

La restricción de metionina en la dieta disminuye el estrés oxidativo en mitocondrias de corazón

Pilar Caro, Alberto Sanz, José Gómez y Gustavo Barja

Departamento de Fisiología Animal-II. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid. España.

RESUMEN

Introducción: la restricción calórica (RC) disminuye la producción mitocondrial de radicales libres (MitROS) y el daño oxidativo al ADN mitocondrial (ADNmt) y aumenta la longevidad máxima, pero no se conocen los mecanismos implicados. Hemos encontrado que la restricción de proteínas (RP) también produce esos cambios. Varios hallazgos relacionan a la metionina con el envejecimiento, y la restricción de metionina (RMet) también aumenta, como la RC y la RP, la longevidad máxima. Hemos hipotetizado, por tanto, que la RMet es la causa del descenso en producción de MitROS y estrés oxidativo que ocurre en la RP y la RC.

Material y métodos: ratas Wistar macho sometidas a RMet o alimentadas ad libitum durante 7 semanas. Se aislaron mitocondrias funcionales de corazón por centrifugación. La respiración mitocondrial se midió por polarografía con electrodo de Clark y la producción de MitROS por fluorometría. El daño oxidativo al ADNmt (8-oxodG) se midió por HPLC con detección electroquímica.

Resultados: la RMet disminuyó la producción mitocondrial de ROS en el complejo I, no cambió el consumo de oxígeno mitocondrial y disminuyó los valores de la 8-oxodG en el ADNmt.

Conclusiones: los cambios observados en la producción de MitROS y la 8-oxodG durante la RMet son iguales a los observados previamente en la RC y la RP. Esto sugiere que el descenso en la ingestión de metionina es la causa del descenso en la generación de ROS y estrés oxidativo mitocondrial y de parte del descenso de velocidad del envejecimiento que ocurre durante la restricción calórica. La restricción proteica (o de metionina) ofrece por primera vez una intervención aplicable a las poblaciones occidentales, incluida la española, que es potencialmente capaz de retrasar en aproximadamente un 20% la velocidad del proceso endógeno del envejecimiento y de todas las enfermedades degenerativas asociadas a él sin necesidad de disminuir en nada la ingesta calórica.

Este trabajo se realizó con el apoyo del proyecto del Plan Nacional BFU2005-02584 del Ministerio de Educación y Ciencia concedido a G. Barja.

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

Recibido el 6-07-06; aceptado el 5-10-06.

Palabras clave

Mitocondrias. Restricción calórica. Radicales libres. Envejecimiento. Daño al ADN.

Methionine dietary restriction decreases oxidative stress in heart mitochondria

ABSTRACT

Introduction: caloric restriction (CR) decreases the production of mitochondrial reactive oxygen species (MitROS) and oxidative damage to mitochondrial DNA (mtDNA) and increases maximum longevity, but the mechanisms responsible for these effects are unknown. We have found that protein restriction (PR) also produces these changes. Various findings link methionine to ageing; moreover, like CR, methionine restriction (MetR) increases maximum longevity. We hypothesized that MetR is responsible for the decrease in MitROS generation and oxidative stress that takes place in PR and CR.

Material and methods: male Wistar rats were subjected to methionine restriction or fed ad libitum for 7 weeks. Functional heart mitochondria were isolated by centrifugation. Mitochondrial respiration was measured by polarography with a Clark electrode and MitROS production was assayed by fluorometry. Oxidative damage to mtDNA (8-oxodG) was measured by HPLC with electrochemical detection.

Results: MetR decreased MitROS generation at complex I, did not change mitochondrial oxygen consumption, and decreased 8-oxodG levels in mtDNA.

Conclusions: the changes induced by MetR in the rate of MitROS generation and 8-oxodG are similar to those previously observed in CR and PR. This suggests that the reduction in methionine ingestion is responsible for the decrease in mitROS production and oxidative stress and part of the decrease in the rate of ageing that occurs during caloric restriction. Protein (and methionine) restriction provide the first possibility of an intervention that could be applied to western populations, including the Spanish population. This type of intervention could potentially delay the rate of ageing by approximately 20% and could decrease the incidence of all degenerative diseases without the need to reduce dietary caloric intake.

Key words

Mitochondria. Caloric restriction. Free radicals. Ageing. DNA damage.

INTRODUCCIÓN

Multitud de estudios apoyan actualmente la teoría de envejecimiento mitocondrial por radicales libres^{1,2}, con la implicación especial de la intensidad de producción mitocondrial de especies reactivas derivadas del oxígeno (MitROS). Se sabe que la producción de MitROS es menor en las especies animales longevas que en las de vida corta, así como en los animales sometidos a restricción calórica (RC) frente a los alimentados *ad libitum*^{2,3}. El daño oxidativo a macromoléculas, incluido el ADN mitocondrial (ADNmt), es también menor en las especies longevas y en los animales restringidos^{2,4,5}.

Sin embargo, no se sabe cuál es el factor dietético que causa el descenso en estrés oxidativo mitocondrial durante la RC. Estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que ni la restricción de hidratos de carbono⁶, ni la restricción de lípidos⁷ cambian la producción de MitROS, pero la restricción de proteínas (RP) sí la disminuye⁸. Este descenso es independiente de la ingestión de calorías, pero el componente proteico implicado no se conoce. El descenso en producción de MitROS ocurre específicamente en el complejo I de la cadena respiratoria, disminuye la fuga porcentual de radicales libres (FRL) y disminuye el daño oxidativo al ADNmt⁸. Todos estos cambios ocurren con una magnitud similar en la RC. Esto sugiere que la disminución de la ingesta de proteínas es la causa de los descensos en producción de ROS y estrés oxidativo mitocondrial que ocurren durante la RC. Esto estaría de acuerdo con estudios recientes que cuestionan el consenso clásico que liga los efectos beneficiosos de la RC a las calorías en sí mismas, en vez de a componentes específicos de la dieta⁹. Además, la inmensa mayoría de los estudios realizados han encontrado que la RP también aumenta la longevidad máxima en roedores de laboratorio¹⁰⁻¹³. Dicho aumento tiene una magnitud de alrededor de un 40% del encontrado durante la RC.

Por otra parte, se ha observado que la restricción de metionina (RMet) sin restricción de calorías también aumenta la longevidad máxima en ratas y ratones^{14,15} y muchos otros tipos de investigaciones recientes relacionan a la metionina con el envejecimiento. Teniendo en cuenta toda esta información, planteamos la hipótesis de que el descenso en la ingesta de metionina es la causa del descenso en producción de ROS y estrés oxidativo mitocondrial que ocurre durante la RC y la RP, así como de alrededor de un 40% del aumento de longevidad que tiene lugar durante la RC. Para poner a prueba esta hipótesis, en el presente trabajo se sometió a ratas macho a exactamente el mismo protocolo dietético de RMet que se sabe que aumenta su longevidad máxima¹⁴. Las ratas controles se alimentaron *ad libitum*. El tiempo de restricción utilizado (7 semanas) es el mismo que induce un descenso en producción de MitROS en ratas sometidas tanto a RC¹⁶ como a RP⁸. Hemos valorado en las mitocondrias cardíacas la tasa de producción mitocondrial de ROS, la intensidad del consumo de oxígeno mitocondrial, la FRL

porcentual y el daño oxidativo al ADNmt valorado como 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar macho de 7 semanas de edad procedentes de Iffa-Creddo (Lyon, Francia). Los animales se estabularon en jaulas individuales con fotoperíodo luz:oscuridad 12:12 a 22 ± 2 °C y $50 \pm 10\%$ de humedad relativa. Las dietas semipurificadas utilizadas se obtuvieron de MP Biochemicals (Irving, CA, Estados Unidos). La dieta semipurificada de los animales controles (alimentados *ad libitum*) correspondió a la dieta AIN-93G del Instituto Americano de Nutrición: almidón vegetal 31,80%, sacarosa 31,80%, dextrina 5,00%, aceite de maíz 8,00%, fibra no nutritiva 5,00%, L-arginina 1,12%, L-lisina 1,44%, L-histidina 0,33%, L-leucina 1,11%, L-isoleucina 0,82%, L-valina 0,82%, L-treonina 0,82%, L-triptófano 0,18%, L-metionina 0,86%, ácido L-glutámico 2,70%, L-fenilalanina 1,16%, L-glicocola 2,33%, bitartrato de colina 0,20%, mezcla vitamínica AIN 1,00%, y mezcla de minerales AIN 3,50%. Los animales restringidos en metionina recibieron una dieta igual excepto por el contenido en L-metionina que fue del 0,17% y el contenido en ácido L-glutámico que fue del 3,39%. Los animales controles recibieron cada día la misma cantidad de comida que los animales restringidos en metionina habían ingerido como media el día anterior. Esto asegura que la ingesta calórica es igual en ambos grupos. Después de 7 semanas de tratamiento dietético se sacrificó a los animales por decapitación.

Inmediatamente tras el sacrificio se obtuvieron mitocondrias cardíacas funcionales, según se ha descrito previamente⁴, excepto que las centrifugaciones se realizaron a 1.000 g durante 10 min para eliminar los núcleos y restos celulares y a 10.000 g para precipitar las mitocondrias.

La tasa de producción mitocondrial de H₂O₂ se estimó a partir del aumento de fluorescencia (excitación a 312 nm y emisión a 420 nm) debido a la oxidación del ácido homovanílico por el H₂O₂ en presencia de peroxidasa

TABLA 1. Producción máxima de H₂O₂ en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria en mitocondrias cardíacas de ratas controles y restringidas en metionina

	Control	RMet
PIR + ROT	3,5 ± 0,3	2,7 ± 0,2*
SUCC + AA	23,2 ± 3,4	20,0 ± 2,6

AA: antimicina A; PIR: piruvato/malato; RMet: restricción de metionina; ROT: rotenona; SUCC: succinato.

Los valores son medias ± SEM de 7-8 animales diferentes y se expresan en nanomoles de H₂O₂/min mg de proteína mitocondrial.

*p < 0,05 entre grupos control y RMet.

de rábano¹⁷. Las condiciones de reacción fueron 0,25 mg de proteína mitocondrial por ml, 6 U/ml de peroxidasa de rábano, ácido homovanílico 0,1 mM, 50 U/ml de superóxido dismutasa, y 2,5 mM piruvato/2,5 mM malato, o 5 mM succinato + 2 μ M rotenona como sustratos, en tampón de incubación (CIK 145 mM, Hepes 30 mM, $\text{PO}_4 \text{KH}_2$ 5 mM, Cl_2Mg 3 mM, EGTA 0,1 mM, albúmina 0,1%, pH 7,4) a 37 °C, en un volumen total de 1,5 ml. En todos los experimentos realizados con succinato se sobreentiende que succinato quiere decir “succinato+2 μ M rotenona”. Aparte de esto, en algunos experimentos se añadió rotenona (2 μ M) o antimicina A (2 μ M) para valorar la producción máxima de MitROS (tabla 1). La reacción se detuvo con 0,5 ml de una solución de glicocola 2 M, NaOH 2,2 M, EDTA 50 mM y transfiriendo las muestras a un baño de hielo. La fluorescencia se midió en un fluorímetro Perkin-Elmer LS50B. Se utilizó como estándar el H_2O_2 generado por cantidades conocidas de glucosa y glucosa oxidasa. Puesto que las medidas se realizaron en presencia de superóxido dismutasa, representan la producción total de ROS (superóxido más peróxido de hidrógeno).

El consumo de oxígeno mitocondrial se midió a 37 °C con un electrodo de oxígeno de Clark (Hansatech, Reino Unido) en el mismo medio de incubación utilizado para las medidas de producción de H_2O_2 . Las medidas se realizaron en ausencia (estado 4, reposo) y en presencia (estado 3, fosforilante) de ADP 500 μ M. La FRL porcentual se calculó como la producción de H_2O_2 dividida por 2 veces el consumo de oxígeno y el resultado se multiplicó por 100.

El ADNmt se aisló a partir del tejido cardíaco por el método de Latorre¹⁸ adaptado a mamíferos¹⁹. La digestión del ADN y las condiciones cromatográficas se realizaron esencialmente según el método de Loft y Poulsen²⁰. Para la separación por HPLC se utilizó una columna Beckman Ultrasphere ODS (5 μ , 4,6 mm \times 25 cm), una bomba Waters 510 y un detector Coulochem II con célula analítica 5011 para la detección de la 8-oxodG. La base no oxidada dG se detectó con un detector Bio-Rad 1806 UV a 254 nm.

RESULTADOS

La restricción de metionina en la dieta disminuyó significativamente la producción de H_2O_2 de las mitocondrias cardíacas con piruvato/malato como sustratos en un 36% por debajo de los valores de los controles (fig. 1). En cambio, cuando se utilizó succinato (+ rotenona) como sustrato, no se observaron diferencias entre las mitocondrias de los grupos control y RMet (resultados no mostrados). Sin embargo, cuando los experimentos con succinato como sustrato se repitieron en ausencia de rotenona, la tasa de producción de H_2O_2 del grupo RMet fue de nuevo significativamente menor que la de los controles.

Las tasas máximas de producción de H_2O_2 se midieron utilizando combinaciones adecuadas de sustratos e inhibidores de la cadena respiratoria (tabla 1). La produc-

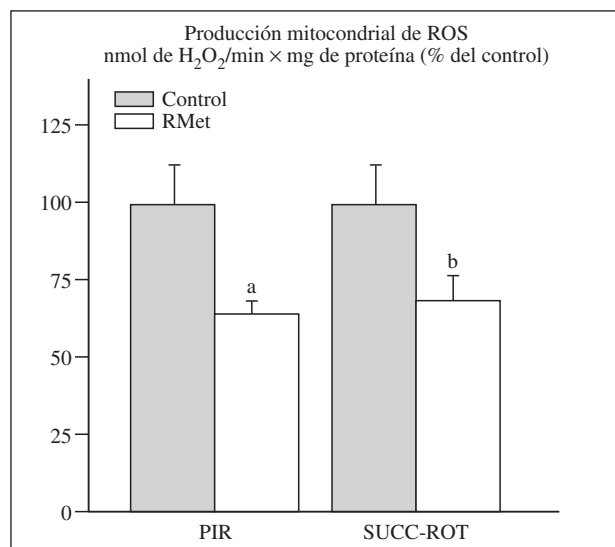


Figura 1. Intensidad de producción de H_2O_2 de mitocondrias cardíacas en ratas controles y restringidas en metionina (RMet). PIR: piruvato/malato; SUCC-ROT: succinato sin rotenona. Valores en el grupo control: $0,25 \pm 0,03$ (PIR); $7,24 \pm 1,00$ (SUCC-ROT). Los valores son medias \pm SEM de 6-8 animales diferentes. Diferencias significativas entre grupos control y RMet. ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,05$.

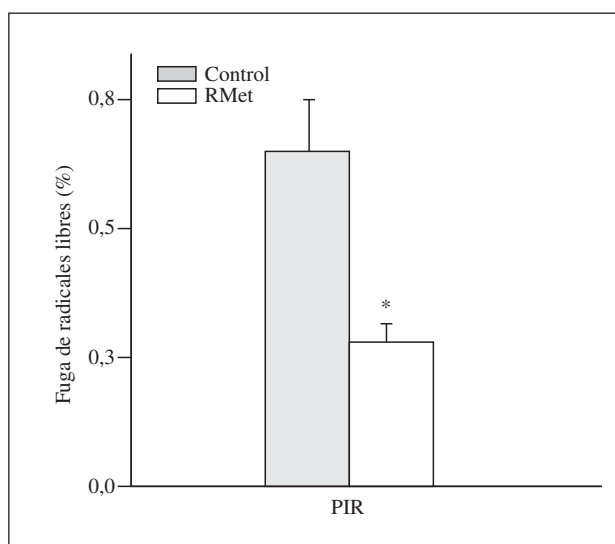


Figura 2. Fuga de radicales libres (FRL %) de mitocondrias cardíacas en ratas controles y restringidas en metionina (RMet). La FRL es el porcentaje del flujo electrónico total en la cadena respiratoria que da lugar a formación de radicales de oxígeno (ver la sección de Material y métodos). PIR: piruvato/malato. Los valores son medias \pm SEM de 6-8 animales diferentes. Diferencias significativas entre grupos control y RMet. * $p < 0,05$.

ción de H_2O_2 de las mitocondrias cardíacas disminuyó significativamente en el grupo RMet en presencia de piruvato/malato + rotenona, situación que da lugar a la reducción electrónica completa del complejo I. Sin embargo, en presencia de succinato + antimicina A, que da lugar a la reducción completa del complejo III, las diferencias observadas no alcanzaron la significación estadística.

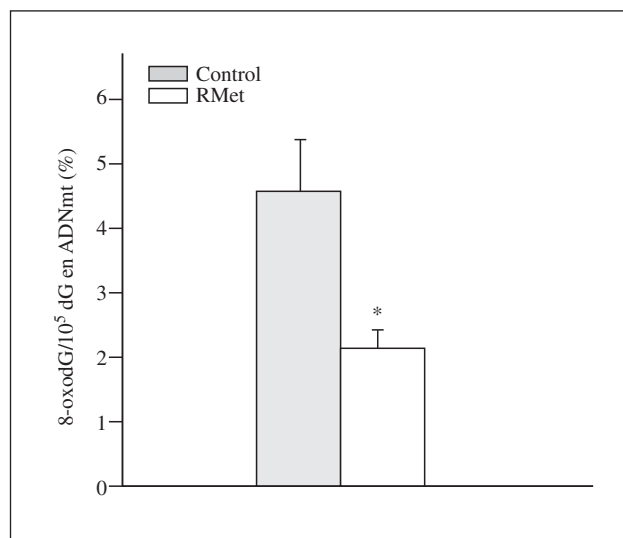


Figura 3. Daño oxidativo en el ADN mitocondrial, estimado como 8-oxodG, en el corazón de ratas controles y restringidas en metionina (RMet). Los valores son medias \pm SEM de 6-7 animales diferentes. Diferencias significativas entre grupos control y RMet. * $p < 0,01$.

TABLA 2. Consumo de oxígeno de mitocondrias cardíacas de ratas controles y restringidas en metionina

	Control	RMet
PIR (E4)	26 \pm 5	34 \pm 5
PIR (E3)	123 \pm 16	185 \pm 3*
SUCC (E4)	86 \pm 18	125 \pm 15
SUCC (E3)	137 \pm 30	218 \pm 48

E3: estado 3 (sustrato + ADP); E4: estado 4 (sustrato sin ADP); PIR: piruvato/malato; RMet: restricción de metionina; SUCC: succinato. Los valores son medias \pm SEM de 7-8 animales diferentes y se expresan en nanomoles de O₂/min mg de proteína mitocondrial. * $p < 0,05$ entre los grupos control y RMet.

El consumo de oxígeno con piruvato/malato aumentó significativamente en el grupo RMet en estado 3 pero no en el estado 4 (tabla 2). En presencia de succinato (+ rotenona) no se detectaron diferencias significativas entre los grupos control y RMet ni en el estado 3 ni en el estado 4 (tabla 2).

El porcentaje de electrones de la cadena respiratoria que dan lugar a la formación de radicales libres (la FRL) disminuyó significativamente en el grupo RMet en un 57% por debajo de los controles cuando se utilizó piruvato/malato (fig. 2), pero no cuando se utilizó succinato (resultados no mostrados) como sustrato.

La concentración de 8-oxodG en el ADNmt disminuyó en el grupo RMet en un 35% por debajo de los controles (fig. 3).

DISCUSIÓN

En este trabajo se demuestra que la restricción de metionina disminuye la producción mitocondrial de ROS y el daño oxidativo al ADNmt en el corazón de rata. Esto sugiere que el descenso en la ingesta de metionina es la causa de estos mismos cambios que se sabe que se dan durante la restricción calórica.

La restricción de calorías es la manipulación experimental mejor conocida que disminuye la velocidad del envejecimiento, pero no se conocen sus mecanismos de acción. Los estudios realizados hasta la fecha, que son abundantes, están de acuerdo en que la RC disminuye la generación de MitROS³, lo que sugiere que éste puede ser uno de los mecanismos principales. Pero no se sabe cuál es el componente de la dieta que causa esta disminución. Un estudio reciente de nuestro laboratorio⁸ encontró que la RP también disminuye la generación de MitROS en el complejo I, hace descender el FRL y disminuye la 8-oxodG en el ADNmt en mitocondrias de rata de tal forma que mimetiza a la RC tanto cuantitativa como cualitativamente. En cambio, ni la restricción de hidratos de carbono⁶ ni la de lípidos⁷ modifican estos parámetros. Al intentar encontrar el componente proteico que causa el descenso en MitROS durante la RC y la RP, nos hemos centrado en la metionina, ya que varios tipos de evidencias relacionan actualmente a este aminoácido con el envejecimiento. Así, se sabe que la RMet sin restricción calórica aumenta la longevidad máxima de ratas y ratones^{14,15,21}, igual que ocurre en la RP¹⁰⁻¹³, aunque el efecto de la RP sobre la longevidad es menor que el de la RC. Además el contenido en metionina de las proteínas correlaciona inversamente con la longevidad máxima en los mamíferos²², lo que tiene sentido puesto que la metionina es uno de los aminoácidos más sensible al ataque por ROS que la oxidan formando sulfóxido de metionina²³. También se sabe que la suplementación con metionina en la dieta daña órganos vitales (como el aparato cardiovascular), aumenta su estrés oxidativo^{24,25} y se han encontrado efectos negativos análogos en ratas alimentadas con dietas ricas en proteínas²⁶. Por otra parte, los ratones knockout para la metionina sulfóxido reductasa A (enzima que reduce la metionina sulfóxido a metionina en una reacción dependiente de tiorredoxina) muestran aumentos en el daño oxidativo a proteínas y un descenso de longevidad máxima²³, mientras que la sobreexpresión de esta enzima en *Drosophila* aumenta su longevidad²⁷. La sobreexpresión de la tiorredoxina también aumenta la longevidad en ratones²⁸ y los ratones mutantes longevos Ames también parecen tener alterado el metabolismo de la metionina²⁹.

En el presente trabajo, de acuerdo con la hipótesis planteada, hemos observado que la RMet, al utilizar el mismo protocolo dietético que aumenta la longevidad máxima de la rata¹⁴, disminuye la producción de MitROS, el FRL y el daño oxidativo al ADNmt, de modo similar a lo que se ha observado tanto en la RP⁸ como en la RC^{3,4,16}. El descenso en la generación de ROS ocurrió sólo en el complejo I, ya que se dio con piruvato/malato, pero no

con succinato (+ rotenona) como sustrato, y también tuvo lugar cuando las medidas con succinato se realizaron en ausencia de rotenona (lo cual permite el flujo reverso de electrones desde el succinato al generador de ROS del complejo I). Es interesante observar que en estudios previos el descenso en generación de ROS de las mitocondrias cardíacas durante la RC y la RP también ocurre exclusivamente en el complejo I^{4,8}. Los descensos en producción de MitROS y FRL encontrados en este trabajo podrían deberse, en principio, no solamente a la RMet, sino también a la suplementación compensadora de la dieta con glutamato (ver la sección de "Material y métodos"). Sin embargo, en estudios posteriores no publicados realizados en nuestro laboratorio hemos realizado la RMet sin modificar ni el glutamato ni ningún otro componente de la dieta de forma significativa, y de nuevo hemos observado descensos similares en producción de MitROS y en el FRL, esta vez sin cambios en el consumo de oxígeno mitocondrial (lo mismo que ocurre en la RC y en la RP). Esto demuestra que estos descensos se deben a la RMet en la dieta, no a la adición de glutamato.

En cuanto a la causa del descenso en producción de MitROS, se ha sugerido que podría estar implicada una disminución en la concentración del complejo I³⁰, lo que está de acuerdo con resultados recientes obtenidos por nuestro grupo en colaboración con el del Dr. R. Pamplona en la Universidad de Lleida. Un descenso en la concentración de complejo I, en principio, disminuiría la generación de MitROS sin modificar el FRL, a menos que se produzca una redistribución parcial en el porcentaje de entrada de electrones a la cadena respiratoria, desde el complejo I (que produce ROS) a favor del complejo II (que no los produce), posibilidad que en la actualidad está en estudio en nuestros 2 laboratorios. Las mitocondrias del grupo RMet no sólo producen menos ROS por unidad de tiempo, sino que también producen menos ROS por unidad de flujo electrónico en la cadena respiratoria, análogamente a lo que se ha observado en la RC^{4,16} y en la RP⁸ en rata, así como en especies animales longevas en comparación con las de vida corta³¹. En todos estos modelos de envejecimiento lento las mitocondrias son más eficientes, ya que producen menos ROS sin necesidad de disminuir el consumo del oxígeno (y la producción de energía), lo que es de gran interés.

Estudios recientes de 2 grupos independientes indican que en la RC se produce un incremento acusado de la biogénesis mitocondrial³² en todos los tejidos estudiados en roedores, al valorar los factores de transcripción y coactivadores PGC1- α , NRF-1 y -2, Tfam y las mitofusinas mfn-1 y -2, acompañado de incrementos³² o mantenimiento³³ del consumo de oxígeno y de un incremento en la eficiencia de las mitocondrias en la producción de ATP por unidad de flujo electrónico³³. Nuestro grupo tiene en marcha estudios que pretenden integrar todos estos datos junto con los descritos en este trabajo para la RMet y los previos en la RC y la RP, para poder tener una visión de conjunto de lo que ocurre cuando el animal se adapta,

en el ámbito molecular y metabólico, a la restricción de dieta y disminuye la velocidad de su envejecimiento. Es muy interesante que un estudio reciente del grupo de Ritchie et al¹⁴ (el que descubrió que la RMet alarga la longevidad máxima de la rata)¹⁴ ha observado que exactamente el mismo procedimiento de RMet utilizado aquí, y en su trabajo seminal (que es isocalórico) evita en la rata los aumentos de triglicéridos y de colesterol que ocurren con la edad, disminuye (como la RC) la concentración de insulina e IGF-1 en plasma, disminuye la respuesta de la insulina en test de tolerancia a la glucosa, y hace descender en un 70% el contenido de grasa visceral³⁴.

Se puede considerar también otro mecanismo que puede estar implicado en el descenso de producción de MitROS en la RMet. Se ha descrito que al añadir glutatión oxidado al complejo I mitocondrial aislado se produce un incremento en su intensidad de generación de ROS³⁵, y lo mismo ocurre tras añadir homocisteína a mitocondrias cardíacas de rata³⁶. Esto sugiere que la producción de MitROS puede estar regulada por tioles. Los efectos tóxicos de la metionina en la dieta se han relacionado con su conversión en homocisteína y con aumentos en los valores de esta última molécula en el organismo^{24,37}. La homocisteína, en contraste con la metionina, tiene un grupo tiólico libre que puede reaccionar con tioles proteicos, y dar lugar a la formación de disulfuros mixtos. Así pues, es posible que la RMet ocasione descensos en la concentración de homocisteína en la matriz mitocondrial que disminuirían a su vez el grado de tiolización del complejo I y por tanto su producción de ROS. En relación con este posible mecanismo, es muy interesante que los valores de homocisteína aumentan con la edad en el hombre y representan un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades degenerativas asociadas a radicales libres durante el envejecimiento³⁸.

Por último, en relación con el daño oxidativo, en este trabajo hemos observado que la RMet disminuye la concentración de 8-oxodG en el ADNmt cardíaco por debajo de los valores basales de los animales controles. Esto también ocurre con una intensidad similar tanto en la RC^{4,16} como en la RP⁸. El descenso en 8-oxodG (de un 35%) en la RMet está también de acuerdo con la menor generación de MitROS (36% menor) observada en esta manipulación dietética. Todo esto refuerza la idea de que el descenso en la ingestión de metionina es la causa del descenso en estrés oxidativo mitocondrial que tiene lugar durante la RC^{4,16} y la RP⁸. Resumiendo, los resultados de este trabajo muestran que la RMet, análogamente a las RC y RP, disminuye la tasa de generación mitocondrial de radicales libres, aumenta la eficiencia de la cadena respiratoria en evitar la fuga univalente de electrones hacia el oxígeno y disminuye los valores de daño oxidativo en el ADNmt. Esto sugiere que el descenso en producción de ROS y estrés oxidativo mitocondrial que ocurre durante la RC puede deberse al descenso en la ingesta de una sola molécula, la metionina. Esta molécula sería también la causa de una parte importante del descenso de velocidad

del envejecimiento que tiene lugar durante la RC. Los experimentos de RMet descritos en el presente estudio son parte de un trabajo más amplio publicado recientemente en una revista de amplia difusión internacional³⁹. Todos los experimentos de RMet realizados o citados en este trabajo, tomados conjuntamente, indican que disponemos por primera vez de una manipulación practicable (la RP o la RMet) en la dieta que retrasa el envejecimiento de los mamíferos en un 20% con la disminución de la incidencia de todas las enfermedades degenerativas, sin necesidad de disminuir en nada la ingesta calórica. Esto es de gran importancia, sobre todo porque la ingesta proteica media (y por lo tanto también la de metionina) de las poblaciones humanas occidentales (2 g de proteína/kg de peso y día en los Estados Unidos), incluida la española (1,8 g/kg y día), es muy superior a la recomendada por instituciones como la Organización Mundial de la Salud desde hace muchos años. Hay pues un amplio margen para la disminución de la ingesta proteica de estas poblaciones libre de riesgos de malnutrición proteica.

BIBLIOGRAFÍA

- Beckman KB, Ames B. The free radical theory of aging matures. *Physiol Reviews*. 1998;78:547-81.
- Barja G. Free radicals and aging. *Trends in Neurosci*. 2004;27:595-600.
- Gredilla R, Barja G. Caloric restriction, aging and oxidative stress. *Endocrinology*. 2005;146:3713-7.
- Gredilla R, Sanz A, López-Torres M, et al. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J*. 2001;15:1589-91.
- Pamplona R, Portero-Otín M, Bellmunt MJ, et al. Aging increases N^ε-pysilon-(Carboxymethyl)lysine and caloric restriction decreases N^ε-pysilon-(Carboxyethyl)lysine and N^ε-pysilon-(Malondialdehyde)lysine in rat heart mitochondrial proteins. *Free Rad Res*. 2002;36:47-54.
- Sanz A, Gómez J, Caro P, et al. Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J Bioenerg Biomembr*. 2006. En prensa.
- Sanz A, Caro P, Gómez J, et al. Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1067:200-9.
- Sanz A, Caro P, Barja G. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J Bioenerg Biomembr*. 2004;36:545-52.
- Mair W, Piper MDW, Partridge L. Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLOS Biol*. 2005;3:1305-11.
- Leto S, Kokkonen GC, Barrows CH Jr. Dietary protein, life-span, and biochemical variables in female mice. *J Gerontol*. 1976;31:144-8.
- Goodrick CL. Body weight increment and length of life: the effect of genetic constitution and dietary protein. *J Gerontol*. 1978;33:184-90.
- Barrows CH Jr, Kokkonen G. Protein synthesis, development, growth and life span. *Growth*. 1975;39:525-33.
- Ross MH. Length of life and nutrition in the rat. *J Nutr*. 1961;75:197-210.
- Richie JPr, Leutzinger Y, Parthasarathy S, et al. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J*. 1994;8:1302-7.
- Miller RA, Buehner G, Chang Y, et al. 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*. 2005;4:119-25.
- Gredilla R, Barja G, López-Torres M. Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria, and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembr*. 2001;33:279-87.
- Barja G. The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 2002;34:227-33.
- Latorre A, Moya A, Ayala A. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1986;83:8649-53.
- Asunción JG, Millan A, Pla R, et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J*. 1986;10:333-8.
- Loft S, Poulsen HE. Markers of oxidative damage to DNA: antioxidants and molecular damage. *Methods Enzymol*. 1999;300:166-84.
- Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, et al. Nutritional control of aging. *Exper Gerontol*. 2003;38:47-52.
- Ruiz MC, Ayala V, Portero-Otín M, et al. Protein methionine content and MDA-lysine protein adducts are inversely related to maximum life span in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev*. 2005;126:1106-14.
- Moskovitz J, Bar-Noy S, Williams WM, et al. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *PNAS USA*. 2001;98:12920-5.
- Hidiroglou N, Sarwar Gilani G, Long L, et al. 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*. 2004;15:730-40.
- Mori N, Hirayama K. Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. *J Nutr*. 2000;130:2349-55.
- Fau D, Peret J, Hadjilisky P. Effects of ingestion of high protein or excess methionine diets by rats for two years. *J Nutr*. 1988;118:128-33.
- Ruan H, Tang XD, Chen ML, et al. High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *PNAS USA*. 2002; 99:2748-53.
- Mitsui A, Hamuro J, Nakamura H, et al. Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and lifespan. *Antioxid Redox Sign*. 2002;4:693-6.
- Uthus EO, Brown-Borg H. Altered methionine metabolism in long living Ames dwarf mice. *Exper Gerontol*. 2003;38:491-8.
- St. Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, et al. Topology of superoxide production from different sites in the respiratory chain. *J Biol Chem*. 2002;277:44784-90.
- Barja G. Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Reviews*. 2004;79:235-51.
- Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*. 2005;310:314-7.
- López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhun M, Jamieson H, Hilmer S, et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *PNAS*. 2006;103:1768-73.
- Malloy VL, Krajcik A, Bailey SJ, Hristopoulos G, Plummer JD, Orentreich N. Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell*. 2006;5:1-10.
- Taylor ER, Hurrell F, Shannon RJ, et al. Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *J Biol Chem*. 2003;278:19603-10.
- Chang L, Zhao J, Xu J, et al. Effects of taurine and homocysteine on calcium homeostasis and hydrogen peroxide and superoxide anions in rat myocardial mitochondria. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31:237-43.
- Matthias D, Becker CH, Riezler R, et al. Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. *Atherosclerosis*. 1996;122:201-16.
- Ninomiya T, Kiyohara Y, Kubo M, et al. Hyperhomocysteinemia and the development of chronic kidney disease in a general population: the Hisayama study. *Am J Kidney Dis*. 2004;44:437-45.
- Sanz A, Caro P, Ayala V, Portero-Otín M, Pamplona M, Barja G. Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB Journal*. 2006;20:1064-73.