

ORIGINAL/Sección Ciencias Biológicas

## Efecto de la restricción de aminoácidos excepto la metionina sobre el estrés oxidativo mitocondrial

Pilar Caro, José Gómez, Inés Sánchez, Mónica López-Torres y Gustavo Barja \*

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

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

*Historia del artículo:*

Recibido el 23 de septiembre de 2008

Aceptado el 23 de enero de 2009

On-line el 3 de julio de 2009

*Palabras clave:*

Producción de radicales de oxígeno

Restricción de proteínas

Restricción de aminoácidos

Envejecimiento

Longevidad

Proteínas

RESUMEN

**Introducción:** Se sabe que la restricción de proteína o la restricción de metionina (RMet) en la dieta disminuye la producción de radicales de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo mitocondrial y aumenta la longevidad máxima en roedores, lo que puede explicar que estos cambios ocurran en la restricción calórica. Sin embargo, no se sabe si la restricción de otros aminoácidos está también implicada. Para aclararlo, se estudió el efecto de la restricción al 40% de todos los aminoácidos de la dieta semipurificada AIN 93G, excepto la metionina, en ratas Wistar.

**Material y métodos:** Diecisésis ratas Wistar macho de 7 semanas de edad se dividieron aleatoriamente en 2 grupos: el grupo control y el grupo restringido al 40% en los aminoácidos de la dieta, excepto la metionina. Tras 7 semanas de régimen dietético los animales se sacrificaron y se les extrajo el hígado para aislar inmediatamente las mitocondrias y medir la producción de ROS y el consumo de oxígeno en éstas. Con estos datos se calculó la fuga porcentual de radicales libres. El daño oxidativo al ADN mitocondrial se estimó como 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxyguanosina por cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-EC).

**Resultados:** Al final del período experimental se observó un descenso del peso del riñón, pero no del hígado, ni del corazón o del cerebro. La producción de ROS en mitocondrias hepáticas aisladas no se modificó ni con sustratos del complejo I (piruvato con malato o glutamato con malato) ni del complejo II (succinato). La producción máxima de ROS disminuyó significativamente con glutamato, malato y rotenona pero no con piruvato, malato y rotenona ni con succinato. No hubo cambios en el consumo de oxígeno con ningún sustrato ni en estado 4 (reposo) ni en estado 3 (fosforilante). De acuerdo con los resultados de producción de ROS, no hubo diferencias entre los grupos en el daño oxidativo al ADNm.

**Conclusiones:** Los resultados que se obtuvieron, junto con los previamente existentes sobre la RMet, demuestran de forma clara que el descenso en la ingestión de una sola molécula, la metionina, es el causante de la disminución de la producción de ROS y del daño oxidativo al ADNm que se observa en la restricción calórica en relación con la disminución de la velocidad de envejecimiento.

© 2008 SEGG. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Effect of restricting amino acids except methionine on mitochondrial oxidative stress

ABSTRACT

*Keywords:*

Reactive oxygen species generation

Protein restriction

Amino acid restriction

Aging

Longevity

Proteins

**Introduction:** Protein or methionine restriction in the diet is known to decrease reactive oxygen species (ROS) production and mitochondrial oxidative stress and to increase maximum longevity in rodents, which could explain how these changes also take place in dietary restriction. However, it is not known whether restriction of other amino acids is also involved. To clarify this question, we studied the effect of restricting all the amino acids, except methionine, of the semi-purified diet, AIN 93G, in Wistar rats.

**Material and methods:** Seven-week old male Wistar rats ( $n = 16$ ) were randomly divided into two groups: a control group and a group with 40% restriction of dietary amino acids except methionine. After 7 weeks of dietary treatment, the animals were sacrificed and their livers were extracted to isolate mitochondria immediately and measure ROS production and oxygen consumption; these data allowed the percentage of free radical leak to be calculated. Oxidative damage to mitochondrial DNA was calculated as 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by HPLC-EC.

**Results:** At the end of the experimental period, a decrease in kidney weight was observed, but the weight of the liver, heart and brain was unchanged. ROS production in isolated liver mitochondria was unchanged with complex I (pyruvate/malate or glutamate/malate) or complex II (succinate) linked substrates. Maximum rates of ROS production significantly decreased with glutamate/malate+rotenone but not with

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [\(G. Barja\).](mailto:gbarja@bio.ucm.es)

pyruvate/malate+rotenone or with succinate. There were no changes in oxygen consumption with any substrate either in state 4 (resting) or in state 3 (phosphorylating). In agreement with the ROS production results, there were no differences between groups in oxidative damage to mitochondrial DNA.

**Conclusions:** Taken together with previous results concerning methionine restriction, the results obtained in the present study clearly show that the decrease in ingestion of only one molecule, methionine, causes the decrease in ROS production and oxidative damage to mitochondrial DNA that is observed in dietary restriction in relation to the decrease in the rate of aging.

© 2008 SEGG. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

El envejecimiento es un proceso que incrementa el riesgo de muerte y de tener enfermedades degenerativas crónicas, por lo que es importante determinar los mecanismos causantes de éste. Hay numerosas pruebas que indican que la producción de radicales libres de origen mitocondrial (ROS<sub>m</sub>) están relacionados con el proceso de envejecimiento<sup>1–3</sup>. Estudios previos indican que los animales más longevos, incluso los mamíferos, presentan bajos valores de producción de ROS en las mitocondrias de sus principales tejidos<sup>4</sup>, acompañados de menores valores de daño oxidativo en el ADN medidos como 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG). Estas 2 características pueden reducir la tasa de acumulación de mutaciones en el ADNm durante la vida, lo que puede incrementar la longevidad<sup>2</sup>.

La manipulación que mejor se conoce y que es capaz de incrementar la longevidad máxima es la restricción dietética (RD), que, curiosamente, disminuye la producción de ROS<sub>m</sub> y reduce los valores de 8-oxodG en el ADNm<sup>5</sup>. Recientes estudios que se realizaron en este laboratorio indican que la restricción de proteínas (RP)<sup>6</sup> o la restricción de metionina (RMet)<sup>7</sup> reducen la producción de ROS<sub>m</sub> y los valores de 8-oxodG en los tejidos de rata; mientras que estos efectos no tienen lugar ni en la restricción de lípidos<sup>8</sup> ni en la restricción de carbohidratos<sup>9</sup>. Además, hay pruebas de que la RD, la RP o la RMet incrementan la longevidad máxima en mamíferos, mientras que la restricción de lípidos o la restricción de carbohidratos no produce tal efecto<sup>10</sup>. En conjunto, estos resultados indican la posibilidad de que la metionina sea el factor causante de la disminución de la generación de ROS<sub>m</sub> y del daño oxidativo al ADNm, así como del incremento de la longevidad máxima que se observa durante la RD. Sin embargo, es necesario determinar si la restricción de algún otro aminoácido componente de las proteínas, es capaz de alterar también estos parámetros moleculares.

Así pues, en esta investigación se trataron ratas Wistar macho con dietas semipurificadas en las que se restringieron todos los aminoácidos, salvo la metionina, en un 40% (grupo RAA) durante 6 a 7 semanas, tiempo suficiente para disminuir la producción de ROS<sub>m</sub> y los valores de 8-oxodG en el ADNm de hígado de rata, tanto en el caso de un 40% de la RP<sup>6</sup> como en el de un 40% de la RMet<sup>8,11</sup>. Al final de este período se midió el consumo de oxígeno mitocondrial, la producción de ROS<sub>m</sub> y el daño oxidativo al ADNm.

## Material y métodos

### Animales y dietas

Se usaron 16 ratas Wistar macho de 7 semanas de edad. Se alojaron en jaulas individuales con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad a 22 ± 2 °C y con una humedad relativa del 50 ± 10%. Las ratas se dividieron en 2 grupos: el grupo control y el grupo RAA. Las ratas se alimentaron con dietas preparadas por MP Biochemicals (Irving, CA, EE. UU.), con una composición que se muestra en la tabla 1. La dieta que se suministró a las ratas del

grupo RAA contenía un 40% menos de todos los aminoácidos, salvo la metionina; el decremento en aminoácidos se compensó con el incremento de la cantidad de almidón de maíz (del 40,97 al 47,158%), ya que por estudios previos se sabe que una variación del 40% en la ingesta de carbohidratos no modifica la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ni los valores de 8-oxodG en el hígado de ratas Wistar macho<sup>9</sup>. El resto de los componentes se mantuvo en las mismas proporciones en ambas dietas. Con esta composición, el contenido calórico total fue similar en ambas dietas. El grupo control se alimentó con la misma cantidad de comida con que se había alimentado al grupo RAA durante la semana anterior. Además, el peso de las ratas se midió semanalmente. Durante el inicio del experimento el peso corporal fue de 256,1 ± 6,5 g en el grupo control y de 245,0 ± 6,2 g en el grupo RAA (diferencia no significativa). Al final de las 6 o 7 semanas de tratamiento dietético el peso corporal fue de 397,3 ± 8,4 g en el grupo control y de 381,3 ± 7,2 g en el grupo RAA. No se produjeron diferencias significativas entre los 2 grupos para el peso total, la ganancia de peso o la ingesta de dieta en ninguna de las 7 semanas de experimentación. Al final del experimento los animales se sacrificaron mediante decapitación y, mientras una parte del hígado se procesó en fresco para medir la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el consumo de oxígeno mitocondrial, la otra parte se congeló a –80 °C para medir el daño oxidativo al ADNm. Los órganos de cada animal se pesaron después de su extracción.

**Tabla 1**  
Dietas del grupo control y del grupo RAA

Componente	Grupo control (g/100 g)	Grupo RAA (g/100 g)
L-arginina	1,12	0,672
L-lisina	1,44	0,864
L-histidina	0,33	0,198
L-leucina	1,11	0,666
L-isoleucina	0,82	0,492
L-valina	0,82	0,492
L-treonina	0,82	0,492
L-triptofano	0,18	0,108
<b>L-metionina</b>	<b>0,86</b>	<b>0,86</b>
Ácido L-glutámico	2,70	1,620
L-fenilalanina	1,16	0,696
L-glicina	2,33	1,398
L-cistina	0,34	0,204
L-proolina	0,34	0,204
L-tirosina	0,34	0,204
Ácido L-aspártico	0,34	0,204
L-alanina	0,34	0,204
L-serina	0,34	0,204
L-asparagina	0,60	0,360
Dextrina	5	5
<b>Almidón de maíz</b>	<b>40,97</b>	<b>47,158</b>
Sacarosa	20	20
Celulosa	5	5
Bitartrato de colina	0,2	0,2
Mezcla de vitaminas AIN 93G	1	1
Mezcla de minerales AIN 93G	3,5	3,5
Aceite de maíz	8	8
<b>Total (% en peso)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

RAA: restricción del 40% de todos los aminoácidos de la dieta, excepto la metionina.

## Aislamiento de mitocondrias hepáticas

Las mitocondrias hepáticas se obtuvieron a partir de tejido fresco. El hígado se homogeneizó en 60 ml de tampón de aislamiento (210 mM de manitol, 70 mM de sacarosa, 5 mM de hepes, 1 mM de EDTA EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid) y pH 7,35). Los núcleos celulares se eliminaron por centrifugación a 1.000 g durante 10 min. El sobrenadante resultante se centrifugó a 10.000 g durante 10 min, luego se eliminó el nuevo sobrenadante y se resuspendió el pellet resultante en 40 ml de tampón de aislamiento sin EDTA para volver a centrifugarlo a 1.000 g durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante para centrifugarlo a 10.000 g durante 10 min. Tras esta última centrifugación se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 1 ml de medio de aislamiento sin EDTA. Todo el proceso de aislamiento se realizó a 5 °C y, tras el aislamiento, las mitocondrias se mantuvieron en hielo. Posteriormente se midió la concentración de proteína mitocondrial por el método de Biuret.

## Producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno

La producción mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se estimó con la medición del incremento de fluorescencia (excitación a 312 nm y emisión a 420 nm) que se produjo por la oxidación del ácido homovanílico en presencia de peroxidasa de rábano<sup>12,13</sup>. En cada reacción se añadió una concentración de 0,25 mg/ml de proteína mitocondrial, así como peroxidasa de rábano (6 U/ml), ácido homovanílico (0,1 mM), superóxido-dismutasa (50 U/ml) y se añadió, como sustrato, piruvato (2,5 mM) con malato (2,5 mM), glutamato (2,5 mM) con malato (2,5 mM) o succinato (5 mM) con o sin rotenona (2 μM). El sustrato se añadió al final para iniciar la reacción, que se realizó en un volumen total de 1,5 ml de tampón de incubación (145 mM de cloruro de potasio, 30 mM de hepes, 5 mM de fosfato monopotásico, 3 mM de cloruro de magnesio, 0,1 mM de EGTA, albúmina al 0,1% y pH 7,4) a 37 °C. Se realizaron ensayos adicionales y se añadió piruvato, malato y rotenona (2 μM) en el complejo I, y succinato con antimicina A (AA) (2 μM) en el complejo III con el fin de obtener la producción máxima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se realizaron ensayos duplicados que se incubaron durante 15 min a 37 °C. La reacción se paró mediante la transferencia de los ensayos a un baño frío y se añadió 0,5 ml de solución de parada (2,0 M de glicina, 2,2 M de hidróxido de sodio, 50 mM de EDTA y pH 12). La fluorescencia resultante se midió en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50B. Como estándar se utilizó el sistema de glucosa oxidasa. Dado que la enzima superóxido-dismutasa, añadida en exceso al ensayo, transforma todo el anión oxígeno (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) producido por la mitocondria a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las medidas realizadas representan el total (O<sub>2</sub><sup>-</sup> más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de la producción mitocondrial de ROS.

## Consumo de oxígeno mitocondrial

El consumo de oxígeno mitocondrial se midió a 37 °C en una cámara termostatizada con agua mediante un electrodo de oxígeno (O<sub>2</sub>) de tipo Clark (Oxygraph, Hansatech, Reino Unido). Las medidas se realizaron en 0,5 ml del mismo tampón de incubación utilizado para las medidas de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se utilizaron sustratos tanto del complejo I (2,5 mM de piruvato con 2,5 mM de malato o 2,5 mM de glutamato con 2,5 mM de malato) como del complejo II (5 mM de succinato en presencia de 2 μM de rotenona). Los ensayos se realizaron en ausencia (estado 4, en reposo) y en presencia (estado 3, fosforilativo) de difosfato de adenosina (ADP) a una concentración de 500 μM.

## Fuga de radicales libres

Tanto las medidas de consumo de O<sub>2</sub> como las de producción de radicales libres mitocondriales se realizaron en las mismas suspensiones de mitocondrias y bajo las mismas condiciones para poder calcular así el escape o la fuga de radicales libres (FRL). Este índice representa la fracción de electrones de la cadena respiratoria que reducen incompletamente el O<sub>2</sub> para producir ROS en vez de reducirlo completamente en el complejo IV para formar agua (H<sub>2</sub>O). Dado que se necesitan 4 electrones para reducir O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O y sólo 2 electrones para reducirlo a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la FRL se calculó como la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dividida por 2 veces el consumo de O<sub>2</sub> en las mismas condiciones experimentales y multiplicando el resultado por 100.

## Daño oxidativo al ADN mitocondrial

El aislamiento del ADNm se realizó por el método de Latorre et al<sup>14</sup>, adaptado a mamíferos<sup>15</sup>. El ADNm aislado se digirió hasta deoxinucleósido mediante la incubación a 37 °C con 5 U de nucleasa P1 (en 20 μl de acetato sódico 20 mM, 10 mM de cloruro de zinc, glicerol al 15% y pH 4,8) durante 30 min seguida por una incubación con 4 U de fosfatasa alcalina (en 20 μl de Tris-HCl 1 M y pH 8,0) durante 1 h<sup>16</sup>. El daño oxidativo se midió como la cantidad de 8-oxodG frente a dG (desoxiguanosina). Tanto la 8-oxodG como la dG se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica y ultravioleta, respectivamente. La mezcla de nucleótidos se inyectó en una columna de fase reversa Mediterránea Sea18 (5 μM, 4,6 mM × 25 cm) de Teknokroma, se usó una fase móvil acuosa que contenía acetonitrilo al 2,5% y 50 mM de tampón fosfato a pH 5. Se utilizó una bomba Gilson 305 que generaba un flujo de 1 ml/min. La 8-oxodG se detectó mediante un detector culométrico Coulchem II (ESA, Inc. Bedford, MA) con una célula analítica 5011A en modo oxidativo (275 mV/20 nA), mientras que la dG con un detector UV de Biorad modelo 1806 ajustado a 254 nm. Para la cuantificación de las áreas de los picos se usaron estándares de 8-oxodG y de dG de concentraciones conocidas.

## Estadística

Los datos se analizaron mediante el test de la t de Student, en el que el valor mínimo de significación se estableció en una p inferior a 0,05 en todos los análisis.

## Resultados

La tabla 2 recoge el peso corporal de los distintos órganos al final del período experimental. Como se puede observar, el tamaño del riñón fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ) en el grupo RAA (restringidos al 40% todos los aminoácidos de la dieta, excepto la metionina) que en el grupo control, no se observaron diferencias ni en el peso corporal ni en el del resto de los órganos ( $p > 0,05$ ). Esto no parece estar relacionado con efectos patológicos ya que se sabe que es el exceso de ingesta protéica, no su restricción moderada, lo que causa alteraciones renales en la rata de laboratorio.

La restricción de aminoácidos al 40%, excepto la metionina, no varió significativamente la producción basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las mitocondrias hepáticas ni con sustratos del complejo I (piruvato con malato y glutamato con malato) ni con sustratos del complejo II (succinato, con o sin rotenona) (fig. 1).

Las tasas máximas de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se midieron utilizando combinaciones adecuadas de sustratos e inhibidores

de la cadena respiratoria (fig. 1). El inhibidor respiratorio rotenona se añadió a las preparaciones mitocondriales supplementadas con piruvato con malato y con glutamato con malato para reducir completamente el complejo I y estudiar así la producción máxima de radicales libres por parte de este complejo. La producción de ROS fue menor en el grupo RAA (restringidos al 40% todos los aminoácidos de la dieta, excepto la metionina) que en el grupo control, y alcanzó la significación estadística ( $p < 0,05$ ) sólo en el caso del glutamato con malato (más rotenona), pero no alcanzó la significación estadística en el caso de piruvato con malato (más rotenona). Esto puede deberse a la mayor capacidad de reducción del complejo I cuando se usa glutamato con malato que cuando se usa piruvato con malato en el caso del hígado de rata. La adición del inhibidor AA al ensayo con succinato se empleó para estudiar la producción máxima de radicales libres del complejo III (completamente reducido). No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.

Las tasas de consumo de  $O_2$  no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales con ningún sustrato en estado 4 ni en estado 3 (tabla 3).

Cuando se comparó el porcentaje de electrones de la cadena respiratoria que da lugar a la formación de radicales libres (FRL) entre los grupos control y el grupo RAA (restringidos al 40% todos los aminoácidos de la dieta, excepto la metionina), aunque con todos los sustratos empleados se observó una tendencia al descenso en el grupo restringido, esta diferencia no resultó significativa ( $p > 0,05$ ) en ninguno de los casos (fig. 2).

**Tabla 2**  
Peso corporal y de los órganos (g) de los animales controles y RAA<sup>a</sup>

	Grupo control	Grupo RAA
Peso corporal (g)	397,25 ± 8,38	381,25 ± 7,22
Peso de órganos (g)		
Hígado	8,96 ± 0,37	8,57 ± 0,29
Corazón	0,87 ± 0,04	0,84 ± 0,02
Bazo	0,54 ± 0,02	0,50 ± 0,01
Riñón	2,10 ± 0,05	1,83 ± 0,03 <sup>b</sup>
Cerebro	2,01 ± 0,03	2,02 ± 0,06

RAA: restricción del 40% de todos los aminoácidos de la dieta, excepto la metionina.

<sup>a</sup> Los resultados representan la media ± error típico de 8 animales diferentes.

<sup>b</sup> Diferencia significativa entre los grupos control y RAA ( $p < 0,001$ ).

La concentración de 8-oxodG en el ADNm no varió entre los grupos experimentales ( $p > 0,05$ ) (fig. 3).

## Discusión

En este trabajo se ha estudiado por primera vez el efecto de la restricción de los aminoácidos de la dieta, excepto la metionina, sobre el estrés oxidativo mitocondrial en relación al papel que la RD ejerce sobre el incremento de la longevidad.

Con respecto a la producción de ROS, en el presente trabajo se demuestra que la restricción de los aminoácidos de la dieta (excepto la metionina) no produce un cambio en la tasa de generación de ROSm. Numerosos estudios recopilados de distintos laboratorios han demostrado de forma consistente que la RD disminuye la generación de ROSm en muchos tejidos, entre los que se incluye el hígado<sup>5</sup>. Un estudio llevado a cabo en el laboratorio de este equipo<sup>6</sup> encontró que la RP también disminuye la producción de ROSm en el complejo I, hace descender el porcentaje de FRL y disminuye el daño oxidativo al ADNm, de

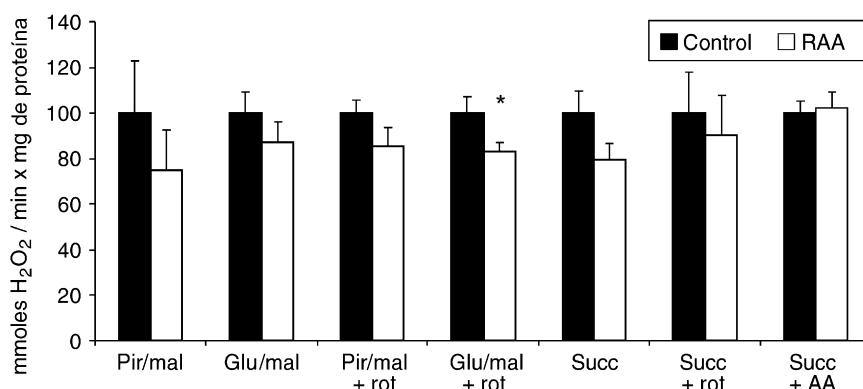
**Tabla 3**

Efecto de la restricción al 40% de todos los aminoácidos, excepto la metionina, sobre la tasa de consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado de rata supplementadas con distintos sustratos en ausencia (estado 4) y en presencia (estado 3) de difosfato de adenosina (ADP)

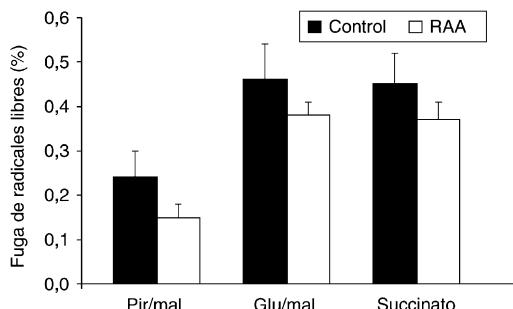
Sustrato	Grupo control	Grupo RAA
Pir/mal		
Estado 4	6,9 ± 0,8	7,4 ± 0,9
Estado 3	23,5 ± 1,7	24,5 ± 2,2
Glu/mal		
Estado 4	9,4 ± 1	9 ± 0,6
Estado 3	91,1 ± 3,9	88,9 ± 3,9
Succinato		
Estado 4	28 ± 2,7	26,5 ± 1,9
Estado 3	112,1 ± 8,3	103,5 ± 6,7
Glu/succ		
Estado 4	26 ± 2	23,9 ± 1,9
Estado 3	126,4 ± 5,5	123,5 ± 6,8

Glu/mal: glutamato con malato; Glu/succ: glutamato con succinato más rotenona; Pir/mal: piruvato con malato; Succinato: succinato más rotenona.

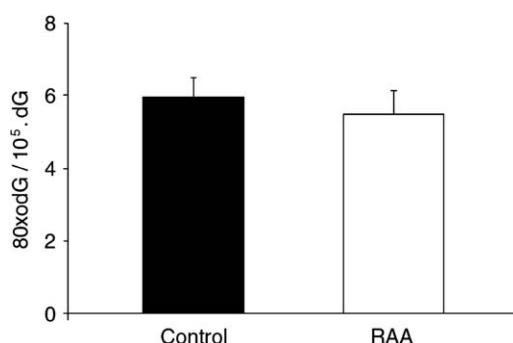
\*Los resultados se expresan en nanomoles de  $O_2/\text{min} \times \text{mg}$  de proteína mitocondrial. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales. Los valores se expresan como la media ± error típico de 8 animales diferentes.



**Figura 1.** Tasas basales y máximas de generación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (nanomoles de  $H_2O_2/\text{min} \cdot \text{mg}$  de proteína) en mitocondrias de hígado de ratas del grupo control y del grupo RAA (con restricción del 40% de todos los aminoácidos de la dieta, excepto la metionina) en presencia de piruvato con malato, glutamato con malato o succinato (con y sin rotenona) como sustratos. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el grupo control ( $p < 0,05$ ). Los valores representan la media ± error típico de 8 animales diferentes. Glu/mal: glutamato con malato; Glu/mal+rot: glutamato con malato más rotenona; Pir/mal: piruvato con malato; Pir/mal+rot: piruvato con malato más rotenona; Succ+AA: succinato con antimicina A (y rotenona); Succ+rot: succinato con rotenona. Valores control: 0,03 ± 0,005 (pir/mal); 0,08 ± 0,01 (glu/mal); 0,14 ± 0,01 (pir/mal+rot); 0,16 ± 0,01 (glu/mal+rot); 0,23 ± 0,02 (succ); 0,09 ± 0,02 (succ+rot) y 0,83 ± 0,04 (succ+AA).



**Figura 2.** Efecto de la restricción al 40% de todos los aminoácidos de la dieta, excepto la metionina (grupo RAA) sobre la fuga de radicales libres (porcentaje de fuga de radicales libres [%FRL]) en la cadena respiratoria mitocondrial. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p>0,05$ ). Los resultados se expresan como la media ± error típico de 8 animales diferentes. Glu/mal: glutamato con malato; Pir/mal: piruvato con malato; Succinato: succinato más rotenona.



**Figura 3.** Daño oxidativo (8-oxodG/ $10^5$  dG) al ADN mitocondrial en hígado de ratas del grupo control y del grupo con restricción del 40% de todos los aminoácidos de la dieta, excepto la metionina (RAA). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p>0,05$ ). Los resultados se expresan como la media±error típico de 8 animales diferentes.

forma que mimetiza a la RD tanto cualitativa como cuantitativamente; mientras que esto no ocurre tras restringir sólo los lípidos<sup>8</sup> o los carbohidratos de la dieta<sup>9</sup>. Posteriormente estudios han demostrado que, al restringir únicamente la metionina de la dieta, también desciende la generación de ROSm<sup>7,11</sup>. Por otra parte, mientras que la RD, la RP o la RMet incrementan la longevidad máxima en roedores de laboratorio, la restricción de carbohidratos o de lípidos no produce tal efecto<sup>10</sup>. El descenso en la generación mitocondrial de ROS que se observa durante la RMet apunta a la metionina como el único aminoácido de la dieta causante del descenso en la producción de ROS que ocurría tanto bajo la restricción calórica como en la RP. Pero antes de alcanzar esta conclusión era necesario estudiar el posible efecto de la restricción de los otros aminoácidos de la dieta. En el presente estudio, la ausencia de efecto de la restricción de todos los aminoácidos de la dieta (excepto la metionina) descarta tal posibilidad y finalmente demuestra, por primera vez, que la reducción en la ingesta de la metionina es el único factor causante del descenso en la tasa de generación de ROSm durante la RD.

En relación con el daño oxidativo, los valores de 8-oxodG en el ADNm no fueron diferentes en el grupo RAA con respecto al grupo control, de acuerdo con la ausencia de efecto de esta manipulación dietética sobre la generación de ROSm. Estudios previos han encontrado una estrecha relación entre los valores de 8-oxodG en el ADNm y la producción de ROSm en los modelos de restricción. Así, de forma similar a la generación de ROSm, el daño oxidativo al ADNm desciende en la RD<sup>17</sup>, la RP<sup>6</sup> y la RMet<sup>7,11</sup>, mientras que no varía durante la restricción de hidratos de carbono<sup>9</sup>, de lípidos<sup>8</sup> o

de todos los aminoácidos de la dieta, excepto la metionina. Todos estos resultados, tomados en conjunto, indican que la ingesta reducida de la metionina durante la RD es el único factor causante del descenso en la generación de ROSm y en el daño oxidativo al ADNm, lo que puede disminuir la tasa de acumulación de mutaciones en el ADNm y contribuir así a la extensión de la longevidad<sup>2</sup>. Aunque no se pueden extraer conclusiones directas en relación con los humanos, es posible que la dieta ideal para nuestra especie deba tener un contenido de metionina algo menor que el de las recomendaciones dietéticas americanas actuales (dosis de proteína de 0,8 g/kg/día).

Cabe mencionar que a pesar de los efectos negativos de la metionina en el estrés oxidativo, se trata de un aminoácido esencial que interviene en varios procesos bioquímicos como la síntesis de proteínas, la metilación del ADN en relación con la actividad génica o como intermediario para la síntesis de otros aminoácidos azufrados. En cuanto a los mecanismos que relacionan la presencia de la metionina en la dieta con la producción mitocondrial de ROS en los órganos vitales, éstos no se conocen, aunque estudios no publicados que se han realizado recientemente en este laboratorio en el que se expusieron directamente mitocondrias hepáticas a la metionina o a varios de sus metabolitos *in vitro* indican que al menos en parte puede haber un efecto directo de la misma metionina sobre las mitocondrias que estimule la producción de ROS. Por último, es interesante comentar que no parece ser necesario que la metionina esté libre en la dieta para que se produzca el descenso en la producción mitocondrial de ROS ya que este descenso se produce tanto en los experimentos de RMet<sup>7,11</sup> como en los de la RP<sup>6</sup> o la RD<sup>17</sup>.

En resumen, la restricción de los aminoácidos diferentes de la metionina de la dieta no cambió el consumo de oxígeno mitocondrial, la tasa de generación de radicales libres, la eficiencia de la cadena respiratoria en evitar la fuga univaleante de electrones hacia el O<sub>2</sub>, ni el daño oxidativo en el ADNm en el hígado de rata. Estos resultados, junto con varias investigaciones previas, muestran que el descenso en la generación de ROSm y el daño oxidativo al ADNm durante la RD, que parece estar implicado en la extensión de la longevidad durante esta manipulación experimental en mamíferos, se debe a la reducción de la ingesta de una única sustancia de la dieta, la metionina. Así pues, esta molécula sería también la causa de una parte importante del descenso de velocidad de envejecimiento que tiene lugar durante la restricción calórica.

## Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado con el apoyo de los proyectos I+D del Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2005-02584) y CAM/UCM-GR74/07 (CCG07-UCM/BIO-2648). Pilar Caro y José Gómez recibieron una beca predoctoral del Ministerio de Ciencia e Innovación (Beca del programa de Formación del Profesorado Universitario).

## 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.
- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Rad Biol Med*. 2007;43:477–503.
- 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.
- Gredilla R, Barja G. Minireview: The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology*. 2005;146:3713–7.

6. 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.
7. Sanz A, Caro P, Ayala V, Portero-Otin M, Pamplona R, Barja G. Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J.* 2006;20:1064–73.
8. Sanz A, Caro P, Sánchez JG, Barja G. Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. *Ann NY Acad Sci.* 2006;1067:200–9.
9. Sanz A, Gómez J, Caro P, Barja G. Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J Bioenerg Biomembr.* 2006;38:327–33.
10. Pamplona R, Barja G. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: The protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757:496–508.
11. Caro P, Gómez G, López-Torres M, Sánchez I, Naudí A, Jove M, et al. Forty and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology.* 2008;9:183–96.
12. Barja G. The quantitative measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 2002;34:227–33.
13. Sanz A, Barja G. Estimation of the rate of production of oxygen radicals by mitochondria. In: Conn M, editor. *Handbook of models for human aging.* New York: Academic Press; 2006. p. 183–9.
14. Latorre A, Moya A, Ayala A. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *PNAS USA.* 1986;83:8649–53.
15. Asunción JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.* 1996;10:333–8.
16. Loft S, Poulsen HE. Markers of oxidative damage to DNA: Antioxidants and molecular damage. *Methods Enzymol.* 1999;300:166–84.
17. López-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;32:882–9.