

Revisiones

Aspectos mitocondriales del envejecimiento. Papel del tipo de grasa de la dieta y el estrés oxidativo

J.L. QUILES, J.J. OCHOA, J.R. HUERTAS Y J. MATAIX

Departamento de Fisiología. Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Universidad de Granada. Granada. España.

El envejecimiento es un proceso que tiene importantes connotaciones socioeconómicas, psicológicas, morfológicas, celulares y moleculares, que está adquiriendo en los últimos años una especial relevancia. El afán por encontrar la causa y el remedio contra el envejecimiento ha proporcionado una gran cantidad de teorías, entre las que la del estrés oxidativo (donde la mitocondria ocupa un papel primordial) es una de las más aceptadas. La evidencia experimental indica que los oxidantes son determinantes en el envejecimiento celular. Estos hechos tienen, en el campo de la nutrición, una evidente interacción, puesto que ésta puede ejercer una clara influencia desde una perspectiva preventiva. Se conoce el importante papel de la grasa de la dieta en la epidemiología de enfermedades como las cardiovasculares. Los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos de membrana condicionan sus propiedades fisicoquímicas y son responsables de su fluidez y permeabilidad, lo que condiciona la función de las proteínas ligadas a la membrana así como su susceptibilidad al ataque oxidativo. Además, con el envejecimiento se han detectado cambios estructurales y funcionales en las membranas (principalmente en las mitocondriales) que, en última instancia, conducen a la muerte celular. Son pocos los trabajos realizados hasta el momento en los que se estudie la adaptación a la grasa de la dieta durante la vida de un grupo de individuos, así como el efecto de ambos factores sobre el estado oxidativo celular y sobre la función mitocondrial en el proceso de envejecimiento. Este trabajo revisa la posible utilidad del uso de aceite de oliva virgen desde el punto de vista del envejecimiento mitocondrial.

Palabras clave: Coenzima Q. Citocromo oxidasa. Ácido oleico. Ácido linoleico. Aceite de oliva virgen. Aceite de girasol.

MITOCHONDRIAL ASPECTS OF AGING. ROLE OF DIETARY FAT TYPE AND OXIDATIVE STRESS

The process of aging has important socioeconomic, psychological, morphological, cellular, and molecular repercussions. In the last few years interest in this process has been growing. Eagerness to identify the cause of aging as well as countermeasures have prompted the formulation of a large number of theories. Of these, the *oxidative stress theory of ageing* (in which mitochondria play a key role) is one of the most widely accepted. Experimental evidence suggests that oxidants are determining factors in cellular ageing. These findings are clearly relevant to the field of nutrition, since nutrition may exert a strong influence in prevention. In addition, the key role of dietary fat in the epidemiology of several diseases, such as those of cardiovascular origin, is well known. The fatty acids that form part of membrane phospholipids help to determine the properties of these membranes such as fluidity and permeability, which determine the function of proteins bound to the membrane as well as its susceptibility to oxidative stress. Moreover, some structural and functional changes in membranes (mostly mitochondrial membranes) leading to cell death have been detected. Few studies have been performed to date on the role of dietary fat throughout life or on the effect of both factors on oxidative stress and mitochondrial function in ageing. The present article reviews the possible advisability of using virgin olive oil from the point of view of mitochondrial aging.

Key words: Coenzyme Q. Cytochrome oxidase. Oleic acid. Linoleic acid. Virgin olive oil. Sunflower oil.

CONCEPTO Y PRINCIPIOS DEL ENVEJECIMIENTO

La importancia social del envejecimiento radica tanto en el elevado porcentaje de personas mayores de 65 años (cerca del 20%) y el aumento espectacular de individuos que superan los 80 años, como en la incidencia creciente de afecciones crónicas relaciona-

Correspondencia: Dr. J.L. Quiles.
Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos.
Ramón y Cajal, 4 (Edificio Fray Luis de Granada).
18071 Granada. España.
Correo electrónico: jlquiles@ugr.es

Manuscrito recibido el 29-11-2002; aceptado para su publicación el 15-09-2003.

das con la edad, como las enfermedades de Alzheimer o Parkinson, la diabetes, o el cáncer.

No existe una definición precisa y exhaustiva del término envejecimiento. Se trata de un fenómeno común a todos los organismos multicelulares que se ha descrito como un declive endógeno y progresivo en la eficacia de los procesos fisiológicos tras la fase reproductora de la vida¹⁻³. El mencionado declive se ha atribuido bien a un programa genético presente en todos los individuos de la especie, bien a la acumulación estocástica de errores en las células somáticas, lo que daría lugar a la progresiva pérdida de las funciones celulares². El estudio del envejecimiento se enfrenta, entre otros, al problema que conlleva separar el proceso en sí de las enfermedades derivadas de éste.

A medida que un ser vivo envejece, aumenta la probabilidad de que fallezca, y llega una determinada edad, característica para cada especie, en la que todos los individuos de ésta ya han muerto. En el caso del ser humano, esta vida máxima se ha establecido en torno a los 110-120 años. En la actualidad hay muchos países en los que sólo unos pocos individuos son capaces de alcanzar esta vida máxima debido a enfermedades infecciosas o como consecuencia de una nutrición pobre o inadecuada. En los países industrializados el problema es diferente. Desde 1840, las expectativas de vida máxima han crecido a razón de aproximadamente 3 meses por año y de momento no hay signos que demuestren que esta tendencia vaya a cambiar. Una buena noticia es que la salud ha mejorado; sin embargo, se ha incrementado el coste en salud, y además han aparecido enfermedades que hace 100 años no se conocían, como la enfermedad de Alzheimer, la degeneración macular asociada al envejecimiento (que es la principal causa de ceguera en la actualidad), diversas enfermedades de tipo cardiovascular, cáncer, etc. Por tanto, se puede decir que la vida media ha aumentado en las sociedades avanzadas con respecto a las primitivas, aunque su vida máxima parece ser la misma^{1,4}.

Desde hace no mucho tiempo los científicos se plantean la cuestión de que si el envejecimiento es perjudicial para los individuos y aun así le ocurre a todo el mundo, ¿por qué ocurre? La respuesta podría ser que el envejecimiento es el efecto colateral de algo más. Así, los genes que retrasan el envejecimiento podrían hacerlo al reprimir la causa que genera el daño asociado al mismo. Un ejemplo de lo comentado es la reproducción. La fecundidad a menudo se reduce tanto evolutivamente, al disminuir el envejecimiento, como mediante mutaciones simples que prolongan la vida. La comida parece ser otra fuente de daño, ya que muchos de los genes que se hallan envueltos en la reducción del envejecimiento están también implicados en la respuesta al cambio en los valores de nutrientes. Se sabe, además, que la reducción de la ingesta de alimentos disminuye el envejecimiento en una variedad de organismos que va desde las levaduras a los mamíferos^{4,5}.

TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

Se han propuesto numerosas teorías con objeto de explicar como y por qué ocurre el fenómeno del envejecimiento, si bien muchas de ellas carecen del suficiente apoyo empírico para que puedan tenerse en cuenta. En general, cualquier teoría que pretenda ser creíble debe satisfacer una serie de condiciones⁶:

- Debe ser capaz de explicar cómo un organismo pierde la capacidad de mantener su homeostasis en la última parte de su vida.

- Debe aclarar las bases para las amplias variaciones en la duración de la vida de cohortes, cepas genéticas y especies.

- Debe ser capaz de identificar el o los factores responsables para la extensión de la vida mediante mutaciones simples o a través de regímenes experimentales, como la restricción calórica en roedores y cambios en la temperatura ambiente en poiquiloterms.

- Debe poder demostrar que el grado de envejecimiento puede manipularse mediante variaciones en los factores que se sospecha son los causantes de la senescencia.

De entre todas las teorías propuestas, la más aceptada en la actualidad es la teoría de los radicales libres del envejecimiento, propuesta por Harman⁷, que propone que el envejecimiento normal es el resultado del daño aleatorio a los tejidos mediado por los radicales libres. Con el tiempo, Harman fue enfocando su teoría hacia la mitocondria como principal fuente de producción de radicales libres y blanco del daño de éstos⁸. Posteriormente, Miquel et al⁹ propusieron la teoría mitocondrial del envejecimiento (daño progresivo al ADN mitocondrial por especies reactivas del oxígeno [ERO], etc.). Dado que en la actualidad se conoce que muchas ERO no son radicales libres, hoy día se habla fundamentalmente de la teoría del envejecimiento del estrés oxidativo. Además, se han propuesto muchas otras teorías para explicar el envejecimiento, entre las que cabe mencionar las teorías genéticas del envejecimiento¹⁰. Son varias teorías y en general proponen que el envejecimiento es la continuación del proceso de desarrollo y diferenciación; se trata de una secuencia de acontecimientos codificados en el genoma. Estas teorías se basan en que el envejecimiento sería la consecuencia tardía de la expresión de genes seleccionados por la evolución debido a que aumentan el éxito reproductivo. El poder que favorece la selección de genes beneficiosos se manifiesta más en los jóvenes, ya que éstos se encargan de la reproducción y de la transmisión genética, de modo que no se tiene en cuenta lo que ocurre con esos genes en la edad madura. Así, un gen que favorezca la reproducción pero sea perjudicial a largo plazo no será seleccionado para ser eliminado.

Además de las anteriores, hay otro grupo de teorías que se han propuesto, que guardan determinadas similitudes con la teoría del estrés oxidativo y que, en cierto modo, podrían explicarse por ésta. En conjun-

to, forman el grupo de las teorías de la acumulación de daños¹, en el que se incluyen la teoría de la supervivencia inmediata (el envejecimiento ocurre porque la naturaleza selecciona los genes que tienen un valor de supervivencia inmediato, pero de consecuencias deletéreas a largo plazo); la teoría del entrecruzamiento (el entrecruzamiento al azar de proteínas y ADN altera la función celular); la teoría del error catastrófico (acumulación de daños al azar en la síntesis de proteínas); la teoría de la glucosilación (la formación de proteínas glucosiladas da lugar a una grave disrupción de las funciones celulares); la teoría de los determinantes de longevidad (el envejecimiento es causado por los productos del metabolismo, y el grado de envejecimiento viene dado por la capacidad para protegerse frente a esos productos); la teoría de la hipótesis de membrana (daños en la membrana celular dan lugar a una disminución en la capacidad de eliminar productos de desecho, a una síntesis proteica disminuida y a una pérdida de agua desde el citoplasma, y provocan una disminución de la actividad enzimática), y la teoría de la entropía (mecanismos como la restricción calórica, que reducen el grado de producción de entropía y liberan energía más lentamente, retrasan el deterioro molecular).

La presente revisión tiene por objeto el análisis del fenómeno del envejecimiento desde el punto de vista de la teoría del estrés oxidativo mitocondrial y, más concretamente, valorando el posible papel que puede desempeñar la grasa de la dieta.

IMPLICACIÓN DE LA MITOCONDRIA EN EL ENVEJECIMIENTO

Uno de los acontecimientos comunes en el envejecimiento es la pérdida progresiva de la funcionalidad mitocondrial; así, de forma general se puede considerar que este orgánulo es una especie de reloj biológico del envejecimiento¹¹. La mitocondria se ha propuesto como el nexo de unión entre la acumulación del daño oxidativo producido por las ERO dependiente de la edad y las alteraciones en la función fisiológica asociadas al envejecimiento¹². De este modo, diversas evidencias experimentales indican que la mitocondria es uno de los principales blancos del proceso del envejecimiento. Entre dichas evidencias se pueden enumerar las siguientes¹¹:

- Acumulación de grandes deleciones y mutaciones puntuales en el ADN mitocondrial (ADNmt) y descenso en el número de copias de ADNmt en algunos tejidos.
- Descenso con la edad de la actividad enzimática de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.
- Aumento en la producción de radicales libres, probablemente como consecuencia de las alteraciones anteriores.
- Cambios en la morfología mitocondrial y descenso del potencial de la membrana mitocondrial.

Estas evidencias corroboran que la función mitocondrial sufre importantes alteraciones durante el envejecimiento, y debería considerarse que son las causantes del fenotipo de envejecimiento, más que considerar que el envejecimiento es una consecuencia de tales alteraciones. Una serie de observaciones apoyan esta relación causa-efecto¹¹:

- Cuando se microinyectan mitocondrias procedentes de fibroblastos de rata vieja en células de ratas jóvenes éstas últimas sufren de forma rápida un proceso de senescencia y degeneración.

- Existe una relación inversa entre el valor de producción mitocondrial de hidropéroxidos y la vida máxima de las especies.

- La administración de diversos antioxidantes como glutatión, vitamina C, N-acetilcisteína o coenzima Q es capaz de disminuir o eliminar el estrés oxidativo inducido por las mitocondrias, y provoca un aumento de la vida media y máxima en diversas especies.

Diferencias en la funcionalidad mitocondrial pueden ser importantes para lograr un envejecimiento adecuado o inadecuado, lo que se puede deducir del estudio de determinados grupos de población en diversas partes del mundo. Así, por ejemplo, se ha visto que una variante hereditaria de una línea germinal de ADNmt (halogrupa J) se asocia con un envejecimiento mejor y una mayor longevidad en la población italiana¹³. Por otro lado, en Japón se han descubierto 3 mutaciones asociadas a una línea germinal de ADNmt halladas con una elevada frecuencia en personas centenarias de esta parte del mundo¹⁴.

Otro punto importante que se debe tener en cuenta con respecto a la relación de la mitocondria y el envejecimiento es que dicho orgánulo no sólo es la planta energética celular y la principal fuente de ERO, sino que además muchas señales convergen en la mitocondria, que puede, a su vez, modificar y ajustar su metabolismo en respuesta a dicha información. De este modo, la mitocondria se debe considerar también como un elemento de control de la expresión génica nuclear. Así, se ha descubierto que un número elevado de proteínas con papel regulador o de adaptación se hallan localizadas en la mitocondria o bien son translocadas a ella para su activación. Éste es el caso de Nur77/TR3, p53, PKC δ , JNK/SAPK, algunas caspasas y miembros citoplasmáticos de la familia del Bcl2, como Bid, Bax o Bim¹⁵.

En relación con el papel de la mitocondria en el envejecimiento, el control de los procesos de apoptosis por parte de estos orgánulos resulta de suma importancia. Dicho control se pierde a menudo en las células viejas que, por otro lado, presentan una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo. Las ERO disminuyen el potencial de membrana mitocondrial, lo que permite la apertura del poro de transición y la salida al exterior mitocondrial de iones calcio y otros sustratos. Esta secuencia de reacciones da lugar a apoptosis en los linfocitos, el hígado y el cerebro, en el caso de ratones viejos¹⁶.

LA MITOCONDRIA COMO FUENTE DE ENERGÍA CELULAR Y ESTRÉS OXIDATIVO

La teoría del estrés oxidativo se basa en que las ERO son un producto normal de la vida aeróbica y en que la acumulación del daño oxidativo debido a dichas especies reactivas dan lugar a cambios fundamentales que afectan al envejecimiento. Como se ha mencionado anteriormente, esta teoría fue propuesta inicialmente por Harman en los años cincuenta⁷, y desde que se enunció se ha demostrado que el daño oxidativo tiene lugar en las células como el resultado de la reacción entre las ERO y las diversas moléculas biológicas. Se ha descrito que las ERO y los radicales libres inducen peroxidación lipídica, modificaciones oxidativas en proteínas, inactivación de enzimas, modificación de bases y rotura de la cadena de ADN, lo que da lugar en general a lo que se conoce como estrés oxidativo¹. Además, también se ha comprobado que, aunque las ERO se producen por una gran variedad de rutas del metabolismo aeróbico, la principal fuente productora es la mitocondria^{1,11,12,17-19}.

Estructura y función mitocondrial

La mitocondria tiene 2 membranas: una externa, que es porosa, y otra interna, muy rica en proteínas y que es una barrera de permeabilidad para los iones. Ambas, al igual que todas las membranas biológicas, se componen de lípidos y proteínas. Sin embargo, la membrana interna mitocondrial es muy diferente al resto de membranas biológicas por cuanto su contenido en proteínas

supera el 80% (mientras que la mayoría de las membranas no supera el 50%). Algunas proteínas están íntimamente unidas a la superficie de la membrana y otras se hallan embebidas como una parte integral de éstas²⁰. Por su importancia y significado en el contexto del estrés oxidativo merecen destacarse los complejos proteínicos que forman la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTEmt). La CTEmt se encarga en los organismos aeróbicos de la producción metabólica de la energía necesaria para la vida. Básicamente, los alimentos son oxidados mediante la pérdida de electrones, que son aceptados por transportadores electrónicos, como la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y las flavinas (flavín mononucleótido [FMN] y flavín adenina dinucleótido [FAD]). La nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH) y las flavinas reducidas (FMNH_2 y FADH_2) son oxidadas de nuevo por el oxígeno, produciendo grandes cantidades de ATP. El proceso de oxidación se lleva a cabo mediante pequeños saltos de modo que la energía se libera gradualmente. Esto se lleva a cabo por la CTEmt¹⁸.

Desde un punto de vista funcional (fig. 1), la CTEmt se compone principalmente de 5 complejos enzimáticos lipoproteicos¹⁸⁻²⁰:

- Complejo I: NADH: ubiquinona oxidoreductasa.
- Complejo II: succinato: ubiquinona oxidoreductasa.
- Complejo III: ubiquinol: ferrocitocromo c oxidoreductasa.
- Complejo IV: ferrocitocromo c oxidoreductasa o citocromo c oxidasa (COX).
- Complejo V: ATPasa.

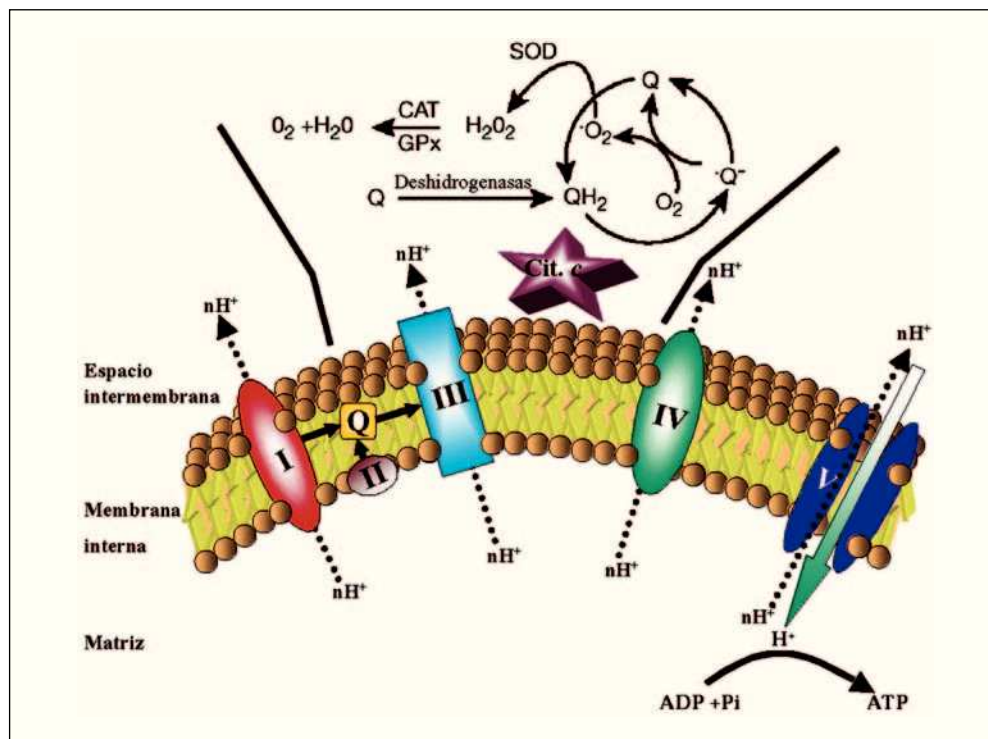


Fig. 1. Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTEmt), en la que destacan sus distintos complejos así como la zona donde tiene lugar la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y los sistemas implicados en su detoxificación.

La parte de la CTEmt que procesa el oxígeno es el complejo IV, la COX. Esta enzima utiliza 4 moléculas de citocromo c reducido para quitarle a cada una un electrón y dárselos a una molécula de oxígeno. Este proceso de reducción tetraelectrónica del oxígeno no se puede hacer de golpe, sino electrón a electrón. Debido a esta reducción gradual, el complejo proteínico debe asegurar que el oxígeno parcialmente reducido, altamente tóxico, no sea liberado al medio antes de ser convertido en agua.

La mitocondria como fuente de estrés oxidativo

El anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son, respectivamente, el producto de la reducción univalente y bivalente del oxígeno. Ambos son producidos de forma habitual durante el metabolismo aeróbico, fundamentalmente a escala mitocondrial¹⁹. Se ha estimado que entre un 1 y un 5% del oxígeno total consumido por la mitocondria no es reducido enteramente a agua y es transformado en O_2^- , que de manera espontánea, o como consecuencia de la acción de la superóxido dismutasa, es convertido a su vez en H_2O_2 . Aunque la COX es la que se ocupa de la reducción del oxígeno, apenas genera radicales libres; por el contrario, las 2 principales regiones de la CTEmt con capacidad para producir ERO son el complejo I y el III²¹⁻²⁴. Lo que ocurre es que durante el paso de los electrones de un complejo a otro, algunos de ellos escapan y se unen directamente al oxígeno circundante, generándose O_2^- . Además, en la membrana mitocondrial externa hay una fuente adicional de ERO proveniente de la desaminación de aminos biógenas por monoaminooxidasas, que a través de una reducción dielectrónica producen H_2O_2 partiendo de O_2 ²⁵.

El valor fisiológico de producción de ERO en CTEmt depende del estado metabólico mitocondrial. Así, el estado de reposo mitocondrial (estado 4), caracterizado por un nivel bajo de respiración y no disponibilidad de ADP, se asocia con una elevada producción de ERO, tal vez como consecuencia del alto grado de reducción de los componentes de la cadena. Por otro lado, el estado mitocondrial activo (estado 3), caracterizado por un alto consumo de oxígeno y elevada disponibilidad de ADP, muestra una producción de ERO relativamente baja. Por último, en el estado de anoxia (estado 5), caracterizado por una limitación en el suministro de oxígeno y una ausencia de respiración, no se observa producción de ERO¹⁹.

La mitocondria como blanco del estrés oxidativo

Las membranas biológicas, en general, son muy sensibles al estrés oxidativo debido a la presencia de enlaces dobles de tipo carbono-carbono en las colas lipídicas de los fosfolípidos que las componen²⁶. El daño oxidativo a los lípidos de la membrana se puede realizar de forma directa, mediante su iniciación por

ERO, como los radicales hidroxilo o el anión superóxido, o bien de forma indirecta mediante algunos productos de la propia peroxidación lipídica, como ciertos aldehídos altamente reactivos que a su vez potencian el fenómeno²⁷. En cualquier caso, de un modo u otro, la oxidación de los lípidos de la membrana mitocondrial da lugar a su alteración y a cambios en la fluidez de ésta, a variaciones en su relación con las proteínas adyacentes y, como consecuencia de todo lo anterior, a alteraciones en su función¹. Además, en el caso concreto de la mitocondria hay un lípido presente en la membrana interna llamado cardiolipina, altamente insaturado y, por consiguiente, de elevada susceptibilidad a la oxidación. La oxidación de la cardiolipina es extremadamente perjudicial, ya que está implicada en la función de proteínas de la CTEmt, como la COX o el transportador de nucleótidos de adenina (TNA)²⁸.

Debido a la proximidad física entre las proteínas y los lípidos, el daño oxidativo a las proteínas mitocondriales como resultado directo del estrés oxidativo, o bien como una consecuencia de la peroxidación lipídica, puede dar lugar a entrecruzamiento, degradación y pérdida de función de éstas. Numerosas proteínas de membrana, como la ATPasa, el TNA, la COX, etc. son fácilmente inactivadas mediante estrés oxidativo. Además, la oxidación de proteínas determina la apertura del poro de permeabilidad de transición, clave en el proceso de apoptosis. En resumen, la alteración de las proteínas de la CTEmt tiene como consecuencia directa una pérdida de funcionalidad mitocondrial e, indirectamente, una elevación de la producción de ERO^{29,30}.

La mitocondria cuenta con un genoma propio que es diferente en estructura y organización al nuclear. Se trata de un número variable de copias idénticas de ADN de cadena doble y circular (hasta 10 copias), localizado en la matriz mitocondrial, próximo a determinadas zonas de la membrana mitocondrial interna (precisamente el lugar de máxima generación de ERO). Su tamaño es pequeño (16,5 kb) y codifica para 13 proteínas mitocondriales, 7 de las subunidades del complejo I, una proteína del complejo III, 3 del complejo IV, 2 del complejo V (la ATPasa), 22 ARN de transferencia y 2 ARN ribosómicos (fig. 2)^{12,18,19}. A diferencia del ADN nuclear, el mitocondrial no está protegido por histonas y, tradicionalmente, se ha considerado de una elevada susceptibilidad a ser atacado oxidativamente³¹. Durante mucho tiempo se pensó que la mitocondria carecía de un sistema de reparación de ADN. En la actualidad se reconoce la existencia de un sistema de reparación del ADNmt, que aunque todavía es un gran desconocido, se sabe que es capaz de reparar el daño oxidativo (p. ej., daño a bases y roturas de una sola cadena). Además se sabe que la vía de reparación de escisión de bases desempeña un papel predominante dentro del sistema de reparación de ADNmt³².

Según muchos indicios, el daño oxidativo al ADNmt es más importante desde el punto de vista del envejecimiento que el ejercido sobre lípidos y proteínas. Esto se debe a que el ADNmt dañado se puede

tiene este fenómeno desde el punto de vista del envejecimiento¹². Las mutaciones del ADNmt son la base de un número importante de enfermedades humanas, lo que ha abierto un nuevo y excitante campo en la investigación mitocondrial. El ADNmt tiene un tipo de transmisión maternal; además hay numerosas copias de la molécula en una célula (poliplasmia), y existe la posibilidad de que una mutación experimente diferentes grados de heteroplasmia. Todo esto hace que para que una lesión se manifieste fenotípicamente, es necesario que alrededor del 80% del ADNmt de una célula esté mutado^{18,37}. Básicamente, las consecuencias fenotípicas de una mutación del ADNmt deben ser defectos en la maquinaria implicada en la fosforilación oxidativa de la mitocondria, y este tipo de defectos son, en cierto modo, la base de las alteraciones asociadas con el proceso normal de envejecimiento.

La respuesta acerca del estrés oxidativo neto resultante durante el proceso de envejecimiento es controvertida, ya que hay estudios que detectan elevaciones en los valores de diversos marcadores de estrés oxidativo y otros que no detectan tales aumentos¹. Algunas de las claves para encontrar esta disparidad de resultados pueden hallarse en el tipo de material biológico ensayado o en el parámetro elegido. Con relación al material biológico, muchos de los estudios se realizan utilizando homogenizados tisulares o células enteras, y no se debe olvidar que la mayor proporción del estrés oxidativo celular proviene de la mitocondria. De este modo, la mala elección del material biológico puede dar lugar al enmascaramiento de las diferencias (el ADNmt representa un 5% del ADN nuclear). Además, el estrés oxidativo neto parece ser dependiente del sexo del animal, de la especie, del tejido estudiado, del perfil lipídico de las membranas biológicas, etc. Hechas estas salvedades, se han hallado aumentos en los valores de exhalación de etano y pentano debidos a la edad en ratas viejas, así como mayores valores de grupos carbonilo de proteínas y 8-OHdG en el cerebro y otros tejidos de rata, ratones y humanos³⁸⁻⁴⁰.

propagar debido a la capacidad de división de mitocondrias y células, lo que permite la amplificación de las consecuencias fisiológicas del daño. Además, el daño al ADNmt podría ser incluso más importante que el que se inflige al ADN nuclear, ya que todo el genoma mitocondrial codifica genes que son expresados, mientras que el nuclear contiene una gran cantidad de secuencias no transcribibles¹².

44

parar ADN parece disminuir a medida que envejecen. Por tanto, el concepto de estrés oxidativo, además de tener en cuenta el grado de producción de ERO y/o la disminución de la capacidad antioxidante, debe ampliarse al complejo, y en gran manera desconocido, entramado de los sistemas de reparación del daño³².

Con respecto al comportamiento de las defensas antioxidantes durante el envejecimiento, parece que en general la protección no falla con la edad⁴²; si bien hay excepciones. No obstante, en el supuesto de que las defensas antioxidantes no fallasen, esto no sería un argumento contra de la teoría del estrés oxidativo, ya que ésta se puede considerar como una ecuación en la que intervienen múltiples factores, entre los cuales los valores de antioxidantes serían sólo una parte de estos factores. En dicha ecuación no se podrían olvidar factores como el grado de expresión y actividad de las enzimas antioxidantes, la eficacia de los sistemas de reparación, la disponibilidad de metales de transición en el medio, los cambios estructurales en el material biológico con la edad, la ingesta o procesamiento de antioxidantes procedentes de la dieta, la producción de radicales libres como tal y el punto en el que las células dañadas oxidativamente son eliminadas apoptóticamente¹. Hechas las anteriores salvedades, se puede decir que en general no hay descensos grandes en los valores de antioxidantes durante el envejecimiento, e incluso se han registrado algunos aumentos (elevación de los valores de vitamina E o aumento en la actividad SOD).

IMPLICACIONES DE LA NUTRICIÓN EN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

Aunque la presente revisión tiene por objeto el estudio del efecto que un tipo concreto de nutriente, como la grasa, tiene sobre el envejecimiento, conviene conocer, en líneas generales, cuál es la aportación que la nutrición en general puede ofrecer al estudio del envejecimiento. Esto es así debido al gran interés que existe en el desarrollo de terapias efectivas frente al proceso general del envejecimiento. De este modo, el desarrollo de cualquier terapia nutricional frente al envejecimiento sería de gran utilidad.

Desde hace mucho tiempo se ha relacionado la nutrición con el envejecimiento. Esta relación se ha centrado básicamente en los estudios de restricción calórica, según los que la reducción en la ingesta energética condiciona positivamente la longevidad de una serie de especies animales. Por otro lado, también se han realizado numerosos estudios centrados en el papel antioxidante de numerosas sustancias ingeridas en la dieta y en la posible suplementación con dichos antioxidantes.

Restricción calórica y retardo del proceso de envejecimiento

El papel de la restricción calórica, o lo que es lo mismo, de la limitación de la ingesta de alimentos, fue

descrito por primera vez en 1935 por McCay et al⁴³. Desde entonces se ha descrito que la restricción calórica aumenta la vida media en un amplio número de especies y en roedores; además, disminuye la velocidad con la que aparecen determinadas enfermedades relacionadas con la edad^{5,15}. Aunque hay varias teorías para explicar el efecto antienvjecimiento de la restricción calórica, la hipótesis más plausible propone que dicho efecto se lleva a cabo a través de una reducción en el estrés oxidativo. Esto se sustenta, entre otras cosas, en la observación de que ratones con una dieta calórica restringida generan un menor estrés oxidativo que sus homólogos alimentados *ad libitum*, produciendo, además, un menor índice de oxidación de lípidos, proteínas y ADN^{5,15}. La restricción calórica, por otro lado, previene muchos de los cambios que tienen lugar en la expresión génica durante el envejecimiento, entre los que se incluyen la elevación en la expresión de las proteínas de shock térmico, entre ellas la atenuación de la expresión de la proteína inducida por estrés Hsp70. Por último, también se ha observado que la restricción calórica proporciona a roedores la capacidad para soportar mejor un amplio rango de tipos fisiológicos de estrés, mejora la termotolerancia y reduce el daño inducido por calor en ratas viejas¹⁵. Para finalizar con el estudio de la restricción calórica, conviene añadir que se podría tratar de una potente arma terapéutica para luchar contra el envejecimiento, ya que en principio cumple con los requisitos exigibles de efectividad frente a la reducción del estrés oxidativo y al retardo del envejecimiento, y de las enfermedades asociadas a éste⁴⁴. No obstante, la posible aplicación de la restricción calórica como terapia antienvjecimiento en la población humana acarrea tales dificultades éticas y de tipo práctico que hacen inviable su puesta en marcha¹⁵.

Suplementación con antioxidantes

Como se ha puesto de manifiesto en los puntos anteriores, el estrés oxidativo desempeña un papel muy significativo en el proceso global del envejecimiento y, por tanto, la suplementación con antioxidantes podría ser de utilidad como posible terapia antienvjecimiento.

Entre los primeros estudios cabe destacar los de Miquel y Ecnómos⁴⁵ en relación con la capacidad del carboxilato de tiazolidina de aumentar la vitalidad y prolongar la vida media en ratones. Posteriormente, Furukawa et al⁴⁶ mostraron el papel protector de la administración oral de glutatión frente al declive de la función inmune asociada al envejecimiento. Se han probado muchos otros antioxidantes con relación al envejecimiento, con resultados más o menos positivos. Entre dichos antioxidantes cabe destacar las vitamina E y C, la coenzima Q, los extractos herbales ricos en flavonoides y polifenoles, entre otros^{1,17,47}. Si bien los resultados obtenidos con estos antioxidantes han sido exitosos en cuanto a la atenuación del estrés oxidativo

mediado por la edad o por enfermedades asociadas, han tenido poco o ningún éxito con relación al aumento de la longevidad. Tal vez para tener una mayor efectividad con la terapia basada en antioxidantes se debería profundizar en el conocimiento de las propiedades farmacológicas de las sustancias empleadas, sobre todo en lo concerniente a su absorción, su distribución tisular y su metabolismo. Además, no se debe olvidar el papel que las ERO tienen en la señalización celular, de modo que la dosis de antioxidante debe ser muy bien ajustada para evitar cambios en el estado redox que pudieran alterar la función celular. Los problemas anteriores están siendo solucionados en parte mediante el uso de una nueva generación de sustancias antioxidantes sintéticas, miméticos de la superóxido dismutasa y la catalasa. Estas sustancias se están ensayando con cierto éxito, y se han mostrado efectivas en el aumento de la longevidad en ratones y *Caenorhabditis elegans*⁴⁸⁻⁵⁰.

ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA Y ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL. UNA VISIÓN NOVEDOSA DEL PAPEL DE LA NUTRICIÓN EN EL ENVEJECIMIENTO

Efecto de la grasa de la dieta sobre la estructura y función mitocondrial

El tipo de grasa de la dieta condiciona de manera importante numerosos parámetros bioquímicos en la membrana mitocondrial^{51,52}. La importancia del tipo de ácidos grasos de la dieta reside en el hecho de que la membrana mitocondrial (y en general todas las membranas biológicas) es capaz de adaptar la composición de sus fosfolípidos a la grasa ingerida de forma mayoritaria⁵³⁻⁵⁵. De este modo, si un individuo ingiere mayoritariamente grasa de origen animal, sus membranas serán más ricas en grasa saturada que las de otro individuo cuya fuente grasa mayoritaria sea de origen vegetal. Por otro lado, se ha descrito de forma convincente cómo se producen adaptaciones del sistema de transporte electrónico mitocondrial en relación con el tipo de grasa de la dieta, con mayor o menor repercusión sobre los diversos complejos del sistema⁵⁶⁻⁵⁸. Además, el estrés oxidativo está relacionado con la composición lipídica de las membranas biológicas, de modo que una fuente grasa poliinsaturada (p. ej., aceite de girasol) generará membranas más susceptibles al daño oxidativo que una fuente saturada (grasa animal) o monoinsaturada (aceite de oliva), lo que se ha demostrado ampliamente en numerosas situaciones fisiológicas y patológicas mediante el empleo de numerosos modelos animales y humanos⁵⁹⁻⁶³.

Por tanto, el tipo de grasa de la dieta condicionará la funcionalidad y la estructura de las mitocondrias así como su susceptibilidad a ser atacadas oxidativamente. De este modo, si pudiéramos construir membranas biológicas "a la carta", en función del tipo de grasa de la dieta, seríamos capaces de condicionar positiva-

mente la forma y el grado en que distintos órganos envejecieran. Esta hipótesis de trabajo constituye un novedoso enfoque en la investigación del envejecimiento desde el punto de vista nutricional, que podría tener importantes repercusiones en cuanto al tratamiento del fenómeno en sí. Además, podría ayudarnos a entender las diferencias que en cuanto al fenómeno del envejecimiento se observan entre poblaciones de similar nivel socioeconómico pero con diferencias marcadas en cuanto a su dieta. Algo similar se ha demostrado ya en el caso de enfermedades como el cáncer y la enfermedad cardiovascular. Así, se ha demostrado que poblaciones como la mediterránea, con una ingesta de grasa marcadamente diferente en cuanto a su tipo (aunque a veces incluso superior en cantidad) a la que se sigue en el norte de Europa o Estados Unidos presenta menores tasas de estas afecciones⁶⁴. Obviamente, están implicados otros factores, además de la fuente grasa de la dieta en estas diferencias, pero el papel de la grasa es lo suficientemente importante como para que se tenga en cuenta y, al igual que podría ocurrir en el caso del envejecimiento, desde el punto de vista de los mecanismos celulares y moleculares nos serviría para encontrar explicación a muchos de los fenómenos observados.

Ácidos grasos de la dieta y envejecimiento: un modelo experimental

Basándose en las observaciones anteriores y con objeto de ensayar la hipótesis enunciada, nuestro grupo de investigación viene realizando desde mediados de los años noventa una serie de estudios en ratas, basados en su alimentación a lo largo de toda la vida con aceite de oliva virgen o aceite de girasol. Ambas grasas se usan debido a las diferencias en su perfil lipídico (tabla 1), así como porque se trata de las 2 fuentes grasas mayoritarias en nuestra sociedad y porque se han demostrado marcadas diferencias en enfermedades como las mencionadas en el párrafo anterior. En resumen, lo que se pretende investigar es si el tipo de grasa de la dieta es capaz de modular fenómenos mitocondriales relacionados con el envejecimiento, como el estrés oxidativo o la alteración de la funcionalidad mitocondrial. Además, debido a que no todos los teji-

TABLA 1. Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales

Ácido graso o índice	Aceite de oliva virgen (%)	Aceite de girasol (%)
16:0	8,92	12,6
16:1 (N-7)	1,06	0,2
18:0	1,97	1,9
18:1 (n-9)	78,73	24,1
18:2 (n-6)	8,36	60,1
18:3 (n-3)	0,96	1
Saturados totales	10,89	14,6
Insaturados totales	89,11	85,4
Monoinsaturados totales	79,79	24,3
Poliinsaturados totales	9,32	61,1

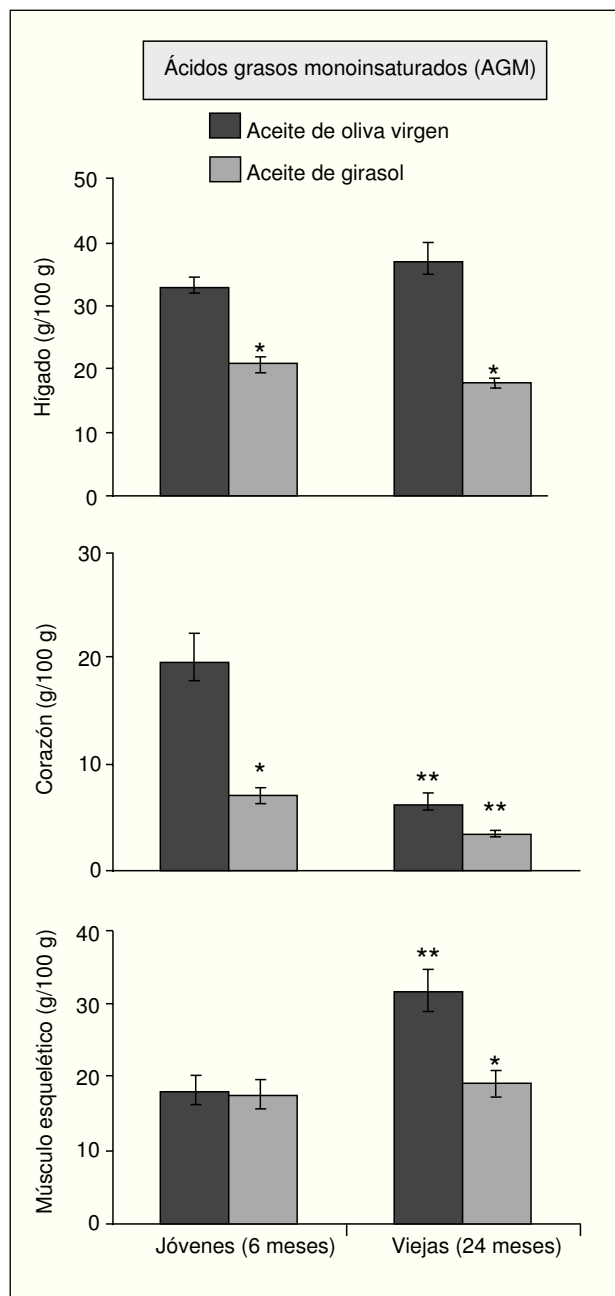


Fig. 3. Efecto del tipo de grasa de la dieta y de la edad sobre las proporciones de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) en la membrana mitocondrial del hígado, el corazón y el músculo esquelético de rata. Los resultados son la media y el error estándar para 20 animales. *Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre aceite de oliva y aceite de girasol para cada grupo de edad. **Diferencias estadísticamente significativas entre animales jóvenes y viejos para cada tipo de aceite.

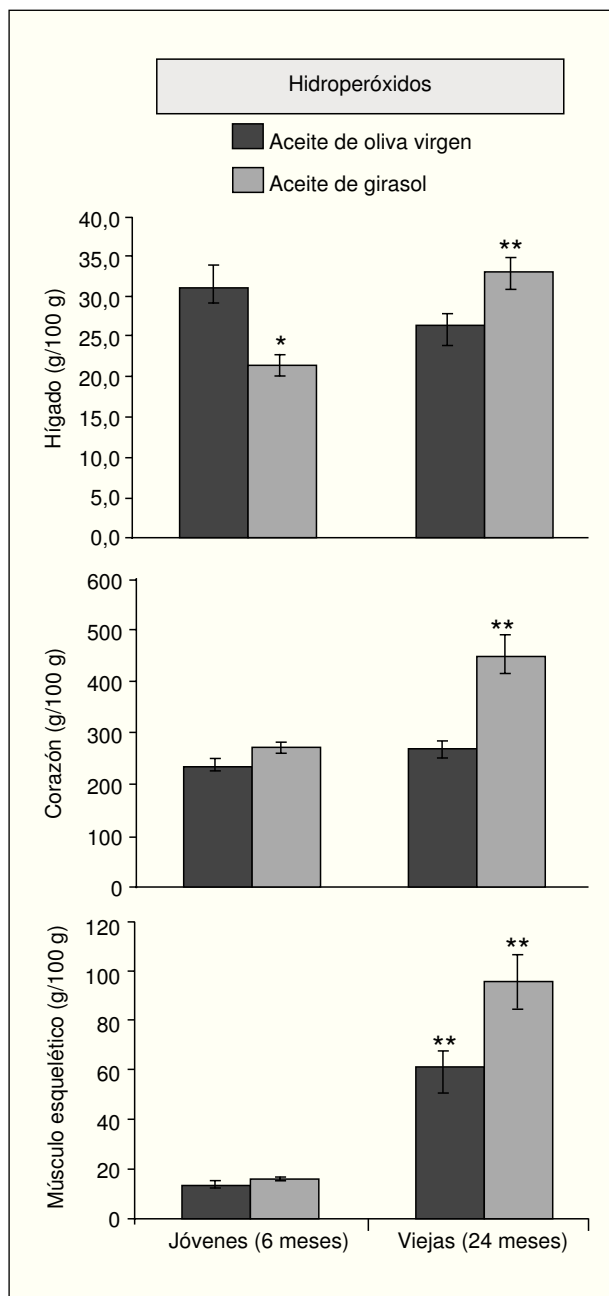


Fig. 4. Efecto del tipo de grasa de la dieta y de la edad sobre la concentración de hidroperóxidos en mitocondrias del hígado, el corazón y el músculo esquelético de rata. Los resultados son la media y el error estándar para 20 animales. *Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre aceite de oliva y aceite de girasol para cada grupo de edad. **Diferencias estadísticamente significativas entre animales jóvenes y viejos para cada tipo de aceite.

dos del organismo tienen la misma susceptibilidad al daño oxidativo y parece que se comportan de un modo diferente ante el envejecimiento, llevamos a cabo nuestros experimentos en tejidos mitóticos, con capacidad de regeneración, como el hígado, y postmitóti-

cos, sin capacidad de regeneración, como el músculo esquelético o el corazón.

En la tabla 1 se expone cómo el contenido en ácido oleico, monoinsaturado, y el contenido en ácido linoleico, poliinsaturado, es marcadamente diferente entre

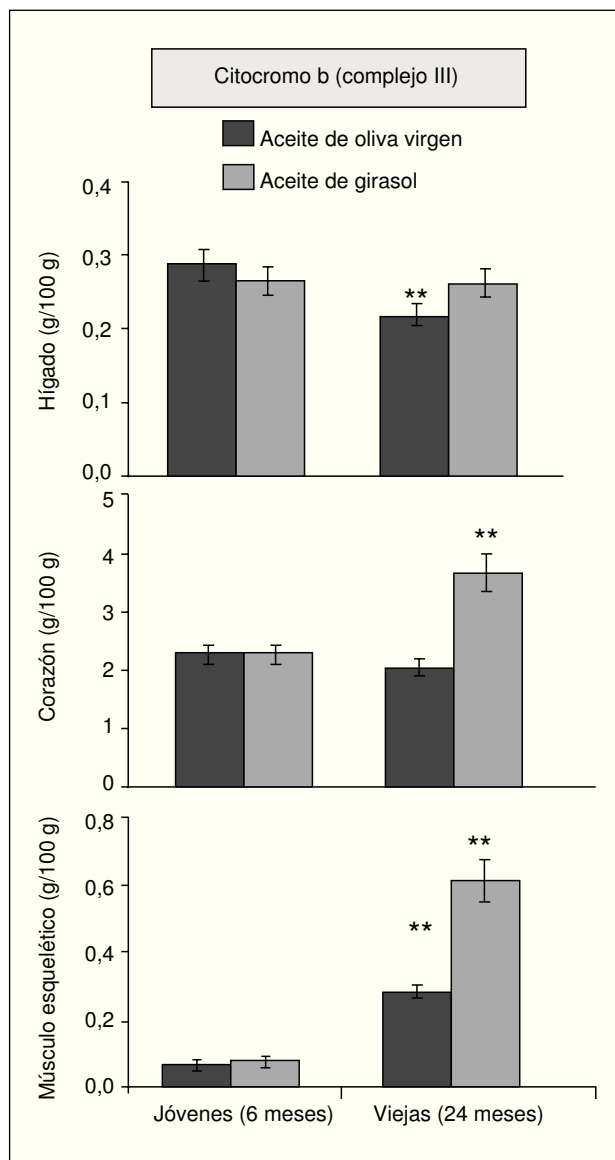


Fig. 5. Efecto del tipo de grasa de la dieta y de la edad sobre la concentración de citocromo b (complejo III) en mitocondrias del hígado, el corazón y el músculo esquelético de rata. Los resultados son la media y el error estándar para 20 animales. *Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre aceite de oliva y aceite de girasol para cada grupo de edad. **Diferencias estadísticamente significativas entre animales jóvenes y viejos para cada tipo de aceite.

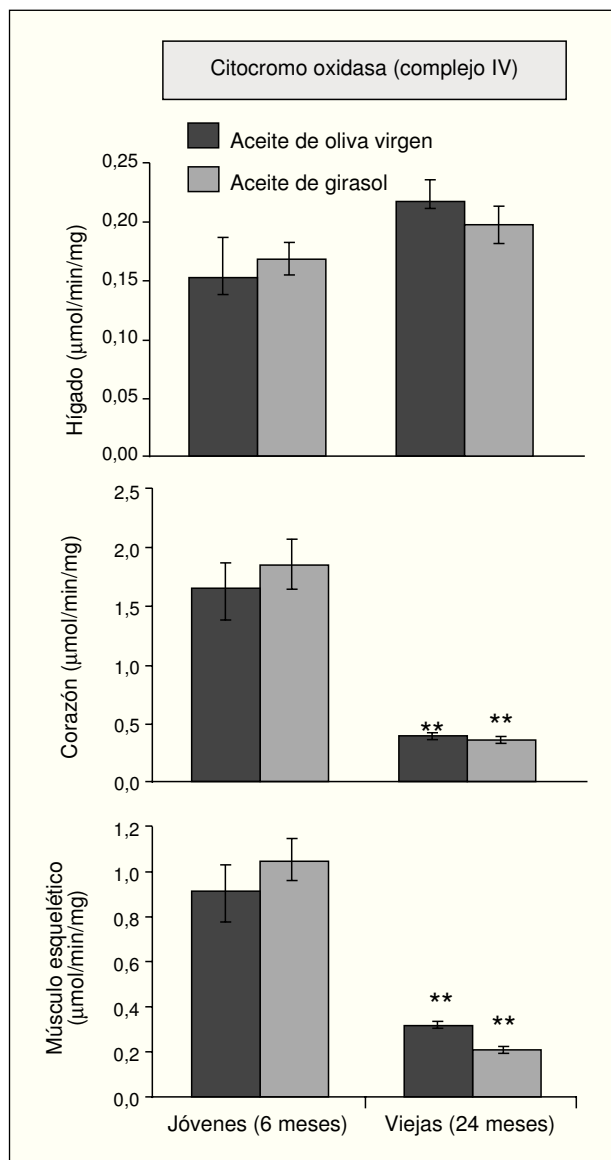


Fig. 6. Efecto del tipo de grasa de la dieta y de la edad sobre la actividad del complejo IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (citocromo oxidasa) en mitocondrias del hígado, el corazón y el músculo esquelético de rata. Los resultados son la media y el error estándar para 20 animales. *Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre aceite de oliva y aceite de girasol para cada grupo de edad. **Diferencias estadísticamente significativas entre animales jóvenes y viejos para cada tipo de aceite.

ambas dietas. Así, lo primero que hay que estudiar es si estas diferencias se transmiten a la membrana mitocondrial. Esto efectivamente ocurre, tal y como se expone en la figura 3, donde se observa la proporción en ácidos grasos monoinsaturados (AGM) presente en las membranas mitocondriales del hígado, el corazón y el músculo de los animales alimentados con ambas dietas. En la figura se muestra que los animales alimentados con dietas cuya fuente grasa es aceite de oliva presentan los mayores porcentajes de AGM, y lo con-

trario ocurre con los animales alimentados con aceite de girasol. De estos resultados se pueden extraer las primeras conclusiones: la intervención nutricional basada en el tipo de grasa se refleja en la composición mitocondrial; además, esta adaptación se mantiene a lo largo de toda la vida. De este modo, el posible beneficio derivado del uso de un tipo específico de grasa en la alimentación se mantiene durante toda la vida. Esto es de gran importancia, ya que abre las puertas a una posible terapia anti-envejecimiento a través de la

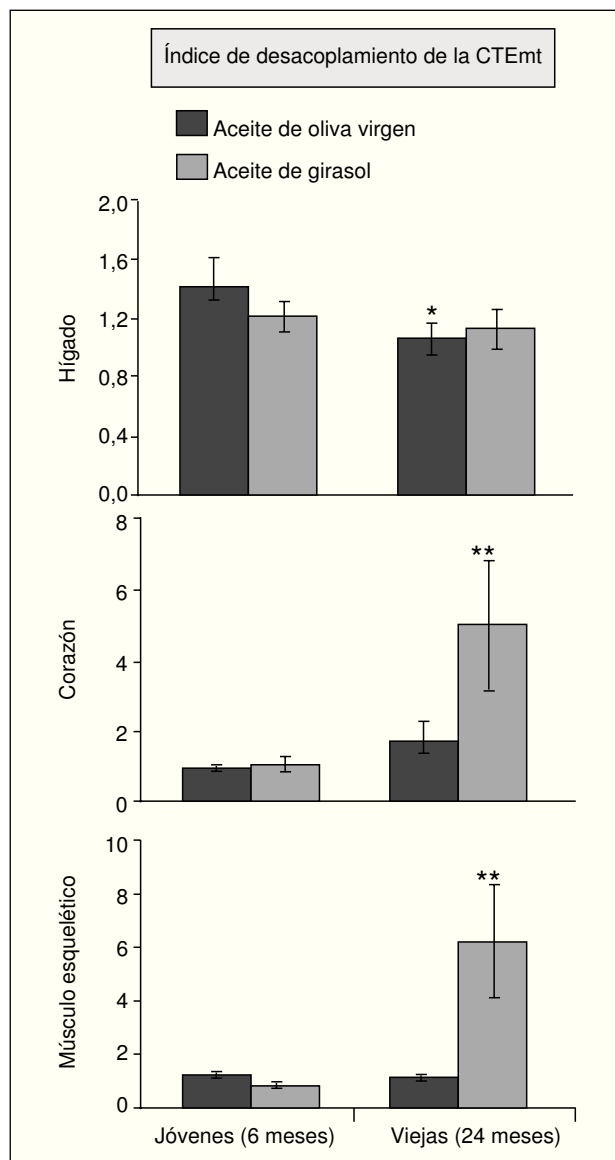


Fig. 7. Efecto del tipo de grasa de la dieta y de la edad sobre el grado de desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en mitocondrias del hígado, el corazón y el músculo esquelético de rata. Los resultados son la media y el error estándar para 20 animales. *Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre aceite de oliva y aceite de girasol para cada grupo de edad. **Diferencias estadísticamente significativas entre animales jóvenes y viejos para cada tipo de aceite.

dieta. De los resultados sobre el perfil lipídico (figura 3) también se deduce que cada órgano tiene un grado diferente de adaptación, como lo refleja la proporción diferente de AGM que presentan de forma basal, así como las diferencias relativas con respecto a los animales alimentados con aceite de girasol.

En la figura 4 se presenta el grado de peroxidación lipídica de las membranas mitocondriales, expresado como contenido en hidroperóxidos. En la figura se observa que en los 3 órganos estudiados, el grado de peroxidación que se alcanza al final del estudio, cuando

los animales son viejos, es mayor si la grasa ingerida es aceite de girasol, e independientemente del grado de peroxidación al inicio del estudio. Estos resultados concuerdan con lo comentado acerca de la mayor susceptibilidad a la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Por otro lado, es interesante observar cómo el tejido que menos se afecta es el hígado, con cierta capacidad de regeneración, mientras que los tejidos posmitóticos son, en general, mucho más sensibles al daño oxidativo, con independencia de la dieta ingerida. Sin embargo, es precisamente en esos tejidos posmitóticos donde el aceite de oliva ejerce su mejor acción, ya que si bien el daño aumenta con la edad, los animales alimentados con aceite de oliva virgen presentan un grado de daño muy inferior al observado en el caso de la dieta poliinsaturada.

Con el fin de estudiar si las variaciones observadas en la composición lipídica de la membrana mitocondrial o en el daño oxidativo podrían tener repercusiones en la funcionalidad de la maquinaria bioenergética celular, la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTEmt), se estudió el contenido y actividad de algunos de los complejos de dicha cadena de transporte. En la figura 5 se muestra el contenido en citocromo b, componente del complejo III (figs. 1 y 2) y que se ha implicado de forma directa en el fenómeno del envejecimiento. En efecto, se ha observado que el contenido y actividad del citocromo b suele aumentar durante el envejecimiento, tal vez en un intento de la célula por recuperar la actividad que va perdiendo con la edad, o bien para tratar de conseguir la energía necesaria para reparar el daño oxidativo implícito al envejecimiento o como consecuencia de un proceso de desacoplamiento⁵⁷. Además, está demostrado que la principal producción de radicales libres mitocondriales tiene lugar en el complejo III. Nosotros encontramos que el corazón y el músculo esquelético de los animales alimentados con aceite de girasol presentaban un aumento espectacular de los valores mitocondriales de citocromo b, mientras que los alimentados con aceite de oliva virgen no lo aumentaban o bien lo hacían en un grado muy inferior al observado con la otra dieta.

En la figura 6 se expone la actividad del complejo IV (citocromo oxidasa), el aceptor final de electrones en la CTEmt, presente en el complejo IV de la cadena (figs. 1 y 2). En la figura se observan fuertes descensos en la actividad de citocromo oxidasa en el corazón y el músculo de animales viejos pero no en el hígado. Estos datos indican que la funcionalidad mitocondrial en el hígado no se afecta durante el envejecimiento, mientras que hay un fuerte declive en la función mitocondrial cardíaca y muscular. Además, en el caso del músculo, el declive es mayor cuando la grasa ingerida es aceite de girasol.

En la figura 7 se muestra el índice de desacoplamiento de la CTEmt, es decir, el grado de ineficacia de dicha cadena. Este índice es muy importante, ya que se encuentra relacionado con la correcta funciona-

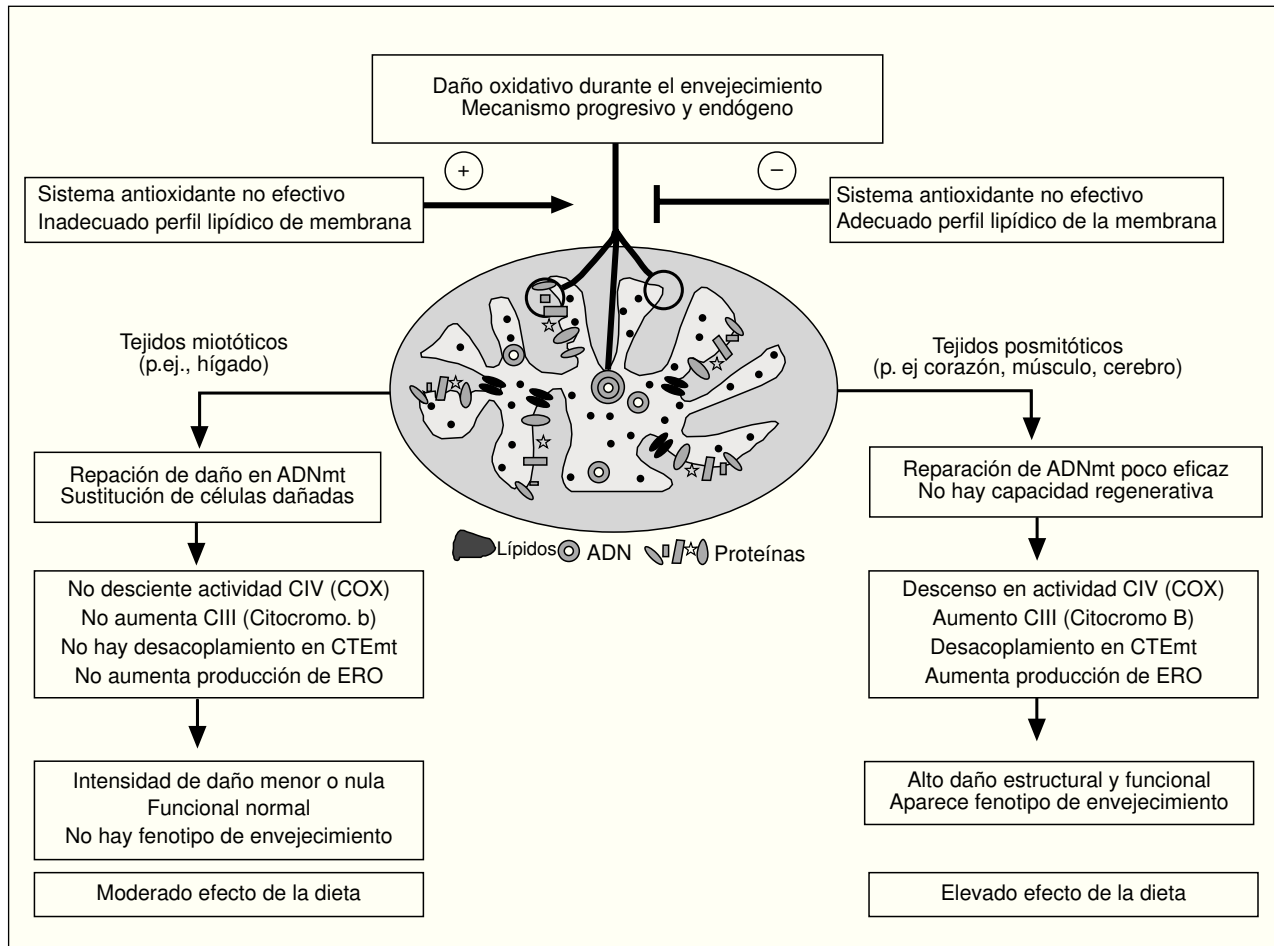


Fig. 8. Hipótesis sobre las causas que conducen a un diferente grado de daño en tejidos mitocondriales y posmitóticos durante el envejecimiento como consecuencia del estrés oxidativo mitocondrial y sobre el papel modulador de los antioxidantes y los ácidos grasos de la dieta. CTEmt: cadena de transporte electrónico mitocondrial; CIV: complejo IV; CIII: complejo III; ERO: especies reactivas del oxígeno.

alidad bioenergética mitocondrial. Además, es un índice clave para determinar la capacidad potencial de producción de radicales libres en la CTEmt, ya que el complejo III, que es el numerador del índice, es el principal sitio de producción de ERO en la mitocondria. El denominador del índice es el complejo IV, por tanto, un índice superior a 1 muestra que, estequiométricamente, el complejo III predomina sobre el IV, de modo que se produce una acumulación electrónica en el complejo III, lo que favorece la producción de ERO. Los resultados obtenidos en cuanto al índice de desacoplamiento ponen de manifiesto que el hígado no muestra tal desacoplamiento, mientras que el corazón y el músculo de los animales alimentados con la fuente poliinsaturada girasol presentan un alto índice de desacoplamiento con la edad.

Mecanismo propuesto

Los resultados del estudio anterior permiten plantar el mecanismo causante de un diferente grado de estrés oxidativo durante el envejecimiento, en función del

tipo de tejido y el papel modulador del tipo de grasa de la dieta. En dicho mecanismo se hallarían implicados el perfil de ácidos grasos de la membrana mitocondrial, aspectos de la bioenergética mitocondrial, así como la particular capacidad regenerativa y reparadora de los distintos tejidos. Dicho mecanismo consistiría en lo siguiente (fig. 8): el envejecimiento, entendido como un proceso endógeno y progresivo³, da lugar a lo largo de la vida a alteraciones en la mitocondria y componentes de la misma como el ADNmt (alteraciones que tienen un elevado componente oxidativo)^{37,39,40}. Estas alteraciones deterioran la estructura y función mitocondriales y, dependiendo de la capacidad del tejido en concreto para reparar el daño o eliminar la célula alterada, la función tisular se verá afectada en mayor o menor grado⁶⁵. Así, los tejidos con capacidad regenerativa como el hígado parecen ser capaces de tamponar el daño ocasionado, tal y como sugiere la ausencia de pérdida de función mitocondrial en términos de actividad citocromo oxidasa. Sin embargo, se produce una pérdida de función en tejidos posmitóticos, como el músculo esquelético o el

corazón, sin capacidad para reemplazar células y probablemente con un sistema de reparación de daño menos efectivo (existen diferencias entre el hígado y el corazón en relación con el sistema de reparación de ADNmt⁶⁶). Esta pérdida de función se refleja en el descenso brusco de la actividad citocromo oxidasa, lo que da lugar a un desacoplamiento de la CTEmt, con la consiguiente ineficacia bioenergética y el aumento en la producción de ERO^{65,67}. Las mitocondrias de los tejidos posmitóticos tratan de atenuar la situación desfavorable mediante el aumento de otros componentes de la CTEmt, como el citocromo b, o por medio de aumentos en el grado de poliinsaturación, probablemente para tratar de aumentar la fluidez y la actividad de la citocromo oxidasa restante por la presencia de una cardiolipina más poliinsaturada^{57,58}. Sin embargo, ambas acciones dan lugar a un aumento mayor en la producción de radicales libres. El papel de la grasa de la dieta en este mecanismo residiría, por tanto, en la construcción de un entorno más o menos susceptible para la generación y la propagación de ERO, especialmente cuando, como consecuencia de procesos como el envejecimiento, tienen lugar los fallos en la CTEmt. La dieta, además, podría modular el fenómeno mediante modificaciones en el sistema antioxidante y, en general, potenciar o atenuar todo el proceso; si bien, dado que los tejidos posmitóticos son los más afectados, en éstos el aspecto nutricional sería más importante.

AGRADECIMIENTO

Parte de la investigación que se muestra en esta revisión ha sido financiada a través del proyecto ALI95-1036-C05-04 del Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid, España. El Dr. José L. Quiles y el Dr. Julio L. Ochoa están financiados mediante el programa Ramón y Cajal del Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid, España y la Universidad de Granada.

BIBLIOGRAFÍA

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- Camougrand N, Rigoulet M. Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. *Resp Physiol* 2001;128:393-401.
- Barja G. Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1167-72.
- Partridge L, Gems D. A lethal side-effect. *Nature* 2002;418:921.
- Masoro EJ. Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 2000;35:299-305.
- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med* 2002;33:575-86.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298-300.
- Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 1972;20:145-7.
- Miquel J, Economos AC, Fleming JE, Johnson JE. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980;15:579-91.
- Finch CE, Ruvkun G. The genetics of aging. *Ann Rev Genomics Human Genet* 2001;2:435-62.
- Salvioli S, Bonafè M, Capri M, Monti D, Franceschi C. Mitochondria, aging and longevity – a new perspective. *FEBS Lett* 2001;492:9-13.
- Van Remmen H, Richardson A. Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp Gerontol* 2001;36:957-68.
- De Benedictis G, Carrieri G, Varcasia O, Bonafè M, Franceschi C. Inherited variability of the mitochondrial genome and successful aging in humans. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:208-18.
- Tanaka M, Gong J, Zhang J, Yamada Y, Borgeld H, Yagi K. Mitochondrial genotype associated with longevity. *Lancet* 1998; 351:185-6.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.
- Watson WH, Cai J, Jones DP. Diet and apoptosis. *Annu Rev Nutr* 2000;20:485-505.
- Sastre J, Pallardó, FV, García de la Asunción J, Viña J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Rad Res* 2000;32: 189-98.
- Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:3-67.
- Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* 2000;29:222-30.
- Quiles JL. Estudio comparativo de aceite de oliva y girasol sobre la peroxidación lipídica en ratas sometidas a ejercicio físico [tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada, 1995.
- Cross AR, Jones OT. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* 1991;1057:281-98.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AOM. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977;180: 248-57.
- Ksenzenko M, Konstantinov AA, Khomutov GB, Tikhonov AN, Ruuge EK. Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bc1 site of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Lett* 1983;155:19-24.
- Shimomura Y, Nishikimi M, Ozawa T. Novel purification of cytochrome c1 from mitochondrial Complex III. Reconstitution of antimycin-insensitive electron transfer with the iron-sulfur protein and cytochrome c1. *J Biol Chem* 1985;260:15075-80.
- Hauptmann N, Grimsby J, Shih JC, Cadenas E. The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 1996; 335:295-304.
- Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Flint Beal M, Markesbery WR, Roberts LJ, et al. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2002;33:620-6.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.
- Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Quagliariello E. Peroxidative damage to cardiac mitochondria: cytochrome oxidase and cardiolipin alterations. *FEBS Lett* 1998;424:155-8.
- Lippe G, Comelli M, Mazzilis D, Sala FD, Mavelli L. The inactivation of mitochondrial F1 ATPase by H2O2 is mediated by iron ions not tightly bound in the protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:764-70.
- Forsmark-Andree P, Lee CP, Dallner G, Ernster L. Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles. *Free Radic Biol Med* 1997;22:391-400.
- Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6465-7.
- Bohr VA, Anson RM. Mitochondrial DNA repair pathways. *J Bioenerg Biomembr* 1999;31:391-8.

33. Chung MH, Kasai H, Nishimura S, Yu BP. Protection of DNA damage by dietary restriction. *Free Radic Biol Med* 1992; 12:523-5.
34. Agarwal S, Sohal RS. DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994;91:12332-5.
35. Yoneda M, Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, Ozawa T. Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:723-9.
36. Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992;89:7370-4.
37. Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 1999; 286:774-9.
38. Sagai M, Ichinose T. Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in expired gases of rats. *Life Sci* 1980;27:731-8.
39. Lee CM, Weindrich R, Aiken JM. Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Radic Biol Med* 1997;22: 1259-69.
40. Sohal RS, Dubey A. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Radic Biol Med* 1994;16: 621-6.
41. Barnett YA, King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res* 1995;338:115-28.
42. Kellog EW, Fridovich I. Superoxide dismutase in the rat and mouse as a function of age and longevity. *J Gerontol* 1976; 31:405-8.
43. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition* 1989;5:155-71.
44. Roth GS, Ingram DK, Lane MA. Calorie restriction in primates: will it work and how will we know? *J Am Geriatr Soc* 1999; 47:896-903.
45. Miquel J, Economos AC. Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and the life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol* 1979; 14:279-85.
46. Furukawa T, Meydani SN, Blumberg JB. Reversal of age-associated decline in immune responsiveness by dietary glutathione supplementation in mice. *Mech Ageing Develop* 1987;38:107-17.
47. Huertas JR, Martínez-Velasco E, Ibáñez S, López-Frías M, Ochoa JJ, Quiles JL, et al. Virgin olive oil protect heart mitochondria from peroxidative damage during aging. *Biofactors* 1999;9:337-43.
48. Melov S, Schneider JA, Day BJ, Hinerfeld D, Coskun P, Mirra SS, et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nature Genet* 1998; 18:159-63.
49. Rong Y, Doctrow SR, Tocco G, Baudry M. EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, prevents oxidative stress and attenuates kainate-induced neuropathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9897-902.
50. Melov S, Ravenscroft J, Malik S, Gill MS, Walker DW, Clayton PE, et al. Extension of lifespan with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 2000;289:1567-9.
51. Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mañas M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1998;24:511-21.
52. Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, Battino M, Mataix J. Physical exercise affects the lipid profile of mitochondrial membranes in rats fed with virgin olive oil or sunflower oil. *Br J Nutr* 1999;81:21-4.
53. Huertas JR, Battino M, Lenaz G, Mataix J. Changes in mitochondrial and microsomal rat liver coenzyme Q9 and Q10 content induced by dietary fat and endogenous lipid peroxidation. *FEBS Lett* 1991;5:89-92.
54. Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Ibáñez S, González A, Duthie GG, Huertas JR, et al. Vitamin E supplementation increases the stability and the in vivo antioxidant capacity of refined olive oil. *Free Rad Res* 1999;31:S129-35.
55. Ochoa-Herrera JJ, Huertas JR, Quiles JL, Mataix J. Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria. *J Nutr Biochem* 2001;12:357-64.
56. Battino M, Ferreiro MS, Littarru G, Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Huertas JR, et al. Structural damages induced by peroxidation could account for functional impairment of heavy synaptic mitochondria. *Free Rad Res* 2002;36:479-84.
57. Huertas JR, Battino M, Mataix J, Lenaz G. Cytochrome oxidase induction after oxidative stress induced by adriamycin in liver of rats fed with dietary olive oil. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:375-82.
58. Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J. Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in rat. *J Bioenerg Biomembr* 2001;33:127-43.
59. Battino M, Quiles JL, Huertas JR, Ramírez-Tortosa MC, Cassinello M, Mañas M, et al. Feeding fried oil changes antioxidant and fatty acid pattern of rat and affects rat liver mitochondrial respiratory chain components. *J Bioenerg Biomembr* 2002;34: 127-34.
60. Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Ramírez-Tortosa MC, Cassinello M, Mataix J, et al. The intake of fried virgin olive or sunflower oils differentially induces oxidative stress in rat liver microsomes. *Br J Nutr* 2002;88:57-65.
61. Ochoa JJ, Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Mataix J, Huertas JR. Dietary oils high in oleic acid but with different unsaponifiable fraction contents have different effects in lipid profile and peroxidation in rabbit-LDL. *Nutr* 2002;18:60-5.
62. Ramírez-Tortosa MC, López-Pedrosa JM, Suárez A, Ros E, Mataix J, Gil A. Olive oil and fish oil enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. *Br J Nutr* 1999;82:31-9.
63. Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Huertas JR, Ibáñez S, Gómez JA, Battino M, et al. Olive oil supplemented with vitamin E affects mitochondrial coenzyme Q levels in liver of rats after an oxidative stress induced by adriamycin. *Biofactors* 1999;9:331-6.
64. Mataix J, editor. Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario. Granada: Universidad de Granada y Puleva Food, 2001.
65. Quiles JL, Martínez E, Ibáñez S, Ochoa JJ, Martín Y, López-Frías M, et al. Ageing-related tissue-specific alterations in mitochondrial composition and function are modulated by dietary fat type in the rat. *J Bioenerg Biomembr* 2002;34:517-24.
66. Souza-Pinto N, Croteau DL, Hudson EK, Heansford EG, Bohr VA. Age-associated increase in 8-oxo-deoxyguanosine glycosylase/AP lyase activity in rat mitochondria. *Nucleic Acid Res* 1999;27:1935-42.
67. Ochoa JJ, Quiles JL, Ibáñez S, Martínez E, López-Frías M, Huertas JR, et al. Aging-related oxidative stress depends on dietary lipid source in rat postmitotic tissues. *J Bioenerg Biomembr* 2003;35:267-75.