudiados.

Conclusiones: los presentes resultados sugieren que las mitocondrias dañadas oxidativamente no tienen por qué producir necesariamente más radicales libres. Por tanto, la teoría del círculo vicioso de producción de radicales libres en relación con envejecimiento no es necesariamente cierta.

Palabras clave

Envejecimiento. Mitocondria. Radicales libres. Peróxido de hidrógeno. Complejo I.

Effect of hydrogen peroxide on mitochondrial free radical production in relation to ageing

ABSTRACT

Objectives: to ascertain whether oxidatively damaged mitochondria, showing a decreased respiratory control index, produce more free radicals than non-stressed mitochondria. This is relevant in relation to present models of the mitochondrial free radical theory of ageing.

Material and method: mitochondria were exposed *in vitro* to an artificial free radical generator. Oxygen consumption at rest (state 4, without adenosine 5'-diphosphate [ADP]) and under active phosphorylation (state 3, with ADP) was measured and the respiratory control ratio was calculated indicating the degree of functionality of the mitochondria. In the same mitochondria H_2O_2 production was measured in parallel.

Results: complex I was more affected than complex II/III by free radical-induced damage. However, mitochondrial production of reactive oxygen species remained unchanged in all the respiratory complexes.

Conclusions: the present results suggest that oxidatively damaged mitochondria do not necessarily increase their rate of free radical generation. Thus, the vicious circle theory of mitochondrial free radical generation in relation to ageing is not necessarily true.

Key words

Ageing. Mitochondria. Free radicals. Hydrogen peroxide. Complex I.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la teoría de envejecimiento por radicales libres es la que cuenta con un mayor número de apoyos entre la comunidad científica. Esta teoría, enunciada inicialmente por Denham Harman en 1956 y 1972^{1,2}, propone que el envejecimiento se debe al efecto dañino de los radicales libres de origen mitocondrial y que la propia mitocondria es la diana principal del daño oxidativo. La teoría se extendió posteriormente al papel protagonista del daño oxidativo en los tejidos posmitóticos³. Según la versión actual de la teoría, la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial es la causa principal del envejecimiento⁴.

Financiado con el proyecto SAF2002-01635 del Ministerio de Ciencia y Tecnología. Ricardo Gredilla y Alberto Sanz contaron durante la realización de este trabajo con una beca de la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid y de la Universidad Complutense de Madrid, respectivamente.

*Premio de Investigación Salgado Alba 2003.

Correspondencia: Dr. G. Barja de Quiroga.
Departamento de Fisiología. Fisiología Animal II.
Universidad Complutense.
José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid. España.
Correo electrónico: gbarja@bio.ucm.es

Recibido el 18-12-03; aceptado el 26-01-04.

Hoy por hoy se acepta que existe una acumulación en el daño que sufre la mitocondria con el envejecimiento que se manifiesta en la acumulación de mutaciones⁵. Sin embargo, se discute si se produce o no un incremento en la producción de radicales libres mitocondriales con la edad. Trabajos recientes de nuestro grupo y de otros no han encontrado tal incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) ni en el corazón^{6,7} ni en músculo esquelético⁸, aunque sí ha sido descrito por otros grupos^{9,10}.

La teoría del círculo vicioso propone que los radicales libres mitocondriales dañan el ADN de este orgánulo, lo cual provoca la síntesis de proteínas anómalas que aumentan, a su vez, la producción de radicales libres al incorporarse a los complejos de la cadena respiratoria y, con ello, de nuevo elevan el daño al ADN. De esta manera, se originaría un círculo vicioso en el que el aumento de daño al ADN provocaría una mayor producción de radicales libres. A pesar de la extendida aceptación de esta idea, que con frecuencia se asume como cierta, no existen trabajos publicados que la hayan puesto a prueba de manera experimental. De hecho, la mutación de un gen mitocondrial no implica necesariamente un incremento en la producción de ROS, sino que, en función del gen o genes alterados, la producción puede aumentar o disminuir¹¹.

Para comprobar si las mitocondrias producen más o menos radicales libres cuando están funcionalmente alteradas por estrés oxidativo, planteamos el presente experimento. En este trabajo se expusieron mitocondrias funcionales, aisladas de corazón de rata, a un sistema de generación de ROS *in vitro*. A continuación se midió el grado de afección funcional de las mitocondrias, así como su intensidad de producción de ROS. Los resultados obtenidos se discuten en relación con la hipótesis del círculo vicioso.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales de experimentación

En el presente trabajo se utilizaron ratas Wistar macho de 4 meses de edad alimentadas *ad libitum* y mantenidas a 22 ± 2 °C bajo un régimen controlado de luz:oscuridad (12:12), una humedad relativa del $55 \pm 10\%$ y siguiendo la normativa de la Universidad Complutense sobre cuidado de animales.

Aislamiento mitocondrial

Los animales fueron sacrificados por decapitación, y se les extrajo el corazón inmediatamente para la extracción de mitocondrias, según la técnica de Mela y Seitz¹² con modificaciones. Brevemente, los ventrículos del corazón fueron troceados homogeneizados primero con un émbolo flojo en 10 ml de medio de aislamiento (220

mmol/l de manitol, 70 mmol/l de sacarosa, 1 mmol/l de EDTA, 10 mmol/l de Tris-HCl, pH 7,4) que contenía 5 mg de proteasa y 25 mg de albúmina sin ácidos grasos. Tras 1 min de incubación, se añadieron 25 ml de medio de aislamiento con 25 mg de albúmina y se procedió a una nueva homogenización con un émbolo ajustado. Los núcleos celulares se eliminaron mediante centrifugación (700 g 10 min). Con posterioridad, el sobrenadante se centrifugó dos veces a 8.000 g durante 10 min. Finalmente, las mitocondrias se resuspendieron en 1 ml de medio de aislamiento. Todas las centrifugaciones se realizaron en frío (4 °C).

Incubación de las mitocondrias con el generador de radicales libres

Las mitocondrias se incubaron durante 10 min a 25 °C en un volumen total de 2,8 ml de medio de incubación (145 mmol/l del KCl, 30 mmol/l de Hepes, 5 mmol/l de KH₂PO₄, 3 mmol/l de MgCl₂, 0,1 mmol/l de EGTA, 0,1% de albúmina, pH 7,4) en presencia de FeSO₄ y H₂O₂. Para el estudio del efecto del daño oxidativo sobre la función mitocondrial se emplearon diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (30, 70 y 100 mol/l) y una concentración constante de FeSO₄ (150 mol/l). Asimismo, se contó con un grupo control en cuyo medio de incubación no hubo ni peróxido de hidrógeno ni sulfato férrico. Tras la incubación, se añadieron a las muestras 15 ml de medio de aislamiento y se centrifugaron 10 min a 8.000 g. El pellet mitocondrial final se resuspendió en 0,3 ml de medio de aislamiento. Tanto el consumo de oxígeno como la producción de ROS de las mitocondrias fueron valorados en la misma resuspensión mitocondrial según el método fluorométrico de Barja¹³.

Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno mitocondrial se midió a 37 °C mediante un electrodo de oxígeno tipo Clark controlado por ordenador. Se valoraron el estado 4 (consumo de oxígeno en estado no fosforilante) y el estado 3 (consumo de oxígeno en estado fosforilante) con la adición de 500 mol/l de ADP. Posteriormente se calculó la razón de control respiratorio (RCR) como medida de acoplamiento mitocondrial. Este parámetro indica si las mitocondrias se encuentran o no en un buen estado funcional.

Producción de especies reactivas del oxígeno

La medida de la tasa de producción de H₂O₂ se valoró midiendo el incremento en la fluorescencia (excitación a 312 nm, emisión a 420 nm) debido a la oxidación del ácido homovanílico por H₂O₂ en presencia de peroxidasa de rábano. Las condiciones de incubación fueron 0,25 mg de proteína mitocondrial por ml, 6 U/ml de peroxidasa de rábano, 0,1 mmol/l de ácido homovanílico y 50 U/ml de SOD. Se utilizaron 2,5 mmol/l de piruvato, 2,5 mmol/l de malato o 5 mmol/l de succinato más 0,2 mol/l de rotenona como sustratos en el medio de incu-

bación (145 mmol/l de KCl, 30 mmol/l de Hepes, 5 mmol/l de KH_2PO_4 , 3 mmol/l de MgCl_2 , 0,1 mmol/l de EGTA, 0,1% de albúmina, pH 7,4). Dicha incubación se desarrolló durante 15 min a 37 °C. Todos los ensayos con succinato se realizaron en presencia de rotenona para evitar el flujo inverso de electrones desde el complejo II al complejo I. La incubación se detuvo mediante frío y la adición a las muestras de 0,5 ml de glicina-NaOH 0,1 mmol/l (pH 12) con 25 mmol/l de EDTA. La fluorescencia se leyó en un fluorímetro Perkin-Elmer LS50B a un volumen final de 2 ml. La cantidad de peróxido de hidrógeno producido por las mitocondrias se calculó a partir de una curva patrón en la que la glucosa oxidada genera peróxido de hidrógeno al oxidar glucosa.

El consumo de oxígeno y la producción de peróxido de hidrógeno mitocondriales se midieron en las mismas preparaciones mitocondriales, lo que permitió el cálculo del porcentaje de electrones que escapan de la cadena respiratoria (la fuga de radicales libres [FRL], *free radical leak* en inglés¹⁴). Para reducir 1 mol de oxígeno a peróxido de hidrógeno se necesitan 2 electrones, mientras que hacen falta 4 electrones para la reducción de 1 mol de oxígeno a agua. La FRL se calculó dividiendo la intensidad de producción de H_2O_2 por el doble del consumo de oxígeno, y el resultado se multiplicó por 100.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante un análisis de la varianza de una vía. Se utilizó el test de Fisher de comparaciones múltiples para analizar las diferencias entre los distintos grupos tratados con respecto al grupo control. En todos los casos se utilizó un valor de $p < 0,05$ como criterio de significación estadística.

RESULTADOS

Consumo de oxígeno

No se encontraron diferencias (tabla 1) en el consumo de oxígeno en estado 4 entre los distintos grupos experi-

mentales ni con piruvato/malato ($F = 1,56$; $p > 0,05$) ni con succinato ($F = 1,29$; $p > 0,05$) como sustrato. En el estado 3 se observaron diferencias significativas (tabla 1) entre los grupos cuando se utilizó piruvato/malato ($F = 4,15$; $p < 0,05$) como sustrato, aunque no con succinato ($F = 0,8$; $p > 0,05$). Así, el consumo de oxígeno en estado 3 (con piruvato/malato) disminuyó a medida que aumentaba la concentración de peróxido de hidrógeno, alcanzándose la máxima inhibición (33%) con la máxima concentración de peróxido de hidrógeno empleada (100 mol/l).

Estos resultados se reflejaron (fig. 1) en el índice de control respiratorio (RCR), que disminuyó significativamente cuando se utilizó piruvato/malato ($F = 6,91$; $p < 0,001$), pero no cuando se empleó succinato ($F = 0,15$; $p > 0,05$). Este índice es un parámetro funcional que indica el estado de acoplamiento mitocondrial. El descenso en el RCR con piruvato/malato se debió a la disminución del consumo de oxígeno en estado 3, ya que el estado 4 no se modificó con el peróxido de hidrógeno.

Producción de ROS

No se encontraron diferencias significativas (Tabla 2) en la producción de ROS con sustratos del complejo I ($F = 0,58$; $p > 0,05$) ni con sustratos del complejo II ($F = 0,34$; $p > 0,05$). Tampoco se detectaron diferencias en la fuga de radicales libres (fig. 2) con piruvato/malato ($F = 0,24$; $p > 0,05$) ni con succinato ($F = 1,14$; $p > 0,05$).

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que la exposición a peróxido de hidrógeno y sulfato férrico puede dañar las mitocondrias. Esta exposición provoca una pérdida de capacidad funcional que se refleja en el menor RCR de los grupos tratados, como consecuencia de una reducción en el consumo de oxígeno durante el estado 3. El descenso del estado 3 nos indica que las mitocondrias pierden capacidad de síntesis de ATP, fenómeno que, precisamente, ocurre en este estado.

TABLA 1. Consumo de oxígeno (nmol de $\text{O}_2/\text{min mg}$ de proteína) de mitocondrias de corazón de rata expuestas a diferentes concentraciones de H_2O_2 y SO_4Fe y suplementadas con piruvato/malato o succinato. Se muestran medidas en estado 4 (EST 4) y en estado 3 (EST 3)

	Control		30 mol/l		70 mol/l		100 mol/l	
	EST 4	EST 3	EST 4	EST 3	EST 4	EST 3	EST 4	EST 3
Pyr/mal	15,9 ± 0,8	80,4 ± 4,7	18,9 ± 1,5	74,2 ± 6,2	19,5 ± 2,3	59,5 ± 6^a	21,1 ± 2,2	54,3 ± 7,5^a
Succinato	47,4 ± 5,5	100 ± 11,2	42,9 ± 2,1	85,5 ± 8,2	43,4 ± 2,8	88,7 ± 11,6	37,3 ± 2,1	79,0 ± 5,0

^aDiferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Se muestra la media ± error estándar de la media (EEM) de entre 9 y 13 animales por grupo.

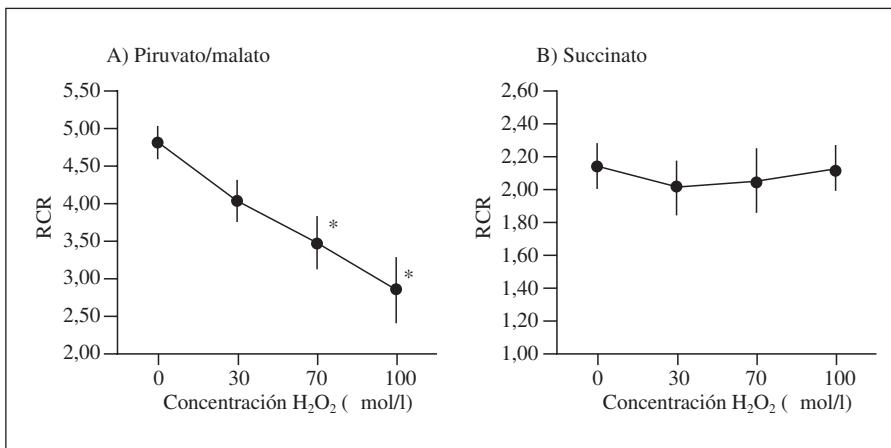


Figura 1. Efecto de la generación artificial de radicales libres ($H_2O_2 + FeSO_4$) en la razón de control respiratorio (RCR) de las mitocondrias del corazón de rata. A: piruvato/malato como sustrato; B: succinato como sustrato. Se muestran las medias ± error estándar de la media (EEM) de entre 9 y 13 individuos por grupo. *Diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,001$).

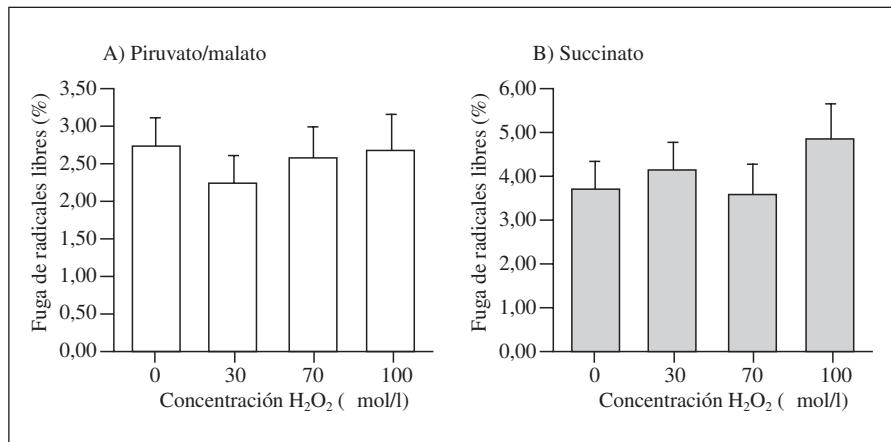


Figura 2. Efecto de la generación de radicales libres ($H_2O_2 + FeSO_4$) en la fuga de radicales libres (%) en las mitocondrias del corazón de rata. A: piruvato/malato como sustrato; B: succinato como sustrato. Se muestran las medias ± error estándar de la media (EEM) de entre 9 y 13 individuos por grupo. La fuga de radicales es el porcentaje de electrones que escapan de la cadena respiratoria.

El descenso en el consumo de oxígeno en estado 3 se dio solamente con piruvato/malato (sustrato del complejo I) y no con succinato (sustrato del complejo II), lo que indica la mayor sensibilidad del complejo I. Esto coincide con otros trabajos, que señalan igualmente al complejo I como más sensible al daño oxidativo en distintos modelos experimentales¹⁵⁻¹⁷. Asimismo, el complejo I parece ser más sensible que el resto de los componentes de la cadena electrónica mitocondrial durante el envejecimiento no patológico¹⁸.

La mayor sensibilidad del complejo I es especialmente significativa si consideramos que en este complejo es

donde se han identificado las diferencias en la producción de ROS entre especies animales de distinta longevidad¹⁹ y el descenso en la producción de ROS asociado a la restricción calórica^{6,20}. Todo ello apunta a un papel fundamental del complejo I, tanto en la producción de ROS como en la determinación de la velocidad de envejecimiento.

En la actualidad no existe un consenso claro acerca de si las mitocondrias de los individuos ancianos producen más^{9,10} radicales libres o no⁶⁻⁸ que las de los jóvenes. Nuestro estudio demuestra que una respiración mitocondrial deficiente debida al daño oxidativo no conlleva ne-

TABLA 2. Producción de H_2O_2 (nmol de H_2O_2 / min mg de proteína) de mitocondrias de corazón de rata expuestas a diferentes concentraciones de H_2O_2 y $FeSO_4$ y suplementadas con piruvato/malato o succinato. Se muestran medidas en estado 4 y en estado 3

	Control	H_2O_2		
		30 mol/l	70 mol/l	100 mol/l
Piruvato/malato	0,81 ± 0,1	0,77 ± 0,1	0,89 ± 0,1	0,97 ± 0,1
Succinato	3,35 ± 0,3	3,48 ± 0,4	3,07 ± 0,3	3,52 ± 0,4

Se muestra la media ± error estándar de la media (EEM) de entre 9 y 13 animales por grupo.

cesariamente un incremento en la producción total o en la fuga de radicales libres. Por tanto, los presentes resultados son especialmente relevantes, al poner en duda la veracidad de la teoría del círculo vicioso. Dicha teoría establece que la producción de ROS por la cadena de transporte electrónico daña el ADN mitocondrial provocando la síntesis anómala de las proteínas codificadas por éste. Cuando estas proteínas se ensamblan, se produciría una mayor generación de ROS y un mayor daño al ADN, proceso que se repite sucesivamente.

Algunos grupos¹⁷ han descrito incrementos en la producción de ROS tras la incubación de mitocondrias con distintos compuestos químicos generadores de estrés oxidativo (tert-butilhidroperóxido, ADP-Fe/ascorbato, diamida, etc.). Aunque estas sustancias parecen incrementar la producción de ROS por la cadena de transporte electrónico, su utilización puede cuestionarse, puesto que es difícil imaginar su presencia en el metabolismo celular normal. Desde esta perspectiva, la utilización de peróxido de hidrógeno y de sulfato férrico parece un modelo más próximo a la fisiología celular real. El peróxido de hidrógeno es capaz de atravesar la doble membrana mitocondrial como demuestra su capacidad para inhibir enzimas de la matriz²¹ (aconitasa y alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, entre otras) con concentraciones parecidas a las utilizadas en este estudio. Además, la presencia de un metal de transición como el hierro facilita la aparición de otras especies reactivas del oxígeno más «eficaces» a la hora de generar daño oxidativo, como son el superoxido o el radical hidroxilo. Por otra parte, sustancias como el cumeno o el tert-butilhidroperóxido pueden afectar de forma no deseada al metabolismo celular alterando, por ejemplo, los niveles de glutatión. Así, el incremento en la producción de ROS en el complejo I en presencia de tert-butilhidroperóxido se debe a una glutationación reversible del complejo y no a un daño irreparable en éste¹⁷. De hecho, se sabe que la oxidación del pool de glutatión mitocondrial aumenta el estrés oxidativo que sufre el ADN²².

Otro de los problemas que presenta la teoría del círculo vicioso es la presunción de un incremento en la producción de ROS por todo tipo de mutaciones. Esto dista mucho de ser cierto y, en función del gen afectado, se produce un aumento, una disminución o una falta de alteración en la producción²³. Así, por ejemplo, las mutaciones en genes de la ATP-asa incrementarán la producción de ROS²⁴ (al aumentar el gradiente protónico), mientras que al inicio del complejo I provocarán un descenso al disminuir tanto el gradiente protónico como el paso de electrones por el complejo¹¹. ¿Puede, por tanto, interpretarse la mayor sensibilidad al daño oxidativo del complejo I como una estrategia que impide el incremento de ROS en las mitocondrias dañadas? A la luz de los datos disponibles se puede pensar que sí. Esto explicaría por qué en el ADN mitocondrial han permanecido tantos genes que codifican para el complejo I, por qué el control de la regulación de la respiración mitocondrial re-

cae en él²⁵ y por qué parece desempeñar un papel determinante en el envejecimiento⁴. Dañar preferentemente el complejo I impide que la célula entre en apoptosis²¹ o necrosis²⁶ por una cascada incontrolada de radicales libres.

Precisamente, la propia naturaleza de las mutaciones encontradas en los individuos añosos desmiente la teoría del círculo vicioso¹¹. En estas mitocondrias es frecuente encontrar un único tipo de mutación⁵. Si las mitocondrias vieran su producción continuamente incrementada, como predice la teoría del círculo vicioso, lo que debería observarse sería una mezcla de diferentes mutaciones o delecciones en la misma célula. Sin embargo, si la mitocondria con el ADN mutado dejara de producir ROS, «se camuflaría» y se dedicaría a producir copias de su propio ADN mutado. El fenotipo que se observaría coincidiría bastante con el descrito⁵. Los datos del presente estudio no prueban que las mitocondrias con la cadena mitocondrial alterada en el complejo I produzcan menos ROS, pero desmienten que produzcan más, como dice la teoría del círculo vicioso.

En resumen, las mitocondrias con la cadena respiratoria alterada por estrés oxidativo no parecen producir más radicales libres, al menos, cuando se valora *in vitro*. Esto nos hace rechazar la teoría del círculo vicioso. Además, una producción constante, no incrementada, de especies reactivas del oxígeno está más de acuerdo con una de las reglas del envejecimiento dadas por Strehler²⁷, su carácter progresivo, y con el patrón de mutaciones en el ADN mitocondrial encontrado en individuos viejos¹¹. Así, para explicar el envejecimiento no es necesario un incremento en la producción de radicales libres mitocondriales con la edad, puesto que una producción constante es suficiente para asegurar la acumulación de un daño que conduzca a él. En este sentido, las investigaciones de nuestro laboratorio demuestran que la producción de ROS y el daño al ADN mitocondrial no se incrementan con la edad, ni en el corazón⁶ ni en el músculo⁸ ni en el cerebro (datos no publicados), tejidos posmitóticos claves en el envejecimiento.

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;20:99-117.
3. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson J. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980;15:579-91.
4. Barja B. Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Rev* 2003;78:1-17.
5. Kraysberg Y, Nekhaeva E, Bodyak NB, Khrapko K. Mutation and intracellular clonal expansion of mitochondrial genomes: two synergistic components of the aging process? *Mech Ageing Dev* 2003;124:49-53.
6. Gredilla R, Sanz A, López-Torres M, Barja G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J* 2001;15:1-3.

7. Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H_2O_2 formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr* 1997;29:89-95.
8. Drev B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, et al. Effect of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284:R474-80.
9. Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lai H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev* 1994;74:121-33.
10. Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ. Aging defect at the Qo site of complex III augments oxyradical production in rat heart interfibrillar mitochondria. *Arch Bioch Biophys* 2003; 414:59-66.
11. De Grey ADNJ. Mechanism underlying the age-related accumulation of mutant mitochondrial DNA: a critical review. En: Holt IJ, editor. *Genetics of mitochondrial diseases [en prensa]*. Oxford: Oxford University Press, 2003.
12. Melo L, Seitz S. Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue. *Methods Enzymol* 1979;55:39-46.
13. Barja G. The quantitative measurement of H_2O_2 generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2002;34:227-33.
14. Barja G. 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* 1999;31:347-366.
15. Jha N, Jurma O, Lalli G, Liu Y, Pettus EH, Greenmyre JT, et al. Glutathione depletion in PC12 results in selective inhibition of mitochondrial complex I activity. Implications for Parkinson's disease. *J Biol Chem* 2001;275: 26096-101.
16. Seims NR, Anderson MF, Hobbs LM, Kong JY, Phillips S, Powell J, et al. Impairment of brain mitochondrial function by hydrogen peroxide. *Mol Brain Res* 2000;77:176-84.
17. Taylor ER, Hurrell F, Shannon RJ, Lin TK, Hirst J, Murphy MP. Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *J Biol Chem* 2003;278:19603-10
18. Navarro A, Sánchez del Pino MJ, Gómez C, Peralta JL, Boveris A. Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2002;282:R985-92.
19. Herrero A, Barja G. Sites and mechanism responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev* 1997;98:95-111.
20. Lopez-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2002;32:1055-64.
21. Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJA. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATP-asa. *J. Biol Chem apoptosis: studies in vivo and in vitro*. *FASEB J* 1999; 13:1055-64.
22. Esteve JM, Mompo J, García de la Asuncion J, Sastre J, Asensi M, Boix J et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J* 1999;13:1055-64.
23. James AM, Murphy MP. How mitochondrial damage affects cell function. *J Biomed Sci* 12002;9:475-87.
24. Geromel V, Kadhom N, Ceballos-Picot I, Ouari O, Polidori A, et al. Superoxide induced massive apoptosis in cultured skin fibroblasts harboring the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) mutation in the ATPase-6 gene of the mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet* 2001; 10:1221-88.
25. Ventura B, Genova ML, Bovina C, Formiggini G, Lenaz G. Control of oxidative phosphorylation by complex I in rat liver mitochondria: implication for aging. *Bioch Biophys Acta* 2002;1553:249-60.
26. Atlante A, Bobba A, Calissano P, Marra E. The apoptosis/necrosis transition in cerebellar granule cells depends on the mutual relationship of the antioxidant and the proteolytic systems which regulate ROS production and cytochrome c release en route to death. *J Neurochem* 2003;84:960-71.
27. Strehler BL. Time, cells and aging. New York: Academic Press, 1962; p. 1-456.