

Efecto de dos antioxidantes en la supervivencia, las actividades neurológicas y la función mitocondrial de ratones senescentes

A. Navarro^a, M.J. Bández^a, C. Gómez^a, H. González^a, N. Escudero^a, J.C. García-Ortiz^a, J.F. Carrión^a, M.J. Sánchez-Pino^a y J.M. López-Cepero^b

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz. Cádiz. España.

^bDepartamento de Histología. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz. Cádiz. España.

RESUMEN

Objetivos: valorar la influencia de tratamientos crónicos con los antioxidantes vitamina E y tioprolina en: **a)** la supervivencia de ratones; **b)** la actividad neurológica de los animales envejecidos, y **c)** la disminución de actividades enzimáticas mitocondriales y el daño oxidativo mitocondrial asociados al proceso de envejecimiento.

Material y método: los ratones recibieron desde la semana 28 de vida, y durante toda su vida, una suplementación en la dieta de vitamina E (5 g de acetato de dl- α -tocoferol/kg de comida) o de tioprolina (2 g de l-4-ácido tiazolidín carboxílico/kg de comida). Para evaluar la actividad neurológica los ratones se sometieron cada 2 semanas a 2 pruebas de comportamiento. En mitocondrias aisladas de cerebro se determinó el daño oxidativo, medido como proteínas o lípidos oxidados, así como por disminución de las actividades enzimáticas NADH-citocromo c reductasa, succinato-citocromo c reductasa, citocromo oxidasa y óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS).

Resultados: la expectativa de vida de los ratones macho aumentó después de la suplementación con vitamina E en un 34-34% (vida media y longevidad máxima, respectivamente), y después de la suplementación con tioprolina en un 33-24%. La vitamina E y la tioprolina fueron efectivas en la disminución de los marcadores mitocondriales de daño oxidativo (TBARS y carbonilos proteínicos), y en el retardo de la disminución de las actividades enzimáticas y neurológicas asociadas al envejecimiento.

Conclusiones: las actividades enzimáticas de mtNOS, NADH deshidrogenasa y citocromo oxidasa pueden usarse como indicadores de tratamientos efectivos del déficit neurológico asociado al envejecimiento.

Palabras clave

Envejecimiento. Estrés oxidativo. Actividad neurológica. Vitamina E. Tioprolina. Mitocondria. MtNOS. NADH deshidrogenasa. Citocromo oxidasa.

Effect of two antioxidants on survival, neurological activities and mitochondrial function in senescent mice

ABSTRACT

Aims: the aim of this study was to evaluate the influence of chronic treatments with the antioxidants vitamin E and thioproline on: 1) survival in mice; 2) the neurological activities of aged animals; and 3) the decreased mitochondrial enzymatic activities and oxidative damage associated with the ageing process.

Material and method: mice received food supplemented with vitamin E (5 g dl- α -tocopherol acetate/kg of food) or with thioproline l-4-thioproline/kg (2 g l-4-thiazolidine carboxylic acid/kg of food) from 28 weeks of age and during their entire lifespan. To evaluate neurological activity the animals underwent two behavioural tests every 15 days from weeks 28 to 76 of age. Oxidative damage to isolated brain mitochondria was evaluated by determining protein and lipid oxidation products and mitochondrial enzyme activities: NADH-cytochrome c reductase, succinate-cytochrome c reductase, cytochrome oxidase, and mitochondrial nitric oxide synthase (mtNOS).

Results: lifespan was increased in male mice by 34-34% (mean and maximal lifespan, respectively) after supplementation with 5 g vitamin E/kg food and by 33-24% (mean and maximal lifespan, respectively) after supplementation with 2 g thioproline/kg food. Vitamin E and thioproline were effective in decreasing the level of markers of oxidative damage (TBARS and protein carbonyls) in isolated mitochondria and in delaying the decreases in mitochondrial enzyme activities and the loss of neurological function associated with ageing.

Conclusions: the activities of mtNOS, NADH dehydrogenase and cytochrome oxidase can be used as indicators of the effectiveness of treatments for age-dependent neurological impairment.

Key words

Ageing. Oxidative stress. Neurological activity. Vitamin E. Thioproline. Mitochondria. MtNOS. NADH-dehydrogenase. Cytochrome oxidase.

Este estudio ha sido financiado por los proyectos FIS 99-1033 y 02-1354 del Ministerio de Sanidad y Consumo de España, y por el Plan Andaluz de Investigación 2000-03 (CTS-194).

Correspondencia: Prof. A. Navarro.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Facultad de Medicina.
Pº Fragela, 9. 11003 Cádiz. España.
Correo electrónico: ana.navarro@uca.es

Recibido el 8-03-05; aceptado el 20-03-05.

INTRODUCCIÓN

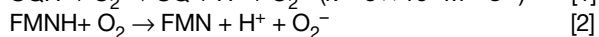
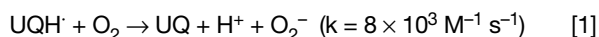
El envejecimiento es un proceso caracterizado por un declinar general de las funciones fisiológicas, con un efecto más marcado de las funciones cerebrales, tales

como coordinación neuromuscular, capacidades cognitivas y de relación con el entorno. La disminución de las actividades neurológicas en el envejecimiento normal está directamente relacionada con el estrés oxidativo^{1,2}, e inversamente relacionada con la expectativa de vida².

La teoría del envejecimiento por los radicales libres emerge desde las observaciones de Gershman et al³, que postularon que los radicales libres eran el mecanismo molecular común para el oxígeno y para la radiación tóxica, y de Harman (1956), que consideró que los radicales libres son generados como productos de las oxidaciones biológicas, y que producen un daño celular acumulativo que conduce al envejecimiento del tejido y del órgano. La asociación entre envejecimiento y mitocondrias está basada en el papel de estas organelas en la producción de la energía en las células y en el declinar fisiológico del gasto energético de los órganos en el envejecimiento⁴⁻⁶. La hipótesis mitocondrial del envejecimiento considera a la mitocondria como el marcapasos del envejecimiento tisular debido a la producción continua de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que en condiciones fisiológicas son mantenidas en una concentración baja en estado estacionario por las enzimas antioxidantes, pero que son capaces de reaccionar y dañar a las biomoléculas produciendo un daño oxidativo acumulado⁷.

Las mitocondrias producen 2 radicales libres oxidantes, el radical superóxido (O_2^-) y el óxido nítrico (NO) que son generados de forma primaria y continua en estas organelas, y de ellos derivan otras especies reactivas como H_2O_2 , $ONOO^-$, $HO^\cdot$, $ROO^\cdot$ y 1O_2 .

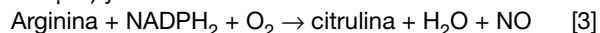
La cadena mitocondrial transportadora de electrones es el principal lugar de producción de O_2^- en las células aeróbicas de los mamíferos⁷. Las 2 reacciones principales productoras de O_2^- son: a) la autooxidación de la ubisemiquinona, conocida como la reacción de Boveris-Cadenas (reacción 1)⁸⁻¹⁰, que da cuenta de aproximadamente un 75% de la producción mitocondrial de O_2^- , y b) la autooxidación de la flavina semiquinona de la NADH deshidrogenasa, que genera el 25% restante (reacción 2)¹¹.



La reacción 1 libera O_2^- hacia ambos lados de la membrana mitocondrial interna: al lado de la matriz (lado N) donde es dismutado por la Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD)¹², y al espacio intermembranas donde es liberado al citosol a través de un canal aniónico dependiente de voltaje¹³.

Hace unos años, Ghafourifar y Richter¹⁴ y Giulivi et al¹⁵ describieron la producción mitocondrial de NO. Una óxido nítrico sintasa especializada (mtNOS)¹⁶ cataliza la clásica reacción de las NOS (reacción 3) que requiere

NADPH ($K_M = 15 \mu\text{M}$), arginina ($K_M = 6-12 \mu\text{M}$), O_2 ($K_M = 37-73 \mu\text{M}$) y Ca^{2+} /calmodulina^{17,18}.



Estos radicales libres, O_2^- y NO, son metabolizados en la matriz mitocondrial a través de la formación de H_2O_2 y $ONOO^-$ ¹⁹. Estas especies estables son potencialmente dañinas, pues producen $HO^\cdot$ ²⁰, un oxidante fuerte que inicia el proceso de la lipoperoxidación. Las reacciones de los radicales libres, con iniciación, propagación, inhibición y terminación, generan $ROO^\cdot$ y 1O_2 . Las especies H_2O_2 y $ONOO^-$ son detoxificadas por enzimas específicas y reductores en la matriz mitocondrial. El H_2O_2 es descompuesto por la glutatión peroxidasa en la matriz mitocondrial (la catalasa también se ha descrito como una enzima intramitocondrial²¹) y por la catalasa citosólica y la glutatión peroxidasa después de la difusión al citosol. El peroxinitrito es reducido por $NADH_2$, UQH_2 y GSH en la matriz mitocondrial²².

La concentración aumentada en estado estacionario de alguna de las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno constituye la base química de la situación biológica de estrés oxidativo. La persistencia de una situación de estrés oxidativo es considerado un factor que conduce al envejecimiento.

Hay un interés creciente en los cambios de las propiedades mitocondriales que tienen lugar durante el envejecimiento²³⁻³³, un interés que se extiende a los tratamientos antioxidantes, una condición que retarda el declinar de las funciones mitocondriales asociadas al envejecimiento. El papel de la vitamina E como antioxidante está bien caracterizado *in vitro*; además, está considerado como el más potente antioxidante lipofílico de los mamíferos, por reaccionar de forma específica con los radicales $ROO^\cdot$ ^{34,35}. Recientemente, a la vitamina E se le han reconocido importantes efectos no antioxidantes, como su papel regulador en la señalización celular, expresión genética, función inmune y respuesta inflamatoria³⁶⁻³⁸. Sin embargo, no está clara la información en relación con los efectos de la vitamina E sobre la vida media o la longevidad máxima de animales experimentales, ni su papel en el declinar de las funciones fisiológicas asociado a la edad³⁹⁻⁴¹.

La l-4-tioprolina (l-4-ácido tiazolidín carboxílico) tiene propiedades antioxidantes *in vitro*; por otra parte, cuando la tioprolina se administró a *Drosophila*, las moscas consumieron menos oxígeno y se incrementó su vida media⁴².

En este estudio pretendemos valorar la influencia de estos 2 antioxidantes en la supervivencia de ratones y en la prevención o retraso de la pérdida de la actividad neurológica asociada al envejecimiento. Por otra parte, pretendemos evaluar el papel protector de estas sustancias sobre el daño mitocondrial y la disminución de

las actividades enzimáticas mitocondriales asociadas al proceso de envejecimiento.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales

Se han utilizado ratones de la cepa Swiss CD-1/UCádiz criados en el Departamento de Experimentación Animal de la Universidad de Cádiz^{2,43}, que fueron estabulados en grupos de 5 animales a 22 ± 2 °C con ciclos luz/oscuridad 12 h/12 h y acceso libre al agua y la comida. Los ratones fueron semanalmente pesados y periódicamente se verificó que estaban libres de patógenos. Los experimentos se realizaron de acuerdo con la legislación vigente (86/609/CEE European Community y los Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings, de la American Physiological Society).

El grupo control recibió una comida estándar de animales de laboratorio (A04 diet, Panlab LS, Barcelona, España) con 38 mg *dl*- α -tocoferol acetato/kg de comida, mientras que los ratones tratados con vitamina E recibieron la misma comida suplementada con 5 g *dl*- α -tocoferol acetato/kg de comida y los ratones tratados con tioprolina suplementada con 2 g *l*-4-tioprolina/kg (*l*-4-ácido tiazolidín carboxílico). Los ratones recibieron los antioxidantes desde la semana 28 de edad (adultos jóvenes) hasta el final de su vida.

Pruebas para evaluar las capacidades neurológicas

Para evaluar la actividad neurológica los ratones se sometieron cada 2 semanas a 2 pruebas comportamentales, el ensayo de la cuerda tirante^{2,44} y el ensayo del laberinto en T². En el ensayo de la cuerda, que evalúa la coordinación neuromuscular^{2,44,45}, los ratones se sujetan por sus patas anteriores en la mitad de una cuerda tirante de 60 cm de largo, y se considera que han superado la prueba cuando alcanzan la columna situada al final de la cuerda en menos de 30 s. En el laberinto en T, que evalúa la actividad exploratoria espontánea^{2,45}, los ratones se sitúan en un laberinto en T con brazos de 50 cm, y se considera que la prueba ha sido exitosa cuando el ratón alcanza la intersección en menos de 30 s.

Aislamiento de mitocondrias

El cerebro se homogeneizó en un homogeneizador Potter con émbolo de teflón en manitol 0,23 M, sacarosa 0,07 M, EDTA 1 mM y Tris HCl 10 mM, pH 7,4, a una proporción de 9 ml del medio de homogeneización/1 g de tejido. El homogeneizado se centrifugó a 700 g/10 min y el sobrenadante a 8.000 g/10 min, las mitocondrias precipitadas se lavaron en las mismas condiciones^{2,43,46}. Las suspensiones mitocondriales, de una concentración del orden de 20 mg proteína/ml, fueron congeladas

inmediatamente en N₂ líquido y conservadas a -80 °C. Las muestras se congelaron y descongelaron 2 veces y se pasaron a través de una jeringa de tuberculina 15/10 para la obtención de membranas submitocondriales². La concentración de proteínas se determinó con el reactivo de Folin.

Biomarcadores de estrés oxidativo

El contenido mitocondrial de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y carbonilos proteicos se determinó en membranas submitocondriales como describieron respectivamente Fraga et al⁴⁷ y Oliver et al⁴⁸. Para la determinación de TBARS, se añadió 2 ml de 0,1 N HCl, 0,3 ml de ácido fosfotúngstico, y 1 ml de ácido 2-tiobarbitúrico al 0,67%, a 1 ml de membranas submitocondriales, se calentó durante 30 min en baño de agua hirviendo, y se extrajo con 5 ml de 1-butanol. La absorción de la fase de butanol separada mediante centrifugación suave, se midió a 535 nm ($\epsilon = 153 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se expresó como pmol TBARS/mg de proteína mitocondrial. Para la determinación de carbonilos proteicos se añadió 0,05 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% a 0,05 ml de membranas submitocondriales, las proteínas precipitadas se resuspendieron en 0,05 ml de 2,4-dinitrofenil-hidrazina al 0,2% (w/v), se incubó 1 h a 37 °C, se precipitó de nuevo con TCA, se centrifugó, se lavó con etanol:etil acetato (50:50), se disolvió en guanidina clorhidrato en amortiguador de fosfato (pH 6,5) 60 mM, y la absorbancia se determinó a 370 nm ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los carbonilos proteínicos se expresaron en pmol/mg de proteína mitocondrial.

Actividades de la cadena de transporte electrónico mitocondrial

Las actividades unidas a la membrana de los complejos I-III, II-III y IV se determinaron espectrofotométricamente a 30 °C con las membranas submitocondriales suspendidas en amortiguador de fosfato 100 mM (pH 7,4) añadiendo los correspondientes sustratos^{2,43}. Para determinar las actividades NADH-citocromo c reductasa (complejos I-III) y succinato-citocromo c reductasa (complejos II-III), se añadió como sustrato a las membranas submitocondriales NADH 0,2 mM o succinato 20 mM, citocromo c³⁺ 0,1 mM y KCN 1 mM, y la actividad enzimática se determinó a 550 nm ($\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se expresó como nmol citocromo c reducido/mg proteína mitocondrial. La actividad citocromo oxidasa (complejo IV) se determinó en el mismo medio de reacción añadiendo citocromo c²⁺ 0,1 mM, que se preparó por reducción con NaBH₄ y HCl. La velocidad de oxidación del citocromo c se calculó como constante (*k'*) de la reacción de primer orden/mg de proteína mitocondrial y se expresó como nmol citocromo c oxidado a 10 μ M de citocromo c/mg de proteína, lo que dio la velocidad del orden del transporte electrónico mitocondrial.

Determinación espectrofotométrica de actividad mtNOS (óxido nítrico sintasa mitocondrial)

La producción mitocondrial de NO se determinó mediante la técnica de la oxidación de la oxihemoglobina (HbO_2)¹⁸. El medio de reacción consistió en NADPH 0,1 mM, arginina 0,2 mM, CaCl_2 1 mM, Cu,Zn-SOD 4 μM , catalasa 0,1 μM y HbO_2 25 μM , en amortiguador de fosfato 50 mM a pH 5,8. Se utilizó un espectrofotómetro de arreglo de diodos (modelo 8453 Agilent Corp., Palo Alto, California, Estados Unidos) para registrar el cambio de absorbancia a 577 nm con una longitud de onda de referencia en el punto isosbético a 591 nm ($\epsilon_{577-591} = 11,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La producción de NO se calculó a partir de la inhibición del cambio de absorbancia por N^G -metil-L-arginina 2 mM, usualmente el 88-96%, y fue expresada en nmol NO/min mg proteína mitocondrial.

Estadística

Las curvas de supervivencia se analizaron con la prueba de Kaplan-Meier. Los números de las tablas y figuras son valores medios $\pm$ SEM. Las diferencias entre los grupos se analizaron por los ensayos *post hoc* de Student-Newman-Keuls cuando el análisis ANOVA de una vía fue significativo. Un valor de $p < 0,05$ se consideró biológicamente significativo. Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete SPSS 11.5 para Windows.

RESULTADOS

La figura 1 muestra que los ratones macho suplementados con tioprolina o con vitamina E tienen aumentada la vida media (el 33% con tioprolina y el 34% con vitamina E) y la longevidad máxima (el 24 y el 34%, respectivamente). Los ratones macho muestran un efecto

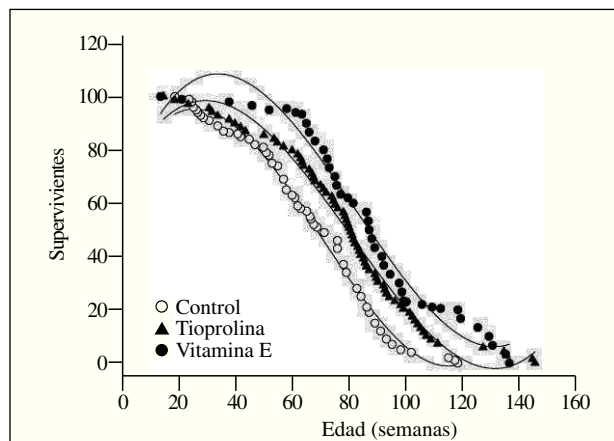


Figura 1. Curvas de supervivencia. 1) Ratones control ($n = 50$): vida media 61 $\pm$ 4 semanas, longevidad máxima 116 $\pm$ 4 semanas; 2) ratones suplementados con tioprolina ($n = 70$): vida media 80 $\pm$ 3 semanas, longevidad máxima 145 $\pm$ 3 semanas; 3) ratones suplementados con vitamina E ($n = 40$): vida media 85 $\pm$ 4 semanas, longevidad máxima 136 $\pm$ 4 semanas. La comparación de las curvas con la prueba de Kaplan-Meier da una significación de $p < 0,001$.

un 10-15% más marcado que los ratones hembra sujetos a los mismos tratamientos y condiciones (datos de las hembras no mostrados).

Los ratones fueron evaluados con las pruebas comportamentales de forma individual cada 2 semanas, empezando cuando tenían 28 semanas de vida y durante toda su vida. La coordinación neuromuscular se evaluó con la prueba de la cuerda tirante y la actividad exploratoria espontánea mediante el ensayo del laberinto en T^{2,43,44}. El porcentaje de éxitos en ambas pruebas decrece continuamente con el envejecimiento (fig. 2). Los éxitos en la prueba de la cuerda y del laberinto,

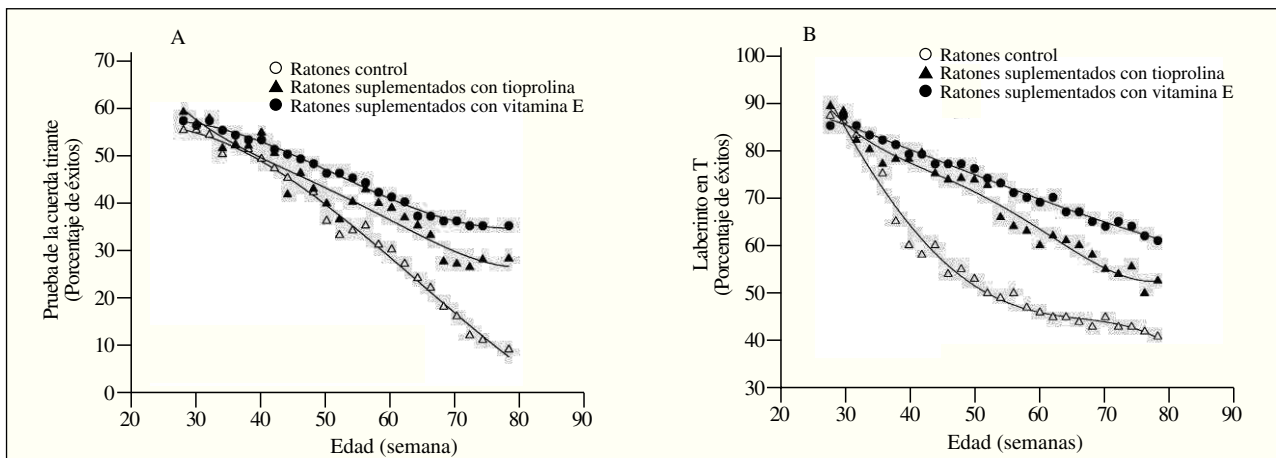


Figura 2. Efecto de las suplementaciones con tioprolina y con vitamina E en la capacidad neuromuscular y en la actividad exploratoria de los ratones. A) Prueba de la cuerda tirante: 1) ratones control: $r^2 = 0,97$; 2) ratones suplementados con tioprolina: $r^2 = 0,93$. p a las 76 semanas $< 0,001$; 3) ratones suplementados con vitamina E: $r^2 = 0,99$. p a las 52 semanas $< 0,05$; p a las 76 semanas $< 0,001$. B) Prueba del laberinto en T: 1) ratones control: $r^2 = 0,99$; 2) ratones suplementados con tioprolina: $r^2 = 0,97$. p a las 52 semanas $< 0,001$; p a las 76 semanas $< 0,001$; 3) ratones suplementados con vitamina E: $r^2 = 0,99$. p a las 52 semanas $< 0,01$; p a las 76 semanas $< 0,001$.

TABLA 1. Efecto de la suplementación con vitamina E o tioprolina en los productos de oxidación de proteínas y lípidos de mitocondrias de cerebro de ratón

Edad/biomarcador/grupo	28 semanas	52 semanas	76 semanas
<i>Carbonilos proteínicos</i>			
Control	48 ± 4	66 ± 5 ^a	85 ± 5 ^a
Vitamina E		52 ± 4	61 ± 5 ^b
Tioprolina		54 ± 4	60 ± 5 ^b
<i>TBARS</i>			
Control	4,9 ± 0,4	7,1 ± 0,4 ^a	9,1 ± 0,4 ^a
Vitamina E		6,6 ± 0,4	6,9 ± 0,4 ^b
Tioprolina		6,9 ± 0,4	7,1 ± 0,4 ^b

Los carbonilos proteínicos y los TBARS están expresados como pmol/mg proteína mitocondrial; 10 ratones en cada grupo. ^ap < 0,05 para la edad, comparación del grupo de 28 semanas con los de 52 y 76 semanas, respectivamente. ^bp < 0,05 para comparaciones entre grupos suplementados con vitamina E o tioprolina y grupo control.

considerando como referencia la capacidad de los ratones jóvenes de 28 semanas de vida, disminuyeron un 25 y un 29%, respectivamente, a las 52 semanas de edad (ratones adultos) y un 52 y un 41%, respectivamente, a las 76 semanas (ratones senescentes). La suplementación con los antioxidantes previno, en parte, el declinar en la coordinación neuromuscular y en la capacidad de exploración de los animales adultos y senescentes (fig. 2).

Se detectó un marcado aumento del contenido mitocondrial de los productos de las reacciones mediadas por radicales libres, indicativos de un daño a las proteínas y lípidos mitocondriales, y este incremento fue parcialmente prevenido por los antioxidantes suministrados (tabla 1). Las proteínas mitocondriales oxidadas, determinadas como carbonilos proteínicos, y tomando como valor de referencia el valor de los animales con 28 semanas de edad, se incrementaron en un 37 y un 77% a las 52 y las 76 semanas de edad, respectivamente. Este incremento de la oxidación proteica asociado a la edad fue marcadamente prevenido por la vitamina E y la tioprolina, en un 78 y un 67%, respectivamente, a las 52 semanas y en un 65 y un 68%, respectivamente, a las 76 semanas de vida (tabla 1). De forma similar, el contenido de TBARS, los productos de la oxidación de los lípidos, en mitocondrias de cerebro se incrementó un 45 y un 86% a las 52 y las 76 semanas, respectivamente, y el efecto fue prevenido por la vitamina E y la tioprolina, un 23 y un 10%, respectivamente, a las 52 semanas, y un 52 y un 48%, respectivamente, a las 76 semanas de vida (tabla 1).

Las actividades enzimáticas mitocondriales NADH-citocromo c reductasa, citocromo oxidasa y óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) disminuyeron casi linealmente entre las 28 y las 76 semanas de vida de los ratones, en un rango comprendido entre el 35 y el 67% (tabla 2). Una disminución de la actividad NADH-citocromo c reductasa sin que se afecte la actividad succinato-citocromo c reductasa se considera que se debe a una disminución selectiva de la actividad NADH-

deshidrogenasa^{2,43,46}. La disminución de las actividades enzimáticas en las mitocondrias de cerebro desde la semana 28 de edad a la 76 fueron: un 17-33% para la transferencia de electrones en el complejo I (NADH-deshidrogenasa), un 34-44% para la transferencia de electrones en el complejo IV (citocromo oxidasa) y un 52-72% para la mtNOS de la membrana mitocondrial. La suplementación con vitamina E o con tioprolina previno estas disminuciones enzimáticas asociadas al envejecimiento, en unos rangos comprendidos entre un 66 y un 98% (tabla 2). Por tanto, la suplementación con vitamina E o tioprolina puede prevenir la disminución de las actividades enzimáticas que se consideran marcadoras mitocondriales de envejecimiento⁴⁹: la actividad de mtNOS (en un 98%) y las actividades de NADH-citocromo c reductasa y citocromo oxidasa (en un 66-67%).

DISCUSIÓN

El valor de vitamina E utilizado en la dieta de los ratones se corresponde a una ingesta diaria de 10 mg/vitamina E/ratón. El contenido normal de vitamina E en la comida comercial utilizada para roedores en el laboratorio es de alrededor de 30-50 mg/kg. En los experimentos de suplementación con vitamina E informados en la bibliografía científica, esos valores se aumentaron al rango comprendido entre 400 a 5.000 mg/kg. Morley y Trainor³⁹ propusieron que la vitamina E (400 mg/kg) no tenía efecto en la vida media de los ratones. Por otra parte, Reckelhoff et al⁴⁰ demostraron que la vitamina E suministrada a ratas, desde la semana 52 a la 88 de edad, a una dosis de 5.000 mg/kg, previno el declinar de la función renal y la filtración glomerular asociados al envejecimiento, disminuyendo los valores de 8-isoprostanos y la actividad de hemo-oxigenasa, 2 marcadores de estrés y daño oxidativo. Meydani et al⁵⁰ publicaron que la vitamina E suministrada a ratones de 72 semanas de edad (1,3 nmol/g/ratón, equivalente a 1,2 mg vitamina E/día/ratón) no tenía efecto en la vida media

TABLA 2. Efectos de la vitamina E y la tioprolina en actividades enzimáticas mitocondriales de cerebro de ratón

Biomarcador/grupo	28 semanas	Edad 52 semanas	76 semanas
<i>NADH-citocromo c reductasa</i>			
Control	315 ± 10	260 ± 10 ^a	210 ± 10 ^a
Vitamina E		300 ± 10	285 ± 10 ^b
Tioprolina		290 ± 10	279 ± 10 ^b
<i>Succinato-citocromo c reductasa</i>			
Control	130 ± 9	133 ± 9	135 ± 9
Vitamina E		130 ± 9	138 ± 9
Tioprolina		128 ± 9	141 ± 9
<i>Citocromo oxidasa</i>			
Control	125 ± 9	83 ± 9 ^a	70 ± 9 ^a
Vitamina E		98 ± 9	112 ± 9 ^b
Tioprolina		100 ± 9	107 ± 8 ^b
<i>mtNOS</i>			
Control	0,65 ± 0,05	0,31 ± 0,04 ^a	0,18 ± 0,03 ^a
Vitamina E		0,56 ± 0,05 ^b	0,46 ± 0,05 ^b
Tioprolina		0,52 ± 0,05 ^b	0,44 ± 0,05 ^b

Las actividades NADH y succinato-citocromo c reductasa, y citocromo oxidasa están expresadas como nmol citocromo c (reducido o oxidado)/min mg proteína mitocondrial; la actividad mtNOS en nmol NO/min mg proteína mitocondrial; 10 ratones en cada grupo. ^ap < 0,05 para la edad, comparación del grupo de 28 semanas con los de 52 y 76 semanas, respectivamente. ^bp < 0,05 para comparaciones entre grupos suplementados con vitamina E o tioprolina y grupo control.

o en la longevidad máxima de los animales, pero reducía la lipoperoxidación e incrementaba la función inmune⁵⁰.

El papel de la tioprolina en la longevidad sólo ha sido investigado en *Drosophila*, y no existen datos en mamíferos. En *Drosophila*, como comentamos en la introducción, se produce un aumento de su vida media con una reducción del consumo de oxígeno⁴². En nuestros resultados se presenta una clara influencia en la supervivencia de los ratones, que podría estar relacionada con su acción antioxidante, pero que también podría ser debida a la marcada disminución del peso corporal que produce en los animales (un 30%), lo que podría estar relacionado con una menor ingesta de alimentos. Podemos, por tanto, suponer que el incremento de la vida media y la longevidad máxima de los ratones es producido por un mecanismo similar al ejercido por la restricción calórica⁵¹⁻⁵³.

Las alteraciones mitocondriales observadas durante el envejecimiento incluyen un incremento en el contenido de productos de oxidación y una disminución de la actividad funcional; las mitocondrias en estas condiciones se denominan mitocondrias disfuncionales⁴⁶.

En roedores viejos se ha demostrado un incremento de los productos de oxidación, una condición que define el estrés y el daño oxidativos. Los biomarcadores que se han encontrado aumentados son: carbonilos proteínicos^{1,43,46,54}, TBARS^{2,43,46}, ROOH, y 8-HO-dG^{28,55,56}. Los oxidantes generados en las reacciones de

los radicales libres presentan una selectividad en el daño a macromoléculas mitocondriales y a las funciones de la membrana mitocondrial⁵⁶⁻⁵⁸. Las mitocondrias disfuncionales tienen disminuida la capacidad para realizar la fosforilación oxidativa, el transporte electrónico, y actividades enzimáticas específicas. Se ha descrito que

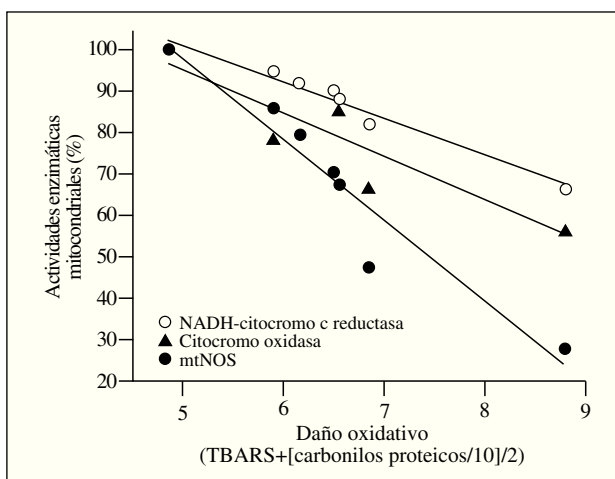


Figura 3. Correlación entre a) daño oxidativo ($0,5 \times [TBARS + \text{carbonilos proteicos}/10]$), y b) actividades enzimáticas mitocondriales: NADH-citocromo c reductasa, citocromo oxidasa y xido n trico sintasa mitocondrial (actividades expresadas en porcentajes). Daño oxidativo frente a actividad NADH citocromo c reductasa, $r^2 = 0,96$; daño oxidativo frente a actividad citocromo oxidasa, $r^2 = 0,76$; daño oxidativo frente a mtNOS, $r^2 = 0,92$.

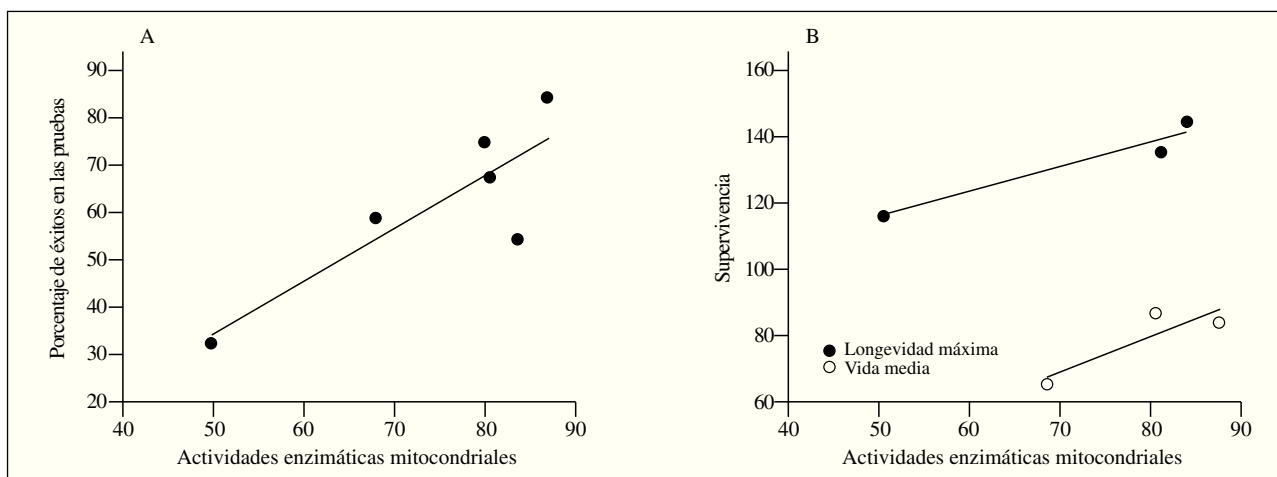


Figura 4. Correlación entre actividades enzimáticas mitocondriales (promedio de los porcentajes de actividad de NADH-citocromo c reductasa, citocromo oxidasa y mtNOS) a las 28, 52 y 78 semanas de edad con: A) Éxitos en las pruebas de la cuerda tirante y en el laberinto en T a las mismas edades ($r^2 = 0,72$), y B) vida media ($r^2 = 0,78$) y longevidad máxima ($r^2 = 0,95$) de los ratones.

un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, caracterizado por un incremento del consumo de oxígeno en el estado 4 de respiración, el estado de reposo, es un proceso que indica un aumento de la permeabilidad pasiva a los H^+ , y una disminución del control respiratorio y el potencial de membrana^{28,29,59}.

En nuestros estudios hemos observado en ratas y ratones viejos una disminución en la transferencia de electrones por la cadena transportadora mitocondrial en los complejos I y IV (NADH-ubiquinol reductasa y citocromo oxidasa), mientras que no se afectan los complejos II y III^{2,43,46,60}. La disminución en la actividad citocromo oxidasa en los roedores viejos también se ha informado en estudios histoquímicos y por la determinación de la actividad enzimática^{2,23,24,27,43,46}.

El daño oxidativo mitocondrial se correlaciona de forma negativa con las actividades enzimáticas mitocondriales (fig. 3), y esto sugiere que el proceso de la lipoperoxidación y sus productos intermediarios constituyen el mecanismo molecular que origina la disminución de las actividades enzimáticas ligadas a la membrana mitocondrial interna.

El retardo en el declinar de las actividades enzimáticas mitocondriales de los animales suplementados con vitamina E y tioprolina se correlacionó con un incremento en la supervivencia de los animales (fig. 4B). Esos animales no sólo aumentaron su expectativa de vida, sino que también presentaron unas capacidades neurológicas superiores a los animales sin tratar (fig. 4A). La vitamina E y la tioprolina pueden incrementar la supervivencia por disminuir el daño oxidativo celular y por prevenir la disminución de las funciones mitocondriales que acompañan al declinar de las funciones fisiológicas durante el envejecimiento. Por tanto, estas dietas suplementadas con vitamina E y tioprolina son capaces de

originar respuestas reguladoras que retardan los procesos dependientes de la edad, como la pérdida de las capacidades neurológicas, el desarrollo del daño oxidativo celular y la disminución de las actividades enzimáticas mitocondriales. Estos efectos beneficiosos podrían involucrar mecanismos de regulación genómica⁶¹⁻⁶⁴.

Las actividades enzimáticas mitocondriales, mtNOS, NADH deshidrogenasa y citocromo oxidasa pueden ser utilizadas como marcadores de envejecimiento cerebral. Hemos observado que las disminuciones de sus actividades están directamente relacionadas con las pérdidas de las funciones neurológicas durante el envejecimiento de los ratones.

BIBLIOGRAFÍA

- Forster MJ, Dubey A, Dawson KM, Stutts WA, Lal H, Sohal RS. Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:4765-9.
- 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 Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282:R985-92.
- Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 1954;119:623-6.
- Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc*. 1972;20:145-7.
- Miquel J, Fleming J. Theoretical and experimental support for an «oxygen radical injury» hypothesis of cell aging. En: Johnson JE, Waldorf R, Harman D, Miquel J, editors. *Free radicals, aging and degenerative diseases*. New York: Alan R. Liss; 1986. p. 51-74.
- Boveris A. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging (Milano)*. 1993;5:3-17.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979;59:527-605.
- Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett*. 1975; 54:311-4.
- Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 1976;156:435-44.

10. Cadenas E, Boveris A. Enhancement of hydrogen peroxide formation by photophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochem J.* 1980;188:31-7.
11. Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 1980;191:421-7.
12. Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubiquinolone. *IUBMB Life.* 2000;50:245-50.
13. Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem.* 2003;278:5557-63.
14. Ghafoorifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 1997;418:291-6.
15. Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* 1998;273:11038-43.
16. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2002;277:38079-86.
17. Tatoyan A, Giulivi C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1998;273:11044-8.
18. Boveris A, Arnaiz SL, Bustamante J, et al. Pharmacological regulation of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods Enzymol.* 2002;359:328-39.
19. Poderoso JJ, Lisdero C, Schopfer F, et al. The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J Biol Chem.* 1999;274:37709-16.
20. Radi R. Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem Res Toxicol.* 1998;11:720-1.
21. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 1991;266:22028-34.
22. Valdez LB, Álvarez S, Arnaiz SL, et al. Reactions of peroxynitrite in the mitochondrial matrix. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:349-56.
23. Troughton I, Byrne E, Marzuki S. Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet.* 1989;1:637-9.
24. Benzi G, Pastoris O, Marzatico F, Villa RF, Dagani F, Curti D. The mitochondrial electron transfer alteration as a factor involved in the brain aging. *Neurobiol Aging.* 1992;13:361-8.
25. Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Takasawa M, Ozawa T. Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Mol Cell Biochem.* 1993;119:95-103.
26. Sohal RS, Agarwal S, Candas M, Forster MJ, Lal H. Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev.* 1994;76:215-24.
27. Martínez M, Ferrández ML, De Juan E, Miquel J. Age-related changes in glutathione and lipid peroxide content in mouse synaptic mitochondria: relationship to cytochrome c oxidase decline. *Neurosci Lett.* 1994;170:121-4.
28. Sastre J, Millán A, García A, et al. A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1998;24:298-304.
29. Nakahara H, Kanno T, Inai Y, et al. Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Radic Biol Med.* 1998;24:85-92.
30. Beckman KB, Ames BN. Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;854:118-27.
31. Vina J, Sastre J, Pallardó F, Borràs C. Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5:549-56.
32. Chomyn A, Attardi G. MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304:519-29.
33. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998;78:547-81.
34. Ingold KU, Webb AC, Witter D, Burton GW, Metcalfe TA, Muller DP. Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Arch Biochem Biophys.* 1987;259:224-5.
35. Sies H. Carotenoids and tocopherols as antioxidants and singlet oxygen quenchers. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1992; Spec No:27-33.
36. Packer L, Weber SU, Rimbach G. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J Nutr.* 2001;131:S369-73.
37. Azzi A, Ricciarelli R, Zingg JM. Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E). *FEBS Lett.* 2002;519:8-10.
38. Zingg JM, Azzi A. Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr Med Chem.* 2004;11:1113-33.
39. Morley AA, Trainor KJ. Lack of an effect of vitamin E on lifespan of mice. *Biogerontology.* 2001;2:109-12.
40. Reckelhoff JF, Kanji V, Racusen LC, et al. Vitamin E ameliorates enhanced renal lipid peroxidation and accumulation of F2-isoprostanes in aging kidneys. *Am J Physiol.* 1998;274:R767-74.
41. Blackett AD, Hall DA. Vitamin E—Its significance in mouse ageing. *Age Ageing.* 1981;10:191-5.
42. Miquel J, Fleming J, Economos AC. Antioxidants, metabolic rate and aging in *Drosophila*. *Arch Gerontol Geriatr.* 1982;1:159-65.
43. Navarro A, Gómez C, López-Cepero JM, Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286:R505-11.
44. Miquel J, Blasco M. A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. *Exp Gerontol.* 1978;13:389-96.
45. De la Fuente M, Minano M, Manuel V, et al. Relation between exploratory activity and immune function in aged mice: a preliminary study. *Mech Ageing Dev.* 1998;102:263-77.
46. Navarro A, Boveris A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287:R1244-9.
47. Fraga CG, Leibovitz BE, Tappel AL. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic Biol Med.* 1988;4:155-61.
48. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem.* 1987;262:5488-91.
49. Navarro A. Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. *Mol Aspects Med.* 2004;25:37-48.
50. Meydani M, Lipman RD, Han SN, et al. The effect of long-term dietary supplementation with antioxidants. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;854:352-60.
51. Drew B, Phaneuf S, Dirks A, et al. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284:R474-80.
52. Forster MJ, Morris P, Sohal RS. Genotype and age influence the effect of caloric intake on mortality in mice. *FASEB J.* 2003;17:690-2.
53. Wu A, Sun X, Liu Y. Effects of caloric restriction on cognition and behavior in developing mice. *Neurosci Lett.* 2003;339:166-8.
54. Stadtman ER. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:597-604.
55. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:10771-8.
56. Ames BN. Measuring oxidative damage in humans: relation to cancer and ageing. *IARC Sci Publ.* 1988;89:407-16.
57. Ames BN, Elson-Schwab I, Silver EA. High-dose vitamin therapy stimulates various enzymes with decreased coenzyme binding affinity (increased K_m): relevance to genetic disease and polymorphisms. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:616-58.
58. Sohal RS, Orr WC. Role of oxidative stress in senescence. *Aging (Milano).* 1998;10:149-51.
59. Hagen TM, Wehr CM, Ames BN. Mitochondrial decay in aging. Reversal through supplementation of acetyl-L-carnitine and N-tert-butyl-alpha-phenyl-nitron. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;854:214-23.
60. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1366:53-67.
61. Radak Z, Takahashi R, Kumiyama A, et al. Effect of aging and late onset dietary restriction on antioxidant enzymes and proteasome activities, and protein carbonylation of rat skeletal muscle and tendon. *Exp Gerontol.* 2002;37:1423-30.
62. Churchill JD, Gálvez R, Colcombe S, Swain RA, Kramer AF, Greenough WT. Exercise, experience and the aging brain. *Neurobiol Aging.* 2002;23:941-55.
63. Welle S, Glueck SB. In for the long run: focus on «Lifelong voluntary exercise in the mouse prevents age-related alterations in gene expression in the heart». *Physiol Genomics.* 2003;12:71-2.
64. Bronikowski AM, Carter PA, Morgan TJ, et al. Lifelong voluntary exercise in the mouse prevents age-related alterations in gene expression in the heart. *Physiol Genomics.* 2003;12:129-38.