

# Relación entre el estrés oxidativo mitocondrial y la velocidad del envejecimiento

G. Barja

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

Los estudios descritos en este trabajo han sido subvencionados en parte por el proyecto SAF2002-01635.

## RESUMEN

Aunque se han propuesto muchas teorías diferentes sobre las causas del envejecimiento, la teoría de los radicales libres es la que disfruta de más apoyos a su favor en la bibliografía científica. En el presente artículo se revisan los trabajos publicados sobre la relación entre la longevidad máxima de las distintas especies animales y sus valores endógenos de antioxidantes y de generación de radicales de oxígeno. La mayoría de los estudios sobre suplementación experimental con antioxidantes indican que pueden aumentar la esperanza de vida pero no cambian la longevidad máxima. Además, los antioxidantes endógenos correlacionan de forma negativa con la longevidad máxima. Sin embargo, la intensidad de producción mitocondrial de radicales de oxígeno y el daño oxidativo al ADN mitocondrial son menores en los animales longevos que en los de vida corta. Los animales longevos también muestran un menor grado de insaturación de los ácidos grasos de sus membranas tisulares que las especies de vida corta. Por otra parte, la restricción calórica, la única manipulación experimental que disminuye la velocidad del envejecimiento, también disminuye la producción mitocondrial de radicales libres y el daño oxidativo al ADN mitocondrial. Este descenso ocurre en el complejo I. Estos resultados sugieren que se han utilizado mecanismos similares para aumentar la longevidad en la restricción calórica y durante la evolución de especies animales con distinta velocidad de envejecimiento, y que dichos mecanismos incluyen un descenso en el estrés oxidativo mitocondrial.

## Palabras clave

Radicales libres. Mitocondrias. Envejecimiento. Longevidad. ADN.

## Relationship between mitochondrial oxidative stress and rate of ageing

### ABSTRACT

Although many theories have been put forward on the causes of ageing, the explanation that has received greatest support in the scientific literature is the free radical theory. The present article reviews the studies published on the relationship between maximal longevity of the distinct animal species and their endogenous antioxidant levels and oxygen radical generation. Most studies on experimental supplementation with antioxidants indicate that they can increase life expectancy but do not change maximal longevity. Moreover, endogenous antioxidants are negatively correlated with maximal longevity. However, the intensity of mitochondrial production of oxygen radicals and oxidative damage to mitochondrial DNA are lower in longevous animals than in short-lived animals. Longevous animals also show a lower grade of fatty acid unsaturation in tissue membranes than short-lived species. Caloric restriction, the only experimental procedure that reduces the rate of ageing, also reduces mitochondrial production of free radicals and oxidative damage to mitochondrial DNA. This decrease occurs in complex I. These results suggest that similar mechanisms are used to increase longevity in caloric restriction and during the evolution of animal species with different rates of ageing and that these mechanisms include a decrease in mitochondrial oxidative stress.

### Key words

Free radicals. Mitochondria. Ageing. Longevity. DNA.

## INTRODUCCIÓN

Las células aerobias producen continuamente especies reactivas derivadas del oxígeno como el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo (*reactive oxygen species* [ROS]). Estas sustancias atacan continuamente a todos los tipos de macromoléculas biológicas. Aunque la producción de ROS puede aumentar mucho en varias situaciones patológicas, en el individuo sano hay una producción celular baja pero continua de ROS. La mayor parte de dicha producción procede de la

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

Recibido el 15-02-05; aceptado el 16-02-05.

cadena respiratoria mitocondrial. La idea de que los radicales libres de origen mitocondrial son una de las principales causas del envejecimiento<sup>1</sup> tiene cada vez más apoyos en la bibliografía científica<sup>2-5</sup>. Cualquier teoría del envejecimiento debe ser capaz de explicar 3 de sus características principales: es progresivo, universal y endógeno. El carácter progresivo del envejecimiento significa que ocurre a lo largo de toda la vida del individuo, tanto joven como viejo, con una intensidad más o menos constante. Además, todos los individuos envejecen, y lo mismo puede decirse de prácticamente todas las especies animales multicelulares, especialmente de aquellas que, como la humana, dejan de crecer al alcanzar el desarrollo adulto. Por último, el origen del envejecimiento es interno, lo que explica que el envejecimiento continúe aunque se proteja al individuo de toda fuente de daño procedente del medio ambiente. Este carácter endógeno también explica por qué las distintas especies animales envejecen a velocidades enormemente diferentes aunque vivan en el mismo ambiente. Los factores externos no pueden ser causa del proceso intrínseco del envejecimiento. Esto significa que la velocidad del envejecimiento de cada especie animal y, por tanto, su longevidad máxima, está determinada fundamentalmente por sus genes, no por el medio ambiente. La teoría del envejecimiento por radicales libres de origen mitocondrial encaja con esas 3 características del envejecimiento, ya que todas las células de los órganos vitales producen ROS de forma continua en sus mitocondrias, una fuente endógena.

## LONGEVIDAD MÁXIMA Y ANTIOXIDANTES

La producción de radicales libres en las células está contrarrestada, aunque sólo parcialmente, por los antioxidantes endógenos celulares, para producir un equilibrio en el estrés oxidativo compatible con la viabilidad celular. La mayoría de los estudios sobre longevidad animal realizados inicialmente se centraron en los factores antioxidantes más que en los prooxidantes, ya que los primeros eran mucho más fáciles de medir. Una de las primeras hipótesis que se plantearon fue que el envejecimiento podría deberse a un descenso en las concentraciones de antioxidantes conforme el individuo envejece. Esta idea se descartó en cuanto se observó que las variaciones en las concentraciones de antioxidantes celulares en función de la edad no seguían un patrón uniforme, ya que disminuían, aumentaban, o no variaban en los animales viejos según el antioxidante medido, el órgano estudiado o la especie o cepa animal elegida<sup>6,7</sup>. Otros autores propusieron, sin embargo, basándose en algunos estudios comparados iniciales, que los antioxidantes eran factores determinantes de la longevidad<sup>8,9</sup>. Esto se basaba en la observación de que algunos antioxidantes como la actividad de la CuZnSOD (superóxido dismutasa) correlacionaban positivamente con la longevidad máxima de los mamíferos, aunque esto sólo ocurría después de dividir dicha actividad por la tasa metabólica del animal<sup>8,9</sup>. Puesto que los animales

comparados por estos autores tenían tamaños corporales muy diferentes, y los animales grandes tienen tasas metabólicas específicas menores que los pequeños, las correlaciones positivas observadas con la longevidad máxima se debían al menor consumo de oxígeno por unidad de masa de los animales longevos, no a que tuviesen más CuZnSOD. De hecho, el trabajo original mostraba la ausencia de correlación entre la CuZnSOD y la longevidad máxima<sup>8</sup>. Cuando los valores de los distintos tipos de antioxidantes tisulares se relacionaron con la longevidad máxima sin realizar ningún tipo de transformación matemática, de los 12 trabajos publicados realizados en 7 laboratorios diferentes 10 mostraron que las enzimas antioxidantes y los antioxidantes de bajo peso molecular correlacionan de forma negativa con la longevidad máxima<sup>10</sup>, mientras que en los otros 2 trabajos no se observó correlación<sup>8,11</sup>. Estas correlaciones negativas constituyen el indicio principal de que la intensidad de generación de radicales libres en los tejidos *in vivo* tiene que ser menor en las especies longevas que en las que muestran un velocidad de envejecimiento más rápida.

Otra fuente de información importante son los estudios experimentales acerca de los efectos sobre la longevidad de la manipulación de los antioxidantes tisulares a lo largo de todo el ciclo vital de los animales. De un total de 16 estudios de este tipo, realizados mediante suplementación de antioxidantes en la dieta, inducción farmacológica, o con técnicas transgénicas, en 4 estudios aumentó ligeramente la longevidad máxima<sup>12-15</sup>, mientras que en los 12 restantes dicha longevidad no se modificó<sup>16-27</sup>. Esta tendencia general a una ausencia de efecto de los antioxidantes sobre la velocidad del envejecimiento es más evidente en los vertebrados, en los que de un total de 8 estudios, sólo 1 describió un aumento de un 12% en la longevidad máxima de los ratones, mientras que en los otros 7 no se encontraron efectos en ranas, ratones o ratas<sup>16,17,19,20,22-27</sup>. De acuerdo con esto, se ha observado que la sobreexpresión de la CuZnSOD en un 50-300% en varios tejidos de ratones transgénicos da lugar a un fenotipo patológico en muchos órganos vitales con una longevidad máxima igual o incluso más corta que la de los controles y una mayor resistencia al estrés<sup>28</sup>. En otro estudio la sobreexpresión de la CuZnSOD 4-13 veces por encima de lo normal en el ratón generó un amplio abanico de cambios neurodegenerativos incluyendo el hinchamiento y vacuolización de las mitocondrias neuronales, degeneración axónica y pérdida de motoneuronas espinales durante el envejecimiento<sup>29</sup>. También se ha descrito en *Drosophila melanogaster* que la sobreexpresión de la glutatión reductasa aumenta la resistencia al estrés sin cambiar la longevidad máxima<sup>30</sup>, mientras que en los ratones la sobreexpresión de la MnSOD aumenta la resistencia a la hiperoxia<sup>31</sup>, pero la sobreexpresión de la CuZnSOD en el ratón no afecta a la longevidad<sup>32</sup>. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió con la longevidad máxima, en los estudios arriba citados sí se encontró frecuentemente que la esperanza media de vida sube en los

TABLA 1. Resumen de estudios comparados sobre la producción mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en especies animales con distintas longevidades máximas

<i>Especies comparadas</i>	<i>Longevidad</i>	<i>Órgano estudiado</i>	<i>Correlación con</i>	
6 mamíferos	3,5-30	Hígado	Negativa	78
7 mamíferos	3,5-30	Corazón, riñón	Negativa	43
Ratón frente a <i>P. leucopus</i>	3,5 frente a 8	Corazón, cerebro	Negativa	79
Ratón frente a periquito	3,5 frente a 21	Corazón	Negativa	80
Ratón frente a canario	3,5 frente a 24	Corazón	Negativa	80
Rata frente a paloma	4 frente a 35	Corazón, cerebro, riñón	Negativa	81
Rata frente a paloma	4 frente a 35	Cerebro, hígado, pulmón	Negativa	82
Rata frente a paloma	4 frente a 35	Corazón	Negativa	83
Rata frente a paloma	4 frente a 35	Cerebro (no sinápticas)	Negativa	84

En todos los estudios se observó que las mitocondrias de los animales longevos producían menos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por unidad de tiempo que las de las especies de vida corta.

animales con concentraciones de antioxidantes tisulares aumentadas. Esto sugiere que los antioxidantes pueden proteger de forma inespecífica contra muchas causas de muerte prematura; es decir, que pueden aumentar la probabilidad de supervivencia, especialmente cuando los experimentos se realizan en condiciones subóptimas. Esto se debe, al menos en parte, a la capacidad de los antioxidantes para reaccionar con inducciones protectoras frente a los aumentos de estrés oxidativo de origen exógeno. Estos efectos protectores podrían tener gran importancia para evitar la muerte prematura en el hombre, especialmente en el caso de poblaciones que viven en condiciones ambientales subóptimas que dan lugar a curvas de supervivencia poco rectangulares. Sin embargo, la ausencia general de efecto de los antioxidantes sobre la longevidad máxima indica que no son capaces de ralentizar la velocidad del proceso intrínseco de envejecimiento.

Muchos experimentos realizados en animales *knockout* para genes que codifican enzimas antioxidantes están de acuerdo también con ese concepto. Así, la velocidad del envejecimiento no cambia en ratones homocigotos *knockout* para la CuZnSOD<sup>33,34</sup>, la SOD extracelular<sup>35</sup> o la glutatión peroxidasa<sup>36</sup>, o heterocigotos *knockout* para la MnSOD<sup>37</sup>. En estos casos, los efectos se limitan a una ausencia de efecto<sup>37,38</sup> o a una sensibilidad mayor que la normal al estrés<sup>33,35,39,40</sup>. En el caso de ratones homocigotos *knockout* para la MnSOD, la ausencia de la enzima produce un fenotipo fuertemente patológico, que da lugar a una cardiomiopatía dilatada y a la muerte a los pocos días de vida<sup>41,42</sup>, y que es completamente distinto del proceso del envejecimiento. En resumen, todos los tipos de estudios realizados indican que los antioxidantes pueden incrementar la esperanza de vida en ciertas condiciones, pero no modifican la velocidad del envejecimiento.

### PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE RADICALES LIBRES, DAÑO AL ADN MITOCONDRIAL Y LONGEVIDAD MÁXIMA

En el apartado anterior hemos visto que los antioxidantes no modifican la velocidad del envejecimiento. Esto lleva a preguntarse cuáles son entonces los factores que establecen la conexión entre el estrés oxidativo y el envejecimiento. Los estudios disponibles apuntan ya a 2 parámetros como responsables de dicha relación. El primer parámetro descubierto que correlaciona con la velocidad del envejecimiento en el sentido apropiado es la intensidad de generación mitocondrial de ROS. Todos los estudios realizados hasta la fecha han encontrado que la producción de ROS de las mitocondrias aisladas de tejidos posmitóticos es menor en las especies animales longevas que en las de vida corta<sup>5,43,44</sup> (tabla 1). Esto es cierto en todo tipo de animales homeotermos longevos, tanto si su tasa de consumo de oxígeno es lenta (como en los mamíferos de gran tamaño corporal), como si es rápida (como en las aves de pequeño tamaño). Esta observación clave puede explicar también por qué la correlación entre antioxidantes y longevidad máxima es negativa: los animales longevos tienen concentraciones bajas de antioxidantes simplemente porque producen pocos ROS por unidad de tiempo.

Por otra parte, se ha encontrado que el daño oxidativo al ADN mitocondrial de corazón y cerebro, medido como 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), correlaciona también negativamente con la longevidad máxima en los homeotermos (incluyendo a aves y mamíferos), mientras que esto no ocurre en el caso del ADN nuclear<sup>45,46</sup>. Además, de acuerdo con datos preliminares de hígado de rata<sup>47</sup>, estudios realizados en el corazón y el cerebro de 11 especies de mamíferos y aves ha demostrado que los valores de daño oxidativo son varias veces mayores en el ADN mitocondrial que en el ADN nuclear<sup>45</sup>. La mayor parte de los trabajos realizados también han encontrado que los valores de 8-oxodG en el ADN mitocondrial y

nuclear de cerebro, corazón e hígado aumentan moderadamente con la edad en roedores o en la especie humana<sup>48-51</sup>.

Puesto que ahora se sabe que existen sistemas enzimáticos de reparación de la 8-oxodG no sólo en el núcleo, sino también en las mitocondrias, se ha sugerido que los aumentos en el daño oxidativo al ADN con la edad reflejan que el flujo de daño oxidativo (ataque y reparación) a través del ADN es mayor en los animales viejos que en los jóvenes<sup>52</sup>. Análogamente, los resultados de las comparaciones entre especies también reflejan que dicho flujo es mayor en el ADN mitocondrial de los animales de ciclo vital corto que en el de los animales longevos, y lo mismo se puede decir del flujo de daño oxidativo a través del ADN mitocondrial comparado con el flujo a través del ADN nuclear en cada especie animal<sup>45,46</sup>. Así, cuanto mayor es la longevidad máxima de una especie, menor es la intensidad de ataque oxidativo a su ADN mitocondrial<sup>52</sup>. ¿Sería esto relevante para el envejecimiento a pesar de la presencia de reparación de la 8-oxodG en las mitocondrias? Lo sería, porque los ROS causan muchos tipos de daño en el ADN además de la formación de 8-oxodG, y varias de esas formas de daño no se reparan de forma eficiente y se acumulan con la edad. Así, la mayor producción mitocondrial de ROS de los animales de vida corta puede ser una causa importante de su velocidad mucho mayor de acumulación de mutaciones somáticas en el ADN mitocondrial. Dicha acumulación necesita 70-100 años para ocurrir en el hombre, pero se da en sólo 2-3 años en el ratón. Además, puesto que la presencia de 8-oxodG en el ADN es mutagénica<sup>53</sup>, la concentración más alta de 8-oxodG de los animales de vida corta en relación con los longevos también contribuiría a su mayor tasa de acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial. Los mayores valores de 8-oxodG del ADN mitocondrial en relación con el nuclear pueden explicar también la mayor intensidad de acumulación de mutaciones somáticas del primero. El resultado final es un compromiso de la función mitocondrial progresivamente mayor conforme aumenta la edad del individuo, lo que supone, entre otros cambios, deficiencias en la cadena respiratoria mitocondrial y finalmente una limitación de la producción máxima de ATP para su utilización en el metabolismo celular.

### **GRADO DE INSATURACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y LONGEVIDAD MÁXIMA**

Aparte de la producción mitocondrial de ROS, se ha descubierto un segundo parámetro relacionado con el estrés oxidativo que también correlaciona con la longevidad máxima en el sentido adecuado: el grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares de los órganos vitales. Estudios iniciales que no trataban sobre longevidad encontraron que el número total de dobles enlaces de los ácidos grasos (el índice de dobles enlaces) correlacionaba negativamente con el tamaño corporal en los mamíferos<sup>54</sup>. Luego se observó que las aves, que son

mucho más longevas que los mamíferos, también tienen un menor índice de dobles enlaces que los mamíferos de igual tamaño corporal y tasa metabólica<sup>55-57</sup>. Los ácidos grasos insaturados son las macromoléculas más sensibles al daño inducido por los radicales libres que existen en las células, debido a la presencia de electrones muy inestables junto a sus dobles enlaces. Además, su sensibilidad a la peroxidación lipídica aumenta exponencialmente conforme sube el número de dobles enlaces por molécula. Por tanto, el bajo índice de dobles enlaces del corazón, el músculo esquelético, el riñón y el hígado de los animales longevos<sup>55-59</sup> protegería a sus tejidos frente a la peroxidación lipídica de forma constitutiva, tanto si tienen tasas metabólicas bajas (como los mamíferos de gran tamaño corporal) o altas (como las aves). Esto fue de hecho lo que se encontró cuando se estudió la intensidad de la peroxidación lipídica en estas especies<sup>55-57,59</sup>. La peroxidación lipídica no sólo es destructiva para los lípidos. Los productos de la peroxidación lipídica también pueden modificar covalentemente otros tipos de macromoléculas como las proteínas causando alteraciones en su estructura y función. De acuerdo con esto, se ha observado que las concentraciones de malondialdehído-lisina y carboximetil-lisina en proteínas mitocondriales cardíacas<sup>57</sup> son menores en los mamíferos y aves longevos, que tienen también un bajo grado de insaturación de sus ácidos grasos, que en los que envejecen rápidamente. Este bajo grado de insaturación de los animales longevos no se debe a la dieta (un factor exógeno). Por el contrario, se trata de un parámetro regulado homeostáticamente a un nivel distinto en cada especie según cuál sea su longevidad máxima<sup>56-59</sup>. Por otra parte, los análisis detallados de la composición en ácidos grasos indican que la causa principal del menor número de dobles enlaces de las especies longevas es la presencia de concentraciones bajas de actividad delta-5 y delta-6 desaturasa<sup>55-59</sup>, que son limitantes para la biosíntesis de ácidos grasos muy insaturados de cadena larga como el ácido araquidónico (con 4 dobles enlaces por molécula) y el ácido docosahexaenoico (con 6 dobles enlaces) a partir de sus precursores menos insaturados<sup>60</sup>. Estos resultados no se limitan a modelos comparados sino que también responden a la modificación experimental. Hemos podido demostrar recientemente que al aumentar el grado de insaturación de las membranas cerebrales en la rata se produce un aumento del daño oxidativo no sólo a lípidos sino también a proteínas y al ADN mitocondrial<sup>61</sup>.

### **RESTRICCIÓN CALÓRICA, PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE RADICALES LIBRES Y DAÑO AL ADN MITOCONDRIAL**

Los estudios comparados sobre producción mitocondrial de radicales libres y daño oxidativo al ADN mitocondrial apoyan con fuerza la teoría del envejecimiento por radicales libres. Sin embargo, las correlaciones, aunque coincidentes con las predicciones de la teoría, no implican necesariamente la existencia de relaciones causales entre los parámetros implicados. Por eso, es interesante

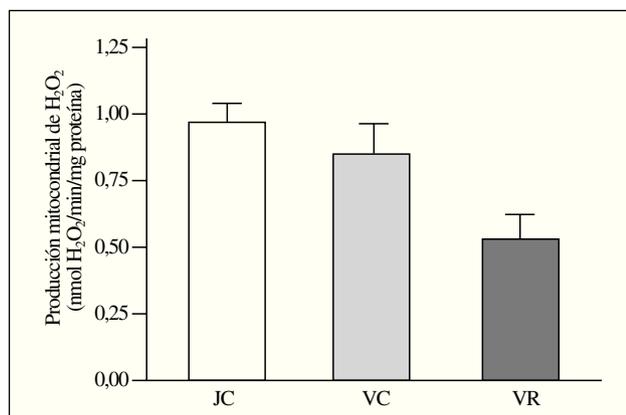


Figura 1. Producción mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el corazón de ratas Wistar macho j venes controles (JC), viejas controles (VC) y viejas restringidas (VR). La restricción calórica a largo plazo (1 año de restricción) disminuye significativamente la producción de ROS, tanto por debajo de las concentraciones de las j venes como de las viejas controles. (Tomada de Gredilla et al<sup>63</sup>.)

comprobar si dichos parámetros se modifican en el sentido adecuado cuando se altera experimentalmente la velocidad del envejecimiento. Tal alteración no es tarea fácil. Afortunadamente, existe una manipulación experimental que aumenta la longevidad máxima debido a una ralentización de la velocidad del envejecimiento: la restricción del número de calorías que el animal ingiere<sup>62</sup>. El aumento de longevidad máxima inducido por la restricción calórica se ha demostrado innumerables veces en roedores de laboratorio, así como en otras especies incluyendo nematodos, rotíferos, insectos, arácnidos y peces, y los estudios actualmente en realización apuntan a que este fenómeno también ocurre en simios, por lo que es razonable pensar que es extrapolable al hombre.

Se ha estudiado recientemente si el mecanismo de acción de la restricción calórica sobre la longevidad máxima incluye cambios en la producción mitocondrial de ROS y el daño subsiguiente al ADN mitocondrial<sup>63</sup>. Estos estudios sobre la producción de ROS, que se han realizado tanto a corto como a largo plazo en el corazón de ratas jóvenes y viejas, aclaran si ocurren tales cambios, dónde ocurren dentro de la cadena respiratoria y cuál es el mecanismo que los genera<sup>63</sup>. La restricción calórica a corto plazo (6 semanas) no cambió ninguno de los parámetros estudiados. Sin embargo, la restricción calórica a largo plazo (1 año) disminuyó casi a la mitad la producción mitocondrial de ROS (fig. 1) e hizo descender también el daño oxidativo al ADN mitocondrial sin modificar dicho daño en el ADN nuclear en ratas viejas<sup>63</sup>. Se han encontrado también descensos en la generación mitocondrial de ROS tras la restricción calórica en el hígado a corto y largo plazo<sup>64,65</sup> y el músculo esquelético a largo plazo<sup>66</sup> pero no en el riñón a corto plazo<sup>67</sup>. Estudios recientes de otros autores han confirmado el descenso generalizado de producción mitocondrial de ROS en la restricción calórica en los tejidos de los mamíferos<sup>68-70</sup>.

Por otra parte, hemos observado que la restricción proteica sin restricción calórica intensa también hace descender la producción de ROS en el hígado a corto plazo<sup>71</sup>. En cambio, la restricción calórica no cambia de forma coherente ni la actividad<sup>72</sup> ni la expresión génica<sup>73</sup> de las enzimas antioxidantes SOD, catalasa o glutatión peroxidasa. El descenso en el ataque por ROS y en los valores de 8-oxodG en el ADN mitocondrial en la restricción calórica indica que el flujo del daño oxidativo (ataque y reparación) a través de este ADN debe ser menor, como en el caso de los animales longevos respecto a los de vida corta, en los animales restringidos que en los alimentados *ad libitum*<sup>52,63</sup>. De hecho, se ha observado que la restricción calórica disminuye la expresión de varios genes que codifican para sistemas de reparación del ADN<sup>74-76</sup>. Otro aspecto importante es que el efecto de la restricción calórica no consiste fundamentalmente, como se había sugerido inicialmente<sup>72</sup>, en evitar un aumento de producción mitocondrial de ROS en el animal viejo, sino en disminuir dicha producción por debajo de los valores basales de los animales, tanto jóvenes como viejos<sup>63</sup>. Este tipo de cambio es el que cabría esperar si la restricción calórica disminuye la velocidad del envejecimiento utilizando la producción mitocondrial de ROS como mecanismo de acción a escala celular.

Si la producción mitocondrial de radicales está implicada en el control de la velocidad del envejecimiento, es muy importante aclarar cuál es el sitio de producción implicado dentro de la cadena respiratoria mitocondrial. Se sabe por estudios anteriores que, en el caso de las mitocondrias cardíacas, la producción de ROS ocurre tanto en el complejo I como en el complejo III. Sin embargo, de esos 2 complejos, sólo el complejo I está implicado en el descenso de producción de radicales libres que ocurre en la restricción calórica, ya que dicho descenso ocurre cuando se utilizan piruvato/malato como sustratos pero no cuando los electrones se introducen en la cadena respiratoria utilizando succinato en presencia de rotenona<sup>63</sup>. También se ha aclarado otro aspecto importante, el mecanismo de dicho descenso, que no consiste en una simple disminución del consumo de oxígeno, ya que éste se mantiene inalterado en las mitocondrias de los animales restringidos. Lo que ocurre es que desciende la fuga de radicales libres (el porcentaje del total de electrones que fluye por la cadena que da lugar a ROS en vez de reducirse totalmente a agua en la citocromo oxidasa). Esto está relacionado con grado de reducción electrónica del generador de ROS del complejo I, ya que la diferencia entre animales restringidos y controles se da cuando dicho grado de reducción es parcial pero no cuando es total<sup>63</sup>. Se han encontrado resultados similares a los anteriores en mitocondrias hepáticas, con la diferencia de que los cambios se producen antes en este órgano, que son ya detectables a las 6 semanas de restricción<sup>64</sup>. Estudios recientes en corazón de rata indican que los niveles de modificación oxidativa de las proteínas mitocondriales son también menores en los animales restringidos<sup>77</sup>.

## CONCLUSIONES

En resumen, la relación entre el estrés oxidativo y la longevidad animal se debe fundamentalmente a la menor producción mitocondrial de radicales de oxígeno de las especies longevas. Esto se complementa secundariamente con una menor sensibilidad a la peroxidación lipídica en los animales longevos. Es muy llamativo que la producción mitocondrial de ROS y el daño oxidativo al ADN mitocondrial estén disminuidos tanto en los animales longevos como en los restringidos. Esto sugiere que la disminución de la intensidad de generación de radicales de oxígeno en el complejo I es un mecanismo evolutivo muy conservado de ralentización de la velocidad del envejecimiento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal*. 2003;5:557-61.
- Ames BN, Liu J. Delaying the mitochondrial decay of aging with acetylcarnitine. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1033:108-16.
- Rebrin I, Sohal RS. Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevity. *Exper Gerontol*. 2004;39:1513-9.
- Barger JL, Walford RL, Weindruch R. The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. *Exper Gerontol*. 2003;38:1343-51.
- Barja G. Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biological Rev*. 2004;79:235-51.
- Barja de Quiroga G, López-Torres M, Pérez-Campo R. En: Emerit I, Chance B, editors. *Free radicals and aging*. Basel: Birkhäuser; 1992. p. 109-23.
- Benzi G, Moretti A. Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Rad Biol Med*. 1995;12:77-101.
- Tolmasoff JM, Ono T, Cutler RG. Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *PNAS USA*. 1980;77:2777-81.
- Cutler RG. Aging and oxygen radicals. En: Taylor AE, Matalon S, Ward P, editors. *Physiology of oxygen radicals*. Bethesda: American Physiological Society; 1986. p. 251-85.
- Pérez-Campo R, López-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol B*. 1998;168:149-58.
- Sohal RS, Sohal BH, Brunk UT. Relationship between antioxidant defenses and longevity. *Mech Ageing Dev*. 1990;53:217-27.
- Epstein J, Gershon D. Studies on ageing in nematodes IV. The effect of antioxidants on cellular damage and life span. *Mech Ageing Dev*. 1972;1:257-64.
- Milgram NW, Racine RJ, Nellis P, Mendonca A, Ivy GO. Maintenance on l-deprenyl prolongs life in aged male rats. *Life Sciences*. 1990;47:415-20.
- Heidrick ML, Hendricks LC, Cook DE. Effect of dietary 2-mercaptoethanol on the life span, immune system, tumor incidence and lipid peroxidation damage in spleen lymphocytes of aging BC3F1 mice. *Mech Ageing Dev*. 1984;27:341-58.
- Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 1994;263:1128-30.
- Kohn RR. Effect of antioxidants on life-span of C57BL mice. *J Gerontol*. 1971;26:378-80.
- Clapp NK, Satterfield LC, Bowles ND. Effects of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) on mortality in BALB/c mice. *J Gerontol*. 1979;34:497-501.
- Enesco HE, Verdones-Smith C.  $\alpha$ -Tocopherol increases lifespan in the rotifer *Philodina*. *Exp Gerontol*. 1980;15:335-8.
- Ledvina M, Hodánová M. The effect of simultaneous administration of tocopherol and sunflower oil on the life-span of female mice. *Exp Gerontol*. 1980;15:67-71.
- Porta EA, Joun NS, Nitta RT. Effects of the type of dietary fat at two levels of vitamin E in Wistar male rats during development and aging. I. Life span, serum biochemical parameters and pathological changes. *Mech Ageing Dev*. 1980;13:1-39.
- Bozovic V, Enesco HE. Effect of antioxidants on rotifer life span and activity. *Age*. 1986;9:41-5.
- Harris SB, Weindruch R, Smith GS, Mickey MR, Walford RL. Dietary restriction alone and in combination with oral ethoxyquin/2-mercaptoethylamine in mice. *J Gerontol*. 1990;45:B141-7.
- López-Torres M, Pérez-Campo R, Fernández A, Barba C, Barja de Quiroga G. Brain glutathione reductase induction increases early survival and decreases lipofuscin accumulation in aging frogs. *J Neurosci Res*. 1993;34:233-42.
- López-Torres M, Pérez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja de Quiroga G. Simultaneous induction of superoxide dismutase, glutathione reductase, GSH and ascorbate in liver and kidney correlates with survival throughout the life span. *Free Rad Biol Med*. 1993;15:133-42.
- Orr WC, Sohal RS. The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch Biochem Biophys*. 1992;297:35-41.
- Seto NO, Hayashi S, Tener GM. Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase in *Drosophila* does not affect life-span. *PNAS USA*. 1990;87:4270-4.
- Staveley BE, Phillips JP, Hilliker AJ. Phenotypic consequences of copper-zinc superoxide dismutase overexpression in *Drosophila melanogaster*. *Genome*. 1990;33:867-72.
- Huang TT, Carlson EJ, Gillespie AM, Shi Y, Epstein CJ. Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *J Gerontol*. 2000;55A:B5-9.
- Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JAC, Hawkins R, Van Duijn W, Verspagaet HW, et al. Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Disease*. 2000;7:623-43.
- Mockett RJ, Sohal RS, Orr WC. Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not in normoxia. *FASEB J*. 1999;13:1733-42.
- Wispe JR, Warner BB, Clark JC, Dey CR, Neuman J, Glasser SW, et al. Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J Biol Chem*. 1992;267:23937-41.
- Huang TT, Carlson EJ, Gillespie AM, Shi Y, Epstein CJ. Ubiquitous overexpression of Cu,Zn superoxide dismutase does not extend life in mice. *J Gerontol*. 2000;55A:B5-9.
- Ho YS, Gargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I, Hutz RJ. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1998;273:7765-9.
- Shefner JM, Reaume AG, Flood DG, Scott RW, Kowall NW, Ferrante RJ, et al. Mice lacking cytosolic superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology*. 1999;53:1239-46.
- Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *PNAS USA*. 1995;92:6264-8.
- Reddy VN, Giblin FJ, Lin LR, Dang L, Unakar NJ, Musch DC, et al. Glutathione peroxidase-1 deficiency leads to increased nuclear light scattering, membrane damage, and cataract formation in gene-knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:3247-55.
- Tsan MF, White JE, Caska B, Epstein CJ, Lee CY. Susceptibility of heterozygous MnSOD gene-knockout mice to oxygen toxicity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19:114-20.
- Ho YS, Gargano M, Cao J. Mice lacking copper/zinc superoxide dismutase show no increased sensitivity to hyperoxia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:A17.
- Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Flood DG, Reaume AG, Hoffman EK, et al. Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurootol*. 1999;4:237-46.
- De Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, et al. Mice with homologous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1998;273:22528-36.
- Melov S, Coskun P, Patel M, Tuinstra R, Cottrell B, Jun AS, et al. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *PNAS USA*. 1999;96:846-51.
- Kirby K, Hu J, Hilliker AJ, Phillips JP. RNA interference-mediated silencing of Sod2 in *Drosophila* leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress. *PNAS USA*. 2002;99:16162-7.
- Ku HH, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad Biol Med*. 1993;15:621-7.
- Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci*. 2004;27:595-600.
- Barja G, Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J*. 2000;14:312-8.
- Herrero A, Barja G. 8-oxodexyguanosine levels in heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of two mammals and three birds in relation to their different rates of aging. *Aging Clin Exper Res*.

- 1999;11:294-300.
47. Richter Ch, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *PNAS USA*. 1988;85:6465-7.
  48. Sohal RS, Agarwal S, Sohal BH. Oxidative stress and aging in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Mech Ageing Dev*. 1995;81:15-25.
  49. Asunción JG, Millán A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardó FV, et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J*. 1996;10:333-8.
  50. Herrero A, Barja G. Effect of aging on mitochondrial and nuclear DNA oxidative damage in the heart and brain throughout the life span of the rat. *J Amer Aging Assoc*. 2001;24:45-50.
  51. Lezza AMS, Mecocci P, Cormio A, Beal MF, Cherubini A, Cantatore P, et al. Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH8dG levels correlated in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients. *FASEB J*. 1999; 13:1083-8.
  52. Barja G. The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging Clin Exper Res*. 2000;12:342-55.
  53. Kim SR, Matsui K, Yamada M, Kohno T, Kasai H, Yokota J, et al. Suppression of chemically induced and spontaneously occurring oxidative mutagenesis by three alleles of human OGG1 gene encoding 8-hydroxyguanine DNA glycosylase. *Mutat Res*. 2004;554:365-74.
  54. Couture P, Hulbert AJ. Membrane fatty acid composition of tissues is related to body mass of mammals. *J Membr Biol*. 1995;148:27-39.
  55. Pamplona R, Prat J, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M, et al. Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from longevous species: the pigeon and human case. *Mech Ageing Dev*. 1996;86:53-66.
  56. Pamplona R, Portero-Otín M, Requena JR, Thorpe SR, Herrero A, Barja G. A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech Ageing Dev*. 1999;106:283-96.
  57. Pamplona R, Portero-Otín M, Riba D, Ledo F, Gredilla R, Herrero A, et al. Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the canary and the parakeet than in the mouse. *Aging Clin Exper Res*. 1999;11:44-9.
  58. Pamplona R, Portero-Otín M, Ruiz C, Prat J, Bellmunt MJ, Barja G. Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J Lipid Res*. 1998;39:1989-94.
  59. Pamplona R, Barja G, Portero-Otín M. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span. A homeoviscous-longevity adaptation? *Ann N Y Acad Sci*. 2002;959:475-90.
  60. Cook HW. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. En: Vance DE, Vance JE, editors. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and biomembranes*. Amsterdam: Elsevier; 1996. p. 129-52.
  61. Pamplona R, Portero-Otín M, Sanz A, Requena J, Barja G. Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exper Gerontol*. 2004;39:725-33.
  62. Lee CK, Pugh TD, Klopp RG, Edwards J, Allison DB, Weindruch R, et al. The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme Q10 and caloric restriction on life span and gene expression patterns in mice. *Free Radic Biol Med*. 2004; 36:1043-57.
  63. Gredilla R, Sanz A, López-Torres M, Barja G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J*. 2001;15:1589-91.
  64. Gredilla R, Barja G, López-Torres M. Effect of short-term caloric restriction on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria, and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembr*. 2001;33:279-87.
  65. 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 Rad Biol Med*. 2002;32:882-9.
  66. Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, et al. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Amer J Physiol*. 2003;284:R474-80.
  67. Gredilla R, Phaneuf S, Selman C, Kendaiah S, Leeuwenburgh C, Barja G. Short-term caloric restriction and sites of oxygen radical generation in kidney and skeletal muscle mitochondria. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1019:333-42.
  68. Ramsey JJ, Hagopian K, Kenny TM, Koomson EK, Bevilacqua L, Weindruch R, et al. Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats. *Am J Physiol*. 2004;286:E31-40.
  69. Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME. Effects of short- and medium-term caloric restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am J Physiol*. 2004;286: E852-61.
  70. Judge S, Judge A, Grune T, Leeuwenburgh C. Short-term CR decreases cardiac mitochondrial oxidant production but increases carbonyl content. *Am J Physiol*. 2004;286:R254-9.
  71. 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.
  72. Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction. *Mech Ageing Dev*. 1994;74:121-33.
  73. Weindruch R, Kayo T, Lee CL, Prolla TA. Microfile profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *J Nutr*. 2001;131:5918-23.
  74. Fornace AJ Jr, Zmudka B, Hollander MC, Wilson SH. Induction of  $\beta$ -polymerase mRNA by DNA-damaging agents in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol*. 1989;9:851-3.
  75. Payne A, Chu G. Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage. *Mut Res*. 1994;310:89-102.
  76. Petrini JH. The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular damage response. *Am J Hum Genet*. 1999; 64:1264-9.
  77. Pamplona R, Portero-Otín M, Bellmunt MJ, Gredilla R, Barja G. Aging increases Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and caloric restriction decreases Nepsilon-(carboxyethyl)lysine and Nepsilon-(malondialdehyde)lysine in rat heart mitochondrial proteins. *Free Rad Res*. 2002;36:47-54.
  78. Sohal RS, Svensson I, Brunk UT. Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species. *Mech Ageing Dev*. 1990;53:209-15.
  79. Sohal RS, Ku HH, Agarwal S. Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species. *Biochem Biophys Res Comms*. 1993;196:7-11.
  80. Herrero A, Barja G. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved. *Mech Ageing Dev*. 1 9 9 9 ; 1 0 3 : 1 3 3 - 4 6 .
  81. Ku HH, Sohal RS. Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and antioxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential. *Mech Ageing Dev*. 1993;72:67-76.
  82. Barja G, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M. Low mitochondrial free radical production per unit O<sub>2</sub> consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Rad Res*. 1994;21:317-28.
  83. Herrero A, Barja G. Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev*. 1997;98:95-111.
  84. Barja G, Herrero A. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain non-synaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J Bioenerg Biomembr*. 1998;30:235-43.