

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL II)



MODULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL MEDIANTE LA
RESTRICCIÓN DE METIONINA EN LA DIETA O EL BLOQUEO DE
SEÑALIZACIÓN BETA-ANDRENÉRGICA EN RELACIÓN CON LA
LONGEVIDAD EN ROEDORES

MITOCHONDRIAL OXIDATIVE STRESS MODULATION THROUGH DIETARY
METHIONINE RESTRICTION OR BETA-ADRENERGIC SIGNALING
BLOCKING : RELATION TO LONGEVITY IN RODENTS

TESIS DOCTORAL DE:
INÉS SÁNCHEZ-ROMÁN ROJAS

BAJO LA DIRECCIÓN DE:
GUSTAVO BARJA DE QUIROGA LOSADA
MÓNICA LÓPEZ TORRES

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
(FISIOLÓGÍA ANIMAL II)**



**MODULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO
MITOCONDRIAL MEDIANTE LA RESTRICCIÓN DE
METIONINA EN LA DIETA O EL BLOQUEO DE LA
SEÑALIZACIÓN BETA-ADRENÉRGICA EN RELACIÓN
CON LA LONGEVIDAD EN ROEDORES**

MEMORIA PRESENTADA POR INÉS SÁNCHEZ-ROMÁN ROJAS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA POR LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

MADRID, 2013

COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID
FACULTY OF BIOLOGICAL SCIENCES
DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY
(ANIMAL PHYSIOLOGY II)



MITOCHONDRIAL OXIDATIVE STRESS MODULATION
THROUGH DIETARY METHIONINE RESTRICTION OR
BETA-ADRENERGIC SIGNALING BLOCKING.
RELATION TO LONGEVITY IN RODENTS.

THESIS PRESENTED BY INÉS SÁNCHEZ-ROMÁN ROJAS TO OBTAIN
THE PhD DEGREE IN BIOLOGY BY THE COMPLUTENSE
UNIVERSITY OF MADRID

MADRID, 2013



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL II)
C/ JOSÉ ANTONIO NOVAIS, 2
28040 – MADRID

Gustavo Barja de Quiroga Losada, Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid, y Mónica López Torres, Profesora Titular de la Universidad Complutense de Madrid,

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Modulación del estrés oxidativo mitocondrial mediante la restricción de metionina en la dieta o el bloqueo de la señalización beta-adrenérgica en relación con la longevidad en roedores” realizada por D^a Inés Sánchez-Román Rojas bajo nuestra dirección y supervisión en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) para la obtención del título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a 12 de junio de 2013.

Dr. Gustavo Barja de Quiroga Losada

Dra. Mónica López Torres



La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. Gustavo Barja de Quiroga y la codirección de la Dra. Mónica López Torres. Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo económico prestado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2008-00335/BFI; BFU2011-23888) y de la Universidad Complutense de Madrid (BSCH-UCM 2009-2010) al Dr. Gustavo Barja, y por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2009-118/79BFI), el Ministerio de Sanidad (ISCIII, Red de Envejecimiento y Fragilidad, RD06/0013/0012) y la Generalitat de Cataluña (2009SGR735) al Dr. Reinald Pamplona. Inés Sánchez-Román Rojas ha sido beneficiaria de una beca de postgrado de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación.

ABREVIATURAS

%FRL	Fuga porcentual de radicales libres
4-HNE	4-hidroxinonenal
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihidro-2' deoxiguanosina
AA	Antimicina A
AASA	Semialdehído aminoadípico
ACL	Longitud media de la cadena
AC5	Adenilato ciclasa tipo 5
AIF	Factor inductor de apoptosis
β -AR	β -adrenérgico
BER	Actividad reparadora por escisión de base
CEL	N ^E -(Carboxietil) lisina
CML	N ^E -(Carboximetil) lisina.
DBI	Índice de dobles enlaces
dG	Deoxiguanosina
ERK	Kinasa regulada por señal extracelular
GC/MS	Cromatografía de gases / espectrometría de masas
GSA	Semiadehído glutámico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MDAL	N ^E -(malondialdehído)-lisina
MLSP	Longevidad máxima
MnSOD	Superóxido dismutasa manganeso
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
NRF-2	Factor nuclear respiratorio-2
PGC1- α	Coactivador-1 α del receptor- γ activado por proliferadores de peroxisomas
PI	Índice de peroxidizabilidad
pO ₂	Presión parcial de oxígeno
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RCI	Índice de control respiratorio
RD	Restricción de dieta
RMet	Restricción de metionina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP	Restricción proteica
ROT	Rotenona
SAH	S-Adenosilhomocisteína
SAM	S-Adenosilmetionina
SFA	Ácidos grasos saturados
SIRT	Sirtuina
SOD	Superóxido dismutasa
UCP	Proteína desacoplante
UFA	Ácidos grasos insaturados

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	9
1. ENVEJECIMIENTO	11
1.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS	13
1.2. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO	14
1.3. TEORÍA MITOCONDRIAL DEL ENVEJECIMIENTO POR RADICALES LIBRES	15
2. ESTRÉS OXIDATIVO	18
2.1. PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE RADICALES LIBRES	18
2.1.1. La mitocondria	18
2.1.2. Cadena de transporte electrónico	21
2.1.3. Radicales Libres	28
2.1.4. Modulación de la producción de radicales libres	31
2.2. DAÑO OXIDATIVO	33
2.2.1. Daño oxidativo al ADN	34
2.2.2. Daño oxidativo a lípidos	38
2.2.3. Daño oxidativo a proteínas	40
2.2.4. Daño oxidativo a hidratos de carbono	42
3. FACTORES QUE RELACIONAN EL ESTRÉS OXIDATIVO CON LA LONGEVIDAD MÁXIMA	43
3.1. PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE RADICALES LIBRES	44
3.2. MACROMOLÉCULAS RESISTENTES AL DAÑO OXIDATIVO	47
3.2.1. Grado de insaturación de los ácidos grasos	47
3.2.2. Contenido en metionina o cisteína de las proteínas	50
4. MANIPULACIONES QUE INCREMENTAN LA LONGEVIDAD MÁXIMA	51
4.1. RESTRICCIÓN DE DIETA	51
4.2. RESTRICCIÓN DE METIONINA	55
4.2.1. Efecto sobre la longevidad máxima	55
4.2.2. Efectos sobre el estrés oxidativo mitocondrial	57
4.2.3. Metabolismo de la metionina y su impacto sobre la metilación del ADN	60
4.3. MANIPULACIONES GENÉTICAS	62
4.3.1. Sistema Insulina/IGF-1, TOR y Sirtuinas	62
4.3.2. Modelo AC5 K.O.	65
4.4. APROXIMACIONES FARMACOLÓGICAS	68

4.4.1. Resveratrol, rapamicina y metformina: ¿mimetizan la RD?	68
4.4.2. Atenolol	69
OBJETIVOS	73
RESULTADOS	81
CAPÍTULO I. EFECTO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA EN LA DIETA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL	83
1.1. Forty percent methionine restriction lowers DNA methylation, complex I ROS generation, and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins in rat heart	85
1.2. Effects of aging and methionine restriction applied at old age on ROS generation and oxidative damage in rat liver mitochondria	95
1.3. Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: Role of methionine restriction	109
CAPÍTULO II. MODULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL MEDIANTE EL BLOQUEO DE LA SEÑALIZACIÓN BETA ADRENÉRGICA	123
2.1. The β -blocker atenolol lowers the longevity-related degree of fatty acid unsaturation, decreases protein oxidative damage, and increases extracellular signal-regulated kinase signaling in the heart of C57BL/6 mice	125
CAPÍTULO III. EFECTOS SINÉRGICOS E INDEPENDIENTES DEL TRATAMIENTO CONJUNTO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA Y EL BLOQUEO DE LA SEÑALIZACIÓN BETA-ADRENÉRGICA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL	137
3. 1. Independent and synergic effects of atenolol and methionine restriction on rat mitochondria oxidative stress	139
DISCUSIÓN	171
1. RESUMEN DE LOS RESULTADOS MÁS SIGNIFICATIVOS	173
2. EFECTO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA A CORTO PLAZO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL EN EL CORAZÓN DE RATA	178
3. RESTRICCIÓN DE METIONINA Y ENVEJECIMIENTO: EFECTO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA A CORTO PLAZO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL EN EL HÍGADO DE ANIMALES VIEJOS	187

4. MODULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL MEDIANTE EL BLOQUEO DE LA SEÑALIZACIÓN BETA ADRENÉRGICA	194
5. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CONJUNTO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA EN LA DIETA Y EL BLOQUEO BETA-ADRENÉRGICO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL	204
6. MODULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE ROS. PAPEL DE UNA SOLA MOLÉCULA: LA METIONINA	212
7. MODULACIÓN DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA	221
CONCLUSIONES	227
BIBLIOGRAFÍA	231
ANEXOS	259
I. DISEÑO EXPERIMENTAL	261
II. MÉTODOS	265
III. ENGLISH VERSION: SUMMARY AND CONCLUSIONS	269

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Entender el proceso del envejecimiento se ha convertido en una de las cuestiones más interesantes para el ser humano. A pesar de que han sido muchas las teorías propuestas para intentar explicarlo, la teoría que actualmente se ve confirmada por numerosas evidencias procedentes tanto de la Biología Comparada como de la Biología Experimental es la Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres (Harman, 1972; Miquel et al., 1980), según la cual, las mitocondrias y particularmente los complejos I y III de la cadena respiratoria producen radicales libres derivados del oxígeno (ROS) que pueden dañar oxidativamente diferentes componentes celulares, contribuyendo al envejecimiento del organismo.

Las investigaciones procedentes de la Biología Comparada han demostrado que existen dos factores relacionados con el estrés oxidativo que correlacionan de forma inversa con la longevidad en mamíferos y aves. Así, estas especies longevas se caracterizan por tener una baja producción mitocondrial de ROS por parte del complejo I de la cadena respiratoria y un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares de sus tejidos (índice de dobles enlaces, DBI), lo que disminuye el daño oxidativo y reduce la peroxidación lipídica en comparación con las especies de vida corta (Pamplona y Barja, 2011).

Acerca de los estudios en Biología Experimental, la restricción de dieta (RD), la manipulación mejor conocida que incrementa la longevidad en la mayoría de los organismos estudiados, reduce la producción mitocondrial de ROS en el complejo I y el daño oxidativo mitocondrial en la mayoría de los tejidos en los que ha sido estudiado y con un tratamiento a largo plazo (Gredilla y Barja, 2005). Tras el estudio de diversas intervenciones nutricionales con el fin de encontrar el componente dietético responsable de los efectos beneficiosos de la RD, se ha demostrado que ni la restricción lipídica ni la restricción de carbohidratos afectan al estrés oxidativo, lo que concuerda con la ausencia de efecto de estas manipulaciones sobre la longevidad en roedores. En cambio, la restricción proteica (RP) y concretamente, la restricción al 80% de un solo aminoácido: la metionina (Restricción de metionina, RMet), incrementan la

longevidad máxima, ejercen numerosos efectos beneficiosos en roedores y disminuyen la producción mitocondrial de radicales libres en el complejo I y el daño oxidativo en corazón e hígado de rata (Lopez-Torres y Barja, 2008). Sin embargo, estos trabajos se han llevado a cabo con una restricción de metionina al 80%, mientras que los estudios de RD conllevan una restricción del 40%. Además, ambas intervenciones ejercen efectos negativos sobre la tasa de crecimiento, la maduración sexual y el tamaño corporal. Por ello, la manipulación relevante para futuras extrapolaciones en humanos es la restricción de metionina al 40%, que es la intervención objeto de estudio en la presente tesis.

Otro tipo de manipulaciones experimentales que incrementan la longevidad en roedores son las intervenciones genéticas. El modelo descrito por Yan y colaboradores en 2007 está basado en la interrupción de la señalización β -adrenérgica (β -AR) mediante el bloqueo de la expresión génica de la adenilato ciclasa tipo 5 (AC5) en ratones AC5 *Knockout* (AC5KO). Estos ratones AC5KO muestran mayor longevidad tanto media como máxima, están protegidos frente a cardiomiopatías y a la pérdida de masa ósea y presentan mayor resistencia al estrés oxidativo, lo que los autores han propuesto como respuesta a la estimulación de la vía de señalización Raf/MEK/ERK. Sin embargo, los mecanismos que conducen a estos efectos beneficiosos no se han aclarado (Yan et al., 2007).

Por ello, esta tesis tiene como objetivo general profundizar en los mecanismos a través de los cuales la restricción de metionina en la dieta y el bloqueo de la señalización β -adrenérgica disminuyen la tasa de envejecimiento con el fin de aclarar si los dos parámetros conocidos que relacionan el estrés oxidativo con la longevidad: la producción mitocondrial de ROS y el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, pueden verse modificados por estas intervenciones. Para ello, se desarrollaron los siguientes objetivos concretos: 1. Investigar si la restricción de metionina al 40% en la dieta disminuye el estrés oxidativo mitocondrial en el corazón de rata Wistar de forma similar a lo descrito en restricción de metionina al 80%. 2. Determinar si las ratas viejas mantienen la capacidad de disminuir el estrés oxidativo como respuesta a la restricción de metionina al 40% a corto plazo 3. Analizar si el bloqueo de la señalización β -adrenérgica mediante el tratamiento con el fármaco

atenolol modula el estrés oxidativo en el corazón de ratón C57BL/6. 4. Determinar si el tratamiento conjunto de la restricción de metionina en dieta y el bloqueo de la señalización β -adrenérgica puede ejercer efectos aditivos o incluso sinérgicos sobre el estrés oxidativo mitocondrial en el corazón de rata.

CONTENIDO DE LA INVESTIGACIÓN

1. Efecto de la restricción de metionina en la dieta sobre el estrés oxidativo mitocondrial en corazón de rata

El efecto de la restricción de metionina al 40% en corazón de rata se investigó con el fin de determinar si la metionina es el componente dietético responsable de los efectos que la restricción de dieta al 40% ejerce sobre el estrés oxidativo, lo que es interesante dado que la restricción de metionina al 40% no afecta a la tasa de crecimiento y sería una manipulación mucho más fácil de implementar en la población humana.

Así, el tratamiento durante 7 semanas con restricción isocalórica de metionina al 40% no afectó a la tasa de crecimiento y disminuyó la producción mitocondrial de ROS exclusivamente en el complejo I, sin modificar el consumo de oxígeno mitocondrial ni la cantidad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa manganeso (MnSOD) en mitocondrias cardiacas de rata. De acuerdo con la menor producción de radicales libres, el tratamiento disminuyó el daño oxidativo al ADN mitocondrial y el nivel de los marcadores de oxidación, lipoxidación y glicoxidación proteica. Los cambios observados son similares aunque ligeramente menos intensos a los descritos previamente en el corazón de ratas restringidas en metionina al 80% (Sanz et al., 2006) y más acusados que los descritos en restricción de dieta (Gredilla et al., 2002). A continuación determinamos si los cambios de metionina en la dieta tenían efectos sobre un proceso de modificación epigenética: la metilación del ADN, y encontramos que nuestra intervención disminuyó el grado de metilación global del ADN, lo que tiene sentido dado que la metionina es esencial para la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), un donador de grupos metilo, cuya cantidad podría verse modificada por la intervención, que podría ejercer sus efectos a través de cambios en la expresión génica regulados por este proceso. Por último, y tras analizar la composición lipídica de las membranas celulares y el posible papel de la Sirtuina 5, quedó de manifiesto que la

restricción de metionina no ejercía sus efectos a través de esta proteína, dado que no se observaron diferencias y tampoco lo hizo modulando de forma clara la composición lipídica, parámetro en el que se observaron diferencias tan sólo en ciertos ácidos grasos.

2. Restricción de metionina y envejecimiento: Efecto de la restricción de metionina en la dieta a corto plazo sobre el estrés oxidativo mitocondrial en hígado de ratas viejas

Con el fin de determinar si la restricción de metionina al 40% ejerce efectos beneficiosos cuando se inicia a edades avanzadas, de forma similar a lo descrito en ratas jóvenes, llevamos a cabo este estudio en ratas de edades avanzadas (24 meses), a las que se alimentó con dieta control o dieta restringida en metionina al 40% y en ratas jóvenes (6 meses) a las que se alimentó con dieta control durante 7 semanas.

En las ratas viejas sometidas a restricción de metionina al 40% se produjo una disminución de la producción y la fuga de radicales libres en el complejo I en mitocondrias hepáticas al comparar tanto con animales viejos control como con jóvenes control y se redujo el daño oxidativo al ADN mitocondrial en comparación con ratas viejas control. Estos resultados no reflejaron cambios con la edad y son similares a los descritos en restricción de metionina en ratas jóvenes (Sanz et al., 2006; Caro et al., 2008). Además, esta intervención fue capaz de revertir el incremento de los marcadores de modificación proteica que se produjo con la edad, de forma parcial y, en algunos casos, total. Nuestros resultados indican que la restricción de metionina al 40% es efectiva disminuyendo el estrés oxidativo mitocondrial incluso cuando se inicia a edades avanzadas. En este caso el grado de metilación global del ADN no se vio modificado por el tratamiento, lo que hace suponer que los efectos de esta intervención nutricional sobre este parámetro pueden ser dependientes del tejido o de la edad. Lo mismo sucedió con las proteínas implicadas en la biogénesis mitocondrial, que en el caso de la proteína PGC1 no se vio afectada y respecto al factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), sus niveles disminuyeron tras la intervención. Por último se analizó si la Sirtuina 1 estaba implicada en los efectos de la restricción de metionina, encontrándose que la intervención nutricional revirtió el incremento de sus niveles en las ratas viejas.

3. Modulación del estrés oxidativo mitocondrial mediante el bloqueo de la señalización

β -adrenérgica

Con el fin de profundizar en los mecanismos por los que el bloqueo de la señalización β -adrenérgica incrementa la longevidad en los ratones C57BL/6, nos planteamos interrumpir esta vía de señalización mediante el tratamiento farmacológico con el bloqueante β 1-adrenérgico: atenolol, disuelto en el agua de bebida y con un tratamiento de 2 semanas de duración.

En los ratones tratados con atenolol no se modificó la producción mitocondrial de ROS ni el daño oxidativo al ADN mitocondrial en el corazón. Por ello, estudiamos el otro parámetro que relaciona longevidad y estrés oxidativo: el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana. Encontramos que el tratamiento con atenolol disminuyó de forma muy intensa el número de dobles enlaces (DBI) y el índice de peroxidizabilidad (PI) de las membranas, lo que se debió principalmente a la disminución de los ácidos grasos altamente insaturados: 22:6n-3 y 20:4n-6 y al incremento de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados: 18:1n-9, 16:1n-7 y 16:0. Estos cambios dotan a la membrana de mayor resistencia a la peroxidación lipídica, lo que encaja con los menores niveles de los marcadores de oxidación y lipoxidación proteica observados en los ratones tratados con atenolol. En cambio, los marcadores de glicoxidación proteica vieron incrementados sus niveles tras el tratamiento farmacológico, lo que sugerimos pudo ser debido a un aumento de los intermediarios glicolíticos inducido por el tratamiento. Por último, con el fin de comprobar que la vía de señalización Raf/MEK/ERK se encontraba estimulada, se midió la cantidad de la proteína p-ERK, que se encontró incrementada en los ratones tratados con el fármaco al igual que había sido descrito previamente en los ratones AC5KO. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el incremento de longevidad observado en los ratones AC5KO podría estar relacionado con la menor insaturación de ácidos grasos de membrana y el consiguiente menor daño lipoxidativo a las proteínas celulares, lo que podría estar inducido por un incremento en la señalización mediada por la proteína ERK.

4. Efectos del tratamiento conjunto de la restricción de metionina en la dieta y el bloqueo β -adrenérgico sobre el estrés oxidativo mitocondrial

A la vista de los resultados obtenidos en el primer y tercer objetivo, queda de manifiesto como ambos tratamientos por separado son capaces de modificar los dos factores que relacionan el estrés oxidativo y el envejecimiento. Con el fin de estudiar si ambas manipulaciones experimentales, la restricción de metionina y el bloqueo de la señalización β -adrenérgica mediante el tratamiento con atenolol, son capaces de tener efectos aditivos o incluso sinérgicos respecto a la producción mitocondrial de ROS y la insaturación de ácidos grasos de membrana, se estudiaron estos parámetros en el corazón de rata tras 7 semanas de tratamiento.

A pesar de que en este caso el bloqueo β -adrenérgico inducido por el atenolol incrementó la producción mitocondrial de ROS, este aumento fue revertido cuando ambos tratamientos (restricción de metionina y atenolol) se llevaron a cabo de forma conjunta, al igual que sucedió con la fuga de radicales libres. Además, tanto la restricción de metionina como el tratamiento con atenolol disminuyeron el daño oxidativo al ADN mitocondrial y a las proteínas, así como el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, lo que pareció deberse al menos en parte, a la disminución de las actividades desaturasas y elongasas o a la β -oxidación peroxisómica, y estimularon la fosforilación de la proteína de señalización ERK. Ambos tratamientos implementados de forma conjunta mostraron efectos más marcados sobre la disminución de la insaturación de los ácidos grasos de membrana, la oxidación proteica y la estimulación de la fosforilación de la proteína ERK, que con ambos tratamientos por separado.

CONCLUSIONES

- ★ La restricción de metionina al 40% a corto plazo disminuye el estrés oxidativo en mitocondrias cardíacas, de forma similar a lo observado en la restricción de metionina al 80%, lo que refuerza la idea de que la metionina es el componente de la dieta responsable del descenso del estrés oxidativo observado en la RD al 40%.
- ★ Las ratas viejas (24 meses) mantienen la capacidad de disminuir el estrés oxidativo en mitocondrias hepáticas en respuesta a la restricción de metionina al 40% a corto plazo, al igual que ha sido descrito en ratas jóvenes.

- ★ La interrupción de la señalización β -adrenérgica tras 2 semanas de tratamiento con atenolol reduce de forma muy marcada el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana y los marcadores de oxidación y lipoxidación proteica e incrementa la cantidad de la proteína p-ERK en el corazón de ratón C57BL/6.
- ★ El tratamiento combinado de restricción de metionina en la dieta y atenolol en el agua de bebida disminuye el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, los marcadores de oxidación proteica e incrementa la cantidad de la proteína p-ERK de forma más acusada que cada uno de los tratamientos utilizados por separado.

BIBLIOGRAFÍA

CARO P, GOMEZ J, LÓPEZ-TORRES M, SÁNCHEZ I, NAUDÍ A, JOVE M, PAMPLONA R, BARJA G (2008) Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 9:183-196.

GREDILLA R, LÓPEZ-TORRES M, BARJA G (2002) Effect of time of restriction on the decrease in mitochondrial H₂O₂ production and oxidative DNA damage in the heart of food-restricted rats. *Microsc Res Tech.* 59: 273-277.

GREDILLA R, BARJA G (2005) Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146:3713-3717

HARMAN D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society* 20: 145-147

HULBERT AJ, PAMPLONA R, BUFFENSTEIN R, BUTTEMER WA (2007) Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological reviews* 87: 1175-1213.

LOPEZ-TORRES M, BARJA G (2008) Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction, possible implications for humans. *Biochimica et Biophysica acta* 1780: 1337-1347.

PAMPLONA R, BARJA G (2011) An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology* 12: 409-435.

SANZ A, CARO P, AYALA V, PORTERO-OTIN M, PAMPLONA R, BARJA G (2006) Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J.* 20: 1064-1073.

YAN L, VATNER DE, O'CONNOR JP, IVESSE A, GE H, CHEN W, HIROTANI S, ISHIKAWA Y, SADOSHIMA J, VATNER SF (2007) Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell* 130:247-258.

INTRODUCCIÓN

1. ENVEJECIMIENTO

Desde que la humanidad tomó conciencia de la existencia de la muerte, entender el proceso del envejecimiento, para combatirlo, se ha convertido en una de las cuestiones más interesantes para el ser humano: **¿Por qué envejecemos? ¿Qué desencadena este fenómeno?** Durante la historia, muchos han sido los intentos por responder a estas preguntas, algunos desde un punto de vista científico pero la mayoría rodeados de superstición y con el fin de perseguir la eterna juventud. Ejemplo de ello lo constituye la creencia de la existencia de una “fuente de la eterna juventud” cuya localización ha sido un estímulo constante para exploradores y conquistadores. Incluso Juan Ponce de León, en una expedición financiada por Fernando el Católico, trató de encontrarla llegando a la tierra que posteriormente sería conocida como Florida con numerosas fuentes pero sin efecto rejuvenecedor ninguno.

Aún durante las primeras décadas del siglo XX se realizaron curiosas terapias rejuvenecedoras que en la mayoría de los casos resultaban inciertas y peligrosas, como los trasplantes testiculares de monos a humanos llevados a cabo por el cirujano Voronoff, que extendieron la sífilis entre los receptores al estar infectados los monos utilizados en las últimas operaciones. Todo ello pone de manifiesto el enorme interés que ha despertado desde tiempos ancestrales el fenómeno del envejecimiento y el deseo del ser humano por devolver al organismo la juventud perdida.

En la actualidad el avance de la ciencia y la mejora de las condiciones de vida han incrementado notablemente la esperanza de vida, pero **no se ha conseguido ralentizar el proceso endógeno de envejecimiento y la longevidad máxima continúa invariable** (Figura 1). Debido a esto, nuestra sociedad actual debe hacer frente a un gran número de retos sanitarios y socioeconómicos derivados del aumento de individuos viejos y de la población afectada por enfermedades asociadas al envejecimiento.

Debido al aumento de la esperanza de vida, se ha extendido cierta creencia de que el envejecimiento ha sido ralentizado. Sin embargo, esto aún no se ha conseguido porque la longevidad máxima no se ha modificado. Como el término longevidad puede dar lugar a cierta confusión, es necesario explicar la diferencia entre dos conceptos: longevidad media y máxima. **La longevidad media se refiere a los años promedio que un individuo puede llegar a vivir por pertenecer a una población específica.** Es un

concepto similar al de esperanza de vida, que, no obstante, es calculado por los demógrafos con una fórmula complicada. **La longevidad máxima (MLSP, *maximum life span potential*) es la edad máxima alcanzable por los individuos pertenecientes a una especie concreta.** Una paloma puede llegar a vivir 35 años, mientras que un ratón normal, aun viviendo en las mejores condiciones posibles, no llegará a superar los cuatro años.

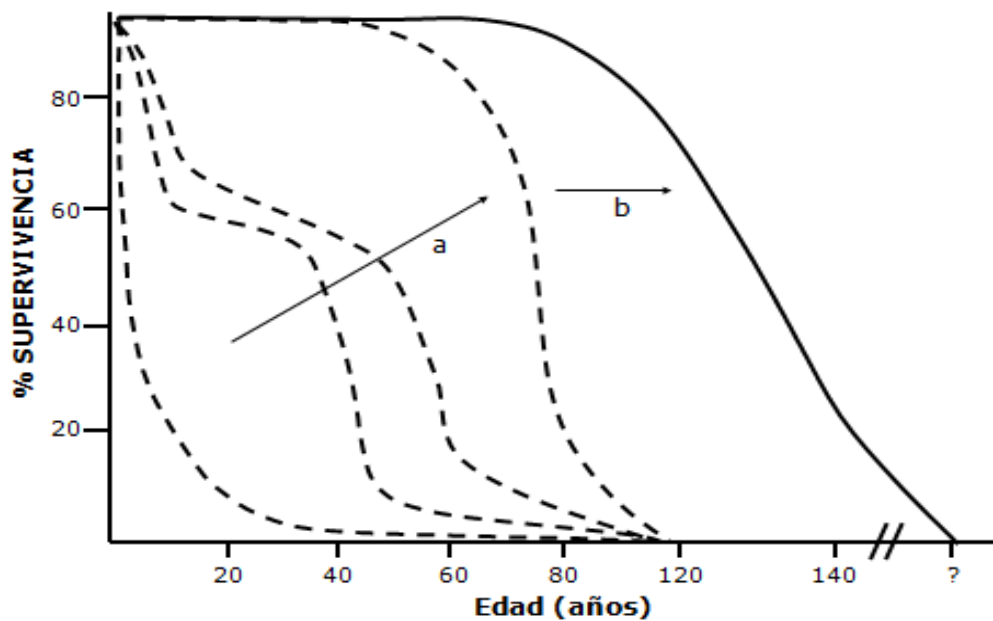


Figura 1. Curva de supervivencia de diferentes poblaciones humanas durante la historia (- - -) y en el futuro (—). El incremento de la longevidad media propiciado por el avance científico y la mejora de las condiciones de vida ha rectangularizado la curva de supervivencia (Flecha a). Sin embargo, la longevidad máxima no se ha modificado. En la actualidad, la ciencia persigue comprender los mecanismos que subyacen al envejecimiento para, actuando sobre ellos, lograr disminuir la tasa de envejecimiento e incrementar la longevidad máxima (Flecha b). Modificado de (Knight, 1995)

Mientras que la longevidad media viene determinada principalmente por el entorno de un individuo particular, la longevidad máxima lo está por la pertenencia a una especie u otra, es decir, se trata de un parámetro específico de especie y fijado por los genes. Un concepto que puede ayudar a aclarar la diferencia es el de tasa de envejecimiento, que puede definirse como la velocidad a la que se produce la acumulación de cambios deletéreos que provoca el envejecimiento. Dicha acumulación está determinada genéticamente y es diferente en las distintas especies animales. Se puede incrementar la longevidad media sin variar la tasa de

envejecimiento, que es lo que se ha producido durante los últimos siglos. Sin embargo, es necesario disminuir esta tasa para incrementar la longevidad máxima (de aquí en adelante, longevidad).

El reto que se plantea la ciencia en la actualidad es lograr entender los procesos responsables del envejecimiento para poder actuar sobre ellos con el fin de incrementar la longevidad máxima, y con ello prolongar los “años buenos”. Con la presente tesis doctoral pretendemos profundizar en los mecanismos que subyacen a las manipulaciones experimentales que incrementan la longevidad máxima en roedores de laboratorio para lograr entender qué procesos llevan al envejecimiento y poder actuar sobre ellos.

1.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS

El envejecimiento es un proceso que observamos a diario a nuestro alrededor. A pesar de que se trata de un concepto intuitivamente fácil de entender, no existe una definición universalmente aceptada. Denham Harman, el investigador que definió la Teoría de Envejecimiento por Radicales Libres que será explicada en el apartado 1.3, definió el envejecimiento como la **progresiva acumulación de cambios con el tiempo que reducen la capacidad del individuo para enfrentarse al estrés disminuyendo así sus posibilidades de supervivencia (Harman, 1986).**

Otra forma de caracterizar el envejecimiento fue propuesta por el gerontólogo americano Bernard Strehler (Strehler, 1962) que identificó sus principales características. Según Strehler el envejecimiento es:

- 1. Progresivo:** Las causas del envejecimiento están presentes en los individuos a lo largo de su vida, tanto en individuos jóvenes como de edad avanzada.
- 2. Endógeno:** Son factores internos los que, en su mayoría, determinan el proceso del envejecimiento. En condiciones óptimas y constantes, los animales continúan envejeciendo porque las causas que lo producen son internas. Los factores exógenos (por ejemplo, radiaciones UV y antioxidantes en la dieta) pueden incrementar o mitigar el daño a los tejidos que se origina en el interior, pero no son causas de envejecimiento debido a su origen externo.

3. Universal: Todos los individuos de una especie envejecen, al igual que todas las especies de mamíferos y aves en las que se ha estudiado este proceso.

4. Deletéreo: Como consecuencia de este proceso, el individuo acaba muriendo y, en este sentido, es perjudicial. Los cambios asociados al envejecimiento se observan de manera más clara en células postmitóticas, como neuronas o cardiomiocitos (Miquel et al., 1980) que en las que se dividen continuamente.

1.2. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

Existen numerosas teorías que tratan de explicar el envejecimiento. De hecho, casi cualquier descubrimiento en biología ha dado lugar a una nueva familia de teorías. Aunque la tarea de revisarlas es complicada, existen revisiones interesantes como la llevada a cabo por Mevdevév en 1990. Entre la amplia variedad de hipótesis que han sido propuestas cabe destacar la teoría del límite de duplicación celular (Hayflick, 1965), basada en la existencia de un número fijo de divisiones celulares y la teoría telomérica, propuesta por Olovnikov en 1971, que propone el acortamiento de los telómeros como causa del envejecimiento. Sin embargo, estas teorías no explicarían el envejecimiento en los tejidos postmitóticos, que muestran los cambios perjudiciales más pronunciados en individuos de edad avanzada. También han sido propuestas teorías que explican el envejecimiento como la acumulación con la edad de agregados de macromoléculas, entre ellas la teoría de entrecruzamientos (*crosslinking*) (Verzar, 1968) y la basada en la acumulación de desperdicio celular en forma de lipofucsina (Bourne, 1973), que aunque puede contribuir al fenómeno, no puede ser una de las razones que determine cuanto vive cada especie. Otro grupo de teorías están relacionadas con la acumulación de mutaciones con la edad, como la teoría de mutaciones somáticas (Szilard, 1959; Failla, 1958) y la teoría del error catastrófico (Orgel, 1963) según la cual los errores producidos durante la síntesis proteica generarían proteínas erróneas que, a su vez, producirían más errores en los procesos de transcripción y traducción, lo que conduciría a la degeneración de las funciones celulares y al final a la muerte.

Una explicación clásica del envejecimiento está relacionada con un parámetro fundamental de cada animal, su tasa metabólica. A principios del siglo XX, Max Rubner describió la relación entre el tamaño corporal, la tasa metabólica y la longevidad, mediante un parámetro, la capacidad metabólica total (LEP, *Life Energy Potential*) que indica el total de calorías por kilogramo de tejido del que dispone un individuo durante toda su vida (Rubner, 1908). Así, el envejecimiento se produciría al ir disminuyendo este potencial. Posteriormente, en 1928, el profesor Raymond Pearl describiría en su teoría de la “velocidad de vida” (*Rate of Living*), la relación entre la tasa metabólica y la longevidad (Pearl, 1928). Por ejemplo, la tasa metabólica de los elefantes es baja y pueden vivir hasta 70 años, mientras que en los ratones la tasa metabólica es alta y pueden alcanzar sólo 4 años de vida. En la actualidad, la idea de Pearl presenta una serie de excepciones, como las comparaciones entre aves y mamíferos y los primates o murciélagos dentro del grupo de los mamíferos que demuestran que una tasa metabólica elevada no se acompaña siempre de una longevidad reducida.

Finalmente, la teoría que actualmente goza de mayor apoyo por parte de la comunidad científica y se ve confirmada por numerosas evidencias procedentes tanto de la Biología Comparada como de la Biología Experimental es la **Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales libres** (Harman, 1972), que será detallada a continuación.

1.3. TEORÍA MITOCONDRIAL DE ENVEJECIMIENTO POR RADICALES LIBRES

Durante las últimas dos décadas, la teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres ha sido la teoría más aceptada por la comunidad científica, pudiendo explicar muchos aspectos de las diferentes teorías citadas anteriormente y encajando bien con las cuatro reglas básicas descritas por Bernard Strehler.

Sus orígenes se remontan a mediados del siglo XX, cuando Rebeca Gershman relacionó por primera vez la toxicidad del oxígeno con los radicales libres. A partir de este descubrimiento, Denham Harman propuso en un principio la Teoría de Envejecimiento por Radicales Libres (Harman, 1956) en la que propone que el envejecimiento se produce como resultado de la acumulación de daño provocado por los radicales libres producidos durante el metabolismo celular. Esta teoría pasó más o

menos desapercibida hasta que, quince años después, McCord y Fridovich descubrieron la enzima superóxido dismutasa (SOD) (McCord y Fridovich, 1969). La existencia de una enzima cuya función es detoxificar el daño oxidativo ponía de manifiesto que existía una producción de radicales libres y daño dentro de las células. Unos años después, el grupo de Britton Chance investigó en detalle la producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas (Boveris y Chance, 1973). Esto demostraba que durante la respiración mitocondrial normal, el oxígeno es incompletamente reducido y se produce la fuga de electrones de la cadena de transporte electrónico dando lugar a moléculas altamente reactivas e inestables llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*).

En 1972, Harman refinó su teoría y señaló a **la mitocondria como el principal lugar de generación de radicales libres y la principal diana de acción de estos** (Harman, 1972). Esta idea fue reforzada posteriormente por Miquel y colaboradores (1980) y pasó a denominarse Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres. Según esta teoría, las mitocondrias, bajo condiciones fisiológicas normales, producen radicales libres derivados del oxígeno que pueden dañar oxidativamente diferentes componentes celulares como lípidos, proteínas y, especialmente en el caso del envejecimiento, ADN mitocondrial, muy susceptible al daño dada su fragilidad y su situación muy cercana o incluso en contacto con los generadores de ROS.

En un primer momento se pensó que los antioxidantes controlaban la velocidad de envejecimiento. Sin embargo, tanto la suplementación con antioxidantes en la dieta como su sobreexpresión en animales transgénicos fracasó a la hora de incrementar la longevidad máxima, (revisado en Pérez-Campo et al., 1998; Sanz et al., 2006a; Muller et al., 2007; Pamplona y Constantini, 2011), lo que está de acuerdo con los trabajos de Biología Comparada que demuestran que **las especies longevas tienen menos antioxidantes endógenos que las especies de vida corta** (revisado en Pérez-Campo et al., 1998; Pamplona y Constantini, 2011).

El fracaso de los trabajos con antioxidantes provocó cierta controversia alrededor de la teoría. Sin embargo, la investigación desarrollada por los grupos de los profesores Gustavo Barja y Rahindar Sohal en los años 90 reafirmó la teoría con la publicación de diversos trabajos en los que demostraban que **la producción mitocondrial de peróxido**

de hidrógeno y de superóxido correlaciona negativamente con la longevidad máxima en mamíferos y comparando mamíferos y aves (Perez-Campo et al., 1989; Sohal et al., 1989; Ku et al., 1993; Barja et al., 1994a). Recientemente estos resultados han sido corroborados en el laboratorio del profesor Martin Brand en un espectro más amplio de especies (Lambert et al., 2007). Para descartar que la menor producción de ROS en los mamíferos longevos pudiera deberse a un menor consumo de oxígeno, se recurrió a la comparación entre aves y mamíferos. La paloma y la rata tienen un tamaño corporal similar, sin embargo, la paloma, con una tasa metabólica basal incluso algo mayor, disfruta de una longevidad nueve veces superior. Al estudiar ambas especies se observó que la paloma, aún con un mayor consumo de oxígeno, tenía menor producción de radicales libres, lo que ayudaría a explicar su alta longevidad (Ku y Sohal, 1993; Barja et al., 1994a,b; Herrero y Barja, 1997; Herrero y Barja, 1998; Barja y Herrero, 1998). Esta menor producción de radicales libres no sólo era menor por unidad de tiempo, sino que también lo era por unidad de flujo. Es decir, para el mismo oxígeno consumido, la proporción de radicales libres que escapaban de la cadena era menor en el caso de las aves. Esto dio lugar a que el profesor Barja acuñase el concepto de fuga de radicales libres (%FRL), como el porcentaje de electrones que escapan de la cadena de transporte reduciendo incompletamente el oxígeno y a descartar la tasa metabólica y reforzar el papel de los radicales libres como agentes responsables del envejecimiento.

En resumen, las especies longevas poseen mitocondrias que producen pocos radicales libres por unidad de tiempo lo que confirma la hipótesis inicial de Harman. Los estudios de restricción de dieta (RD), la manipulación experimental mejor conocida que incrementa la longevidad media y máxima, que serán abordados en el apartado 4.1., también apoyan la Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres dado que los animales sujetos a esta manipulación disminuyen su producción mitocondrial de ROS (Gredilla y Barja, 2005). Por lo tanto, **la Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres es la única teoría que, hasta la fecha, puede explicar cómo los vertebrados, especialmente aves y mamíferos, envejecen a velocidades tan diferentes y los animales sometidos a restricción dietética incrementan su longevidad.**

2. ESTRÉS OXIDATIVO

2.1. PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE RADICALES LIBRES

2.1.1. La mitocondria

Los generadores de radicales libres que se han descrito dentro de un organismo son varios. Entre ellos, los peroxisomas y los fagocitos del sistema inmune. Sin embargo, **la fuente más importante de radicales libres en el caso del envejecimiento es la mitocondria y dentro de ella, la cadena de transporte electrónico.** Esto se debería a que en la mitocondria existe un **daño constante que afecta a un componente vital: el ADN mitocondrial**, que además se sitúa muy cerca o incluso en contacto con los generadores de radicales libres (Barja, 2004a) lo cual puede dar lugar a la acumulación de mutaciones con la edad en el material genético.

Las mitocondrias son orgánulos presentes en la mayoría de las células eucariotas. En mamíferos se encuentran en todos los tipos celulares, a excepción de los eritrocitos y su número por célula varía, siendo más elevado en aquellas con mayores requerimientos energéticos aeróbicos. Estructuralmente, estos orgánulos están rodeados por una doble membrana compuesta por una membrana externa de origen eucariota y una membrana interna con características similares a las membranas bacterianas, como la ausencia de colesterol y la presencia de cardiolipina y organizada en pliegues llamados crestas mitocondriales, que le otorgan mayor superficie para las reacciones químicas que se producen en ella (Rich y Marechal, 2010). Esta doble membrana crea dos compartimentos mitocondriales: la matriz, rodeada por la membrana mitocondrial interna y el espacio intermembrana entre las dos bicapas lipídicas (Figura 2).

La membrana externa es permeable a iones, metabolitos y muchos polipéptidos, gracias a que contiene proteínas que forman poros, llamadas porinas, que permiten el paso selectivo de estas moléculas a su través. Por el contrario, la membrana interna carece de poros, por lo que es impermeable para la mayoría de las moléculas, especialmente las que tienen carga. Contiene muchos sistemas de transporte transmembrana que permiten el paso de distintas moléculas y numerosas proteínas, como las integrantes de la cadena de transporte electrónico. El hecho de que la membrana mitocondrial interna sea impermeable para la mayoría de las moléculas

permite mantener la diferencia de potencial generada por la cadena de transporte electrónico y necesaria para la mayoría de las funciones mitocondriales (Rich y Marechal, 2010).

Las mitocondrias son orgánulos que convierten, de forma oxidativa, el piruvato, los ácidos grasos y los aminoácidos en energía en forma de ATP, lo que se produce gracias a la transferencia de electrones y el bombeo de protones en un proceso llamado fosforilación oxidativa que se realiza en la cadena de transporte electrónico. Sin embargo, la mitocondria no es sólo el “generador” de energía de la célula, también participa en procesos metabólicos (regula el metabolismo de los aminoácidos), de señalización (homeostasis del hierro y señalización por calcio) y de apoptosis (Hock y Kralli, 2009).

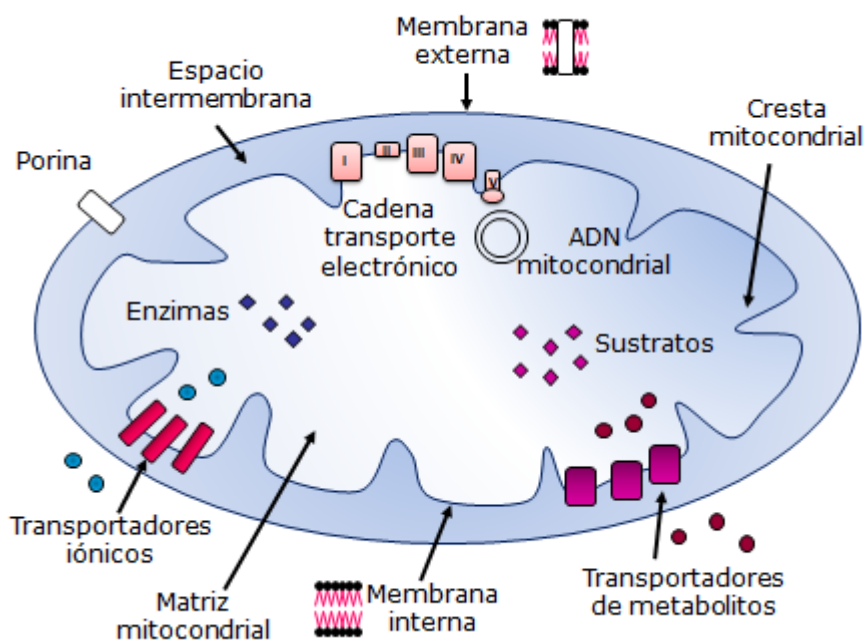


Figura 2. Morfología mitocondrial. Representación esquemática de los compartimentos mitocondriales: matriz (donde se encuentran las enzimas y sustratos para las diferentes reacciones que se producen y el ADN mitocondrial), membrana mitocondrial interna (con diferentes transportadores y los complejos que forman la cadena de transporte electrónico), membrana mitocondrial externa y espacio intermembrana.

La biogénesis mitocondrial es un proceso muy complejo que se ve influido por numerosos factores y cuyo control y regulación son críticos para el mantenimiento de la producción energética y la promoción del envejecimiento saludable (Lopez-Lluch et al., 2008; Hock y Kralli, 2009; Koopman et al., 2010). A nivel molecular son varios los factores de transcripción y cofactores implicados en la activación y regulación de la biogénesis mitocondrial (Goffart y Wiesner, 2003) pero todos parecen compartir un componente clave de la familia PGC-1 de coactivadores: PGC-1 α que actuaría como el regulador maestro del metabolismo energético y de la biogénesis mitocondrial (Lopez-Lluch et al., 2008) integrando y coordinado la actividad de múltiples factores de transcripción (Puigserver et al., 1998).

Las mitocondrias son los únicos orgánulos de las células animales que contienen su propio ADN, el ADN mitocondrial, lo que pone de manifiesto su origen bacteriano. Según la Teoría Endosimbiótica, recuperada a partir de una antigua hipótesis (Mereschkowsky, 1905), a finales de los años 1960 por la científica americana Lyn Margulis (Margulis, 1970), una célula procariota con capacidad de obtener energía de los nutrientes orgánicos empleando el oxígeno molecular, se fusionaría con otra célula primitiva (*Archea*) al ser "fagocitada" sin ser inmediatamente digerida. Esto daría lugar a una simbiosis permanente entre la célula hospedadora que ofrecería medio estable y rico en nutrientes y la célula procariota fagocitada que proporcionaría energía y que acabaría convirtiéndose en la mitocondria.

El ADN mitocondrial es una molécula de ADN circular de doble cadena que puede separarse en dos hebras (denominadas cadena pesada y ligera) y en mamíferos codifica 13 proteínas que forman parte de la cadena respiratoria, dos ARNs ribosómicos (12s, 16s) y 22 ARNs de transferencia necesarios para la traducción mitocondrial (Anderson et al., 1981). El ADN mitocondrial es muy vulnerable al daño producido por los radicales libres durante la respiración mitocondrial debido a su fragilidad por la falta de protección por histonas, así como por su localización muy cerca o incluso en contacto a los generadores de ROS en la cadena respiratoria.

2.1.2. Cadena de transporte electrónico

La maquinaria mitocondrial capaz de generar energía a partir de los combustibles celulares (piruvato, ácidos grasos y aminoácidos) se denomina cadena de transporte electrónico o cadena respiratoria. Es muy compleja (consta de 85 proteínas, codificadas tanto por el genoma mitocondrial como por el nuclear) y está compuesta por cuatro complejos enzimáticos multiproteicos (I, II, III y IV), dos transportadores electrónicos (Coenzima Q o ubiquinona y Citocromo c) y el complejo V (F_o - F_1 ATPasa o ATP sintasa) (Figura 3). La principal función de la cadena respiratoria es el transporte coordinado de electrones y protones que conduce a la producción de energía en forma de ATP (Papa et al., 2012).

Los combustibles celulares son transportados desde el citosol hasta la matriz mitocondrial, donde se usan como fuentes de carbono en el ciclo del ácido tricarboxílico (o ciclo de Krebs) o la β -oxidación de ácidos grasos. En estas rutas se forman los equivalentes metabólicos NADH y $FADH_2$ que ceden electrones respectivamente al complejo I y II de la cadena, que a su vez, los ceden a la Coenzima Q, que los transporta hasta el complejo III. Desde el Complejo III, los electrones pasan al Citocromo c, que los transporta hasta el complejo IV. En este complejo los electrones reaccionan con el oxígeno molecular y se produce agua (Figura 3) (Koopman et al., 2010). Las moléculas que se encargan del transporte de electrones, bien formando parte de los complejos o fuera de ellos, son citocromos, centros hierro-sulfurados, quinonas y flavinas. La transferencia electrónica genera energía que se utiliza para bombear protones desde la matriz al espacio intermembrana y así crear un gradiente de pH y electroquímico que produce una fuerza protón-motriz utilizada por el complejo V para sintetizar ATP a partir de ADP y de fosforo inorgánico (Nicholls, 2002). El ATP sintetizado es trasladado al citoplasma en intercambio con ADP por la ATP/ADP translocasa. Este proceso se denomina fosforilación oxidativa y cubre bajo condiciones normales, más del 80% del ATP necesario para la célula. El resto es producido por la degradación citosólica anaeróbica de nutrientes, principalmente a partir de la glucólisis.

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es uno de los principales sistemas de la célula donde se producen continuamente reacciones redox de un solo

electrón, lo que lo convierte en generador de ROS, debido a que el oxígeno molecular preferentemente acepta los electrones de uno en uno. **Concretamente, los complejos I y III de la cadena han sido descritos como dos productores principales de ROS de la cadena respiratoria.**

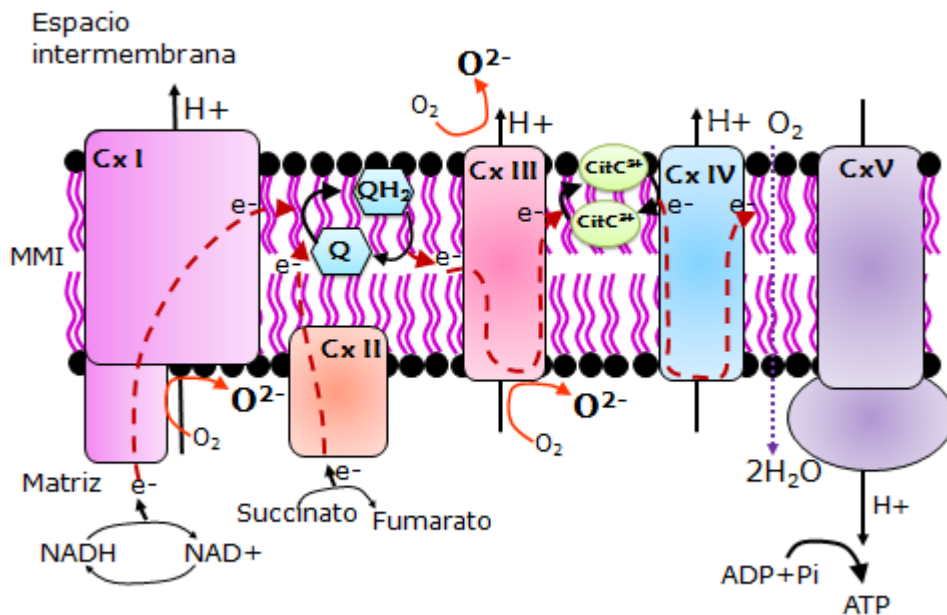


Figura 3. Esquema de la cadena de transporte electrónico. Está compuesta por cuatro complejos: I, II, III y IV (respectivamente, NADH deshidrogenasa, Succinato deshidrogenasa, Ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa y Citocromo c oxidasa), dos transportadores electrónicos: Coenzima Q que transporta electrones desde el complejo I y II al III y Citocromo c, que los transporta del complejo III al IV, donde los electrones se combinan con el oxígeno para formar agua. La energía liberada por el transporte de electrones se usa para conducir el flujo de protones y establecer el gradiente de pH que posibilita la generación de ATP por el complejo V (ATP sintasa). Los complejos I y III han sido descritos como generadores de ROS. MMI: Membrana mitocondrial interna; Cx: Complejo respiratorio; Q: Coenzima Q; QH₂: ubiquinol; CitC: Citocromo C.

★ Complejo I (NADH Deshidrogenasa):

Compuesto en mamíferos por más de 40 subunidades, de las que 7 están codificadas por el genoma mitocondrial, y con un tamaño de alrededor 1000 KDa, el complejo I es el componente más grande y complejo de la cadena respiratoria (Hirst et al., 2003; Yagi y Matsuno-Yagi, 2003, Carrol et al., 2006). Tiene una estructura en forma de L, cuyo brazo largo esta embebido en la membrana y contiene el dominio hidrofóbico, donde se encuentra la maquinaria de bombeo de protones. El brazo corto

está constituido por un dominio globular hidrofílico, en la matriz mitocondrial, que contiene la subunidad de unión al NADH y a la Coenzima Q y el centro activo de la enzima, constituido por una flavina (FMN) y 8 centros hierro-sulfurados (Figura 4) (Friedrich y Bottcher, 2004; Lenaz et al., 2006; Sazanov y Hinchliffe, 2006; Zickermann et al., 2008).

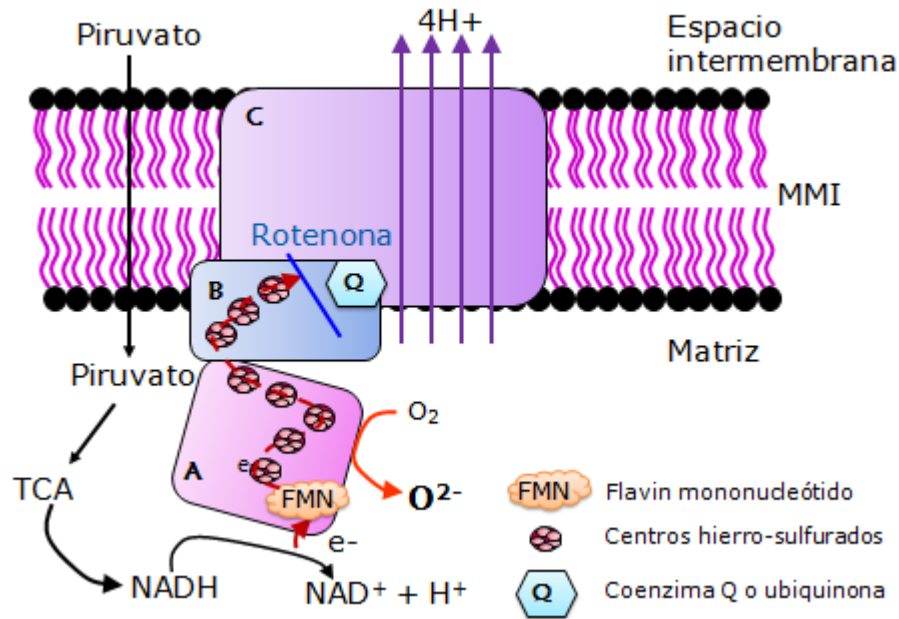


Figura 4. Esquema del complejo I. Está formado por 3 dominios: un dominio deshidrogenasa (A) donde el NADH es oxidado y contiene una flavina (FMN) y 5 centros hierro-sulfurados; un dominio hidrogenasa (B) donde la Coenzima Q (Q) es reducida, que contiene 3 centros hierro-sulfurados y un dominio transportador (C) implicado en el bombeo de protones (Lenaz, 2012). La formación de superóxido podría ocurrir tanto en la flavina (FMN) como en algunos centros hierro sulfurados o en la semiquinona y es liberado a la matriz mitocondrial. Modificado de Drose y Brandt, 2012.

La transferencia electrónica comienza a través de la flavina (FMN), que acepta dos electrones del NADH y los transfiere, uno a uno, a los centros hierro-sulfurados que reducen la Coenzima Q (Sazanov y Hinchliffe, 2006). La transferencia está acompañada por el bombeo de cuatro protones a través de la membrana, lo que supone alrededor del 40% del gradiente protónico generado en la cadena respiratoria mitocondrial (Yagi y Matsuno-Yagi, 2003). Existen varios inhibidores que pueden bloquear el flujo de electrones a través de los diferentes transportadores del complejo. De todos ellos cabe destacar la rotenona, que actúa bloqueando la transferencia electrónica desde los

centros hierro-sulfurados hasta la ubiquinona, posiblemente actuando como análogo de la misma (Fato et al., 2009).

El complejo I genera el anión superóxido hacia la matriz mitocondrial durante la transferencia electrónica directa (cuando los electrones son cedidos por el NADH) **y reversa** (cuando los electrones son transportados desde el complejo II al complejo I vía ubiquinona) lo que requiere un potencial de membrana alto (Votyakova y Reynolds, 2001; Fato et al., 2008; Murphy, 2009; Droese y Brandt, 2012). Puesto que la liberación del anión superóxido por el complejo I se produce preferentemente hacia la matriz mitocondrial, el riesgo de que sea deletéreo es muy alto, dado que puede infligir daño al ADN mitocondrial (Costa et al., 2011), a los lípidos de la membrana mitocondrial interna y a las proteínas mitocondriales (detallado en el apartado 2.2.). Por ello, entre otras razones, el **complejo I parece el determinante en el caso del envejecimiento**. De hecho, las especies longevas y los animales sometidos a restricción de dieta (la manipulación experimental mejor conocida que incrementa la longevidad), presentan menor generación mitocondrial de ROS en el complejo I (Gredilla y Barja, 2005; Pamplona y Barja, 2011) (detallado en el apartado 3.1). Además, a pesar de que se han llevado a cabo estudios con mutaciones que afectan a los distintos complejos de la cadena respiratoria, el único efecto positivo sobre la longevidad en animales ha sido demostrado tras la manipulación del complejo I y su sustitución por la enzima NDI1 (NADH deshidrogenasa interna 1) en *Drosophila melanogaster* (Sanz et al., 2010).

Varias moléculas han sido propuestas como reductores directos del oxígeno y responsables de la formación del anión superóxido, entre ellas la flavina (FMN), la semiquinona y uno de los centros hierro-sulfurados denominado N2, que es el más cercano al sitio de unión de la coenzima Q (Galkin y Brandt, 2005; Hirst et al., 2008; Lenaz y Genova, 2010). Mientras que cuando se aísla únicamente la enzima, el principal donador de electrones al oxígeno sería la flavina; en el caso del aislamiento de las membranas mitocondriales existen evidencias que apoyan que el oxígeno es reducido por el último centro hierro sulfurado de la cadena, denominado N2 (Esterhazy et al., 2008; Lenaz, 2012)

Además de ser un sitio principal de generación de ROS, el complejo I regula la función respiratoria mitocondrial (Yadava et al., 2008), está implicado en procesos de

apoptosis (Palmisano et al., 2007) y relacionado con el declive funcional durante el envejecimiento (Ventura et al., 2002; Papa et al., 2012).

★ **Coenzima Q:**

Es una quinona con una larga cadena lateral isoprenoide. Dada su solubilidad en lípidos, se encuentra en la membrana mitocondrial interna y difunde lateralmente. Existen tres isoformas diferentes de esta quinona: ubiquinona o coenzima Q, semiquinona o coenzima $Q^{\cdot-}$ y ubiquinol o coenzima QH_2 . En la membrana mitocondrial interna se presenta constituyendo una mezcla de ubiquinona-ubiquinol que actúa como lanzadera de electrones desde los complejos I y II al complejo III. La semiquinona es uno de los componentes de la cadena de transporte electrónica más propensos a ceder su electrón desapareado al oxígeno generando así radicales superóxido y está presente de forma transitoria formando parte de los complejos I y III (Mitchell, 1975; Brandt, 1997).

★ **Complejo II (Succinato Deshidrogenasa):**

Difiere del resto de complejos de la cadena en varios aspectos: primero, todas sus subunidades están codificadas por el genoma nuclear y además es un componente enzimático del ciclo de Krebs, que cataliza la oxidación del succinato a fumarato, lo que produce la reducción de la coenzima Q sin bombeo de protones. Este complejo está compuesto por cuatro subunidades, de las que dos se encargan del anclaje a la membrana y las otras dos forman el dominio soluble que es la enzima succinato deshidrogenasa (Rich y Maréchal, 2010; Lenaz, 2012). La enzima contiene covalentemente unido un centro hierro-sulfurado y una molécula de flavina (FAD), ambos localizados en la matriz. La transferencia de electrones se inicia con su captación por parte de la molécula FAD (que está integrada en el complejo) dando lugar a la formación de la molécula $FADH_2$ que cede los electrones a la ubiquinona (Cecchini, 2003). Entre sus inhibidores, la tenoiltrifluoroacetona (TTFA) bloquea la transferencia de electrones posiblemente mediante interacciones débiles con el hierro del último componente del complejo, un centro hierro-sulfurado (Tyler, 1992).

★ Complejo III (Ubiquinol- Citocromo c reductasa):

En mamíferos está compuesto por 11 subunidades, de las que el centro hierro-sulfurado denominado centro Rieske y los citocromos b y c conforman el núcleo mínimo de funcionamiento del complejo. Todos sus elementos están codificados por el ADN nuclear excepto el citocromo b, que lo está por el mitocondrial (Zara et al., 2009). El complejo III cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol (CoQH_2) al citocromo C en la superficie externa de la membrana, mediante un peculiar mecanismo de transferencia electrónica llamada ciclo Q (Figura 5), en el que coexisten distintas formas de la ubiquinona y se produce el bombeo de protones (Mitchell, 1975; Crofts, 2004).

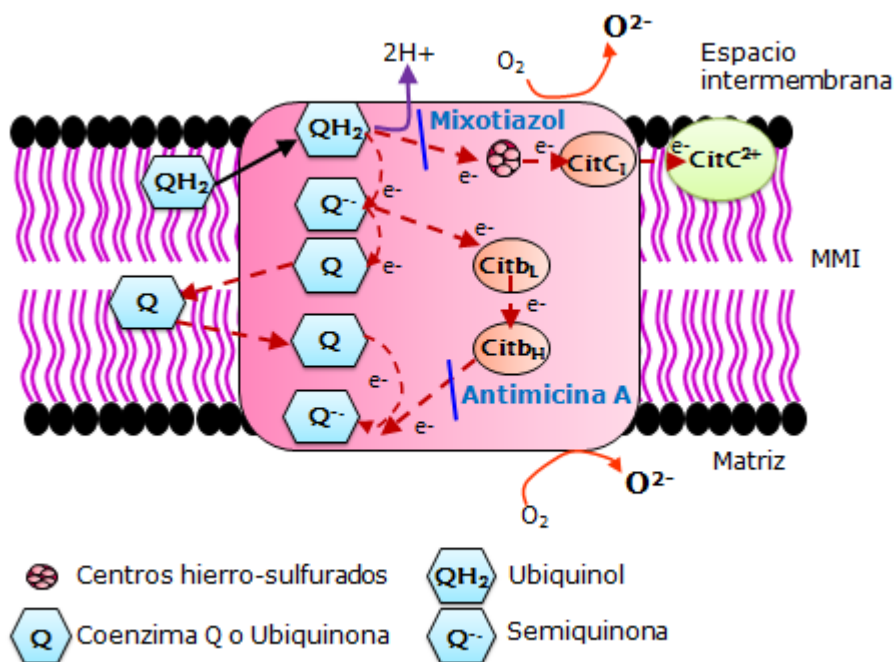


Figura 5. Ciclo Q en el Complejo III. El ubiquinol (QH_2) cede dos electrones, uno al centro hierro-sulfurado Rieske que lo transporta al Citocromo c1 y éste al Citocromo c presente en la membrana. El segundo electrón es cedido al citocromo b_L (también denominado citocromo b-566), liberando los protones al espacio intermembrana durante el proceso y formándose el anión semiquinona, inestable, que es inmediatamente oxidado a ubiquinona (Q) por el citocromo b_H (o b-560). Tras ello, la ubiquinona es reoxidada a semiquinona. El ciclo se completa con la oxidación de una segunda molécula de QH_2 . Dos de los inhibidores mejor caracterizados son la Antimicina A y el Mixotiazol (en azul). Modificado de Lenaz, 2012

Se ha demostrado que el anión superóxido se forma en el centro de oxidación del ubiquinol al complejo formado por el citocromo b- citocromo c1 (Cadenas et al., 1977; Boveris et al., 1976). Sobre su direccionalidad en la producción de radicales libres, **algunos estudios indican que el complejo III dirige toda la producción al espacio intermembrana** (St-Pierre et al., 2002; Kudin et al., 2004) **mientras que otros trabajos sugieren que aproximadamente la mitad de los radicales se generan hacia el espacio intermembrana y la otra mitad hacia la matriz mitocondrial** (Muller et al., 2004). Por ello, entre otras razones, y a pesar de que el complejo III es un importante generador de radicales libres, **su importancia fisiológica en la producción de ROS es limitada** y el complejo I se convierte en el productor de radicales libres fundamental en el proceso de envejecimiento (Hirst et al., 2008). Entre los inhibidores que pueden bloquear el transporte electrónico en el complejo III se encuentran el mixotiazol (MYXO) que interrumpe el flujo desde el ubiquinol hasta el centro Rieske y la antimicina A (AA) que impide el flujo desde el citocromo b_H ó b-560 hasta la coenzima Q (Turrens et al., 1985).

★ Complejo IV (Citocromo c oxidasa):

En él se produce la reducción tetravalente del oxígeno molecular a agua, lo que requiere la transferencia de cuatro electrones y cuatro protones. La enzima que lo forma, Citocromo c oxidasa, presenta gran afinidad por el oxígeno, por lo que es capaz de funcionar en condiciones de baja presión parcial de oxígeno (pO₂) y es la responsable de más del 90% de su consumo en los animales aerobios. Las unidades catalíticas están codificadas por el ADN mitocondrial, mientras que las estructurales lo están por el nuclear (Tyler, 1992). En mamíferos, la enzima está presente como un dímero, con un peso molecular de 200kDa y formada por 3 subunidades conservadas (I, II y III) codificadas por el genoma mitocondrial y diez subunidades adicionales codificadas por genes nucleares. Contiene 4 centros redox que participan en la transferencia electrónica, dos centros cúpricos (Cu_A y Cu_B) y dos grupos hemo (a y a₃). El centro cúprico Cu_A es el punto de entrada de los electrones y los transfiere al grupo hemo a, que a su vez los cede al centro binuclear hemo a₃/Cu_B que será el encargado de donarlos al oxígeno molecular (Rich y Maréchal, 2010; Papa et al., 2012).

★ Complejo V (F₁F₀ ATP sintasa):

Este complejo utiliza el gradiente de protones transmembrana generado por la transferencia electrónica para sintetizar ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico. Está formado por dos dominios, una porción grande, globular, soluble y catalítica (sector F₁) que contiene 5 subunidades y se sitúa en la matriz mitocondrial y una porción embebida en la membrana (sector F₀, con un número variable de subunidades diferentes dependiendo de la especie) a través de la cual se produce la translocación protónica. En conjunto, el complejo está compuesto por 16 subunidades, de las que solamente 2 están codificadas por el ADN mitocondrial. Se ha demostrado que este complejo se asociaría con los transportadores de fosforo inorgánico para dar lugar a un supercomplejo denominado ATP sintasoma en rata (Papa et al., 2012)

El aislamiento de “supercomplejos” formados por las unidades: complejo I-complejo III (Hatefi et al., 1962) y por complejo II-complejo III (Yu et al., 1974) puso de manifiesto que los complejos respiratorios no se distribuían de manera aleatoria en la membrana mitocondrial, sino que éstos junto con los transportadores electrónicos estarían organizados en “ensamblajes” mediante interacciones específicas proteína-proteína, efectivas para la transferencia rápida de electrones (Chance y Williams, 1956). Recientemente, las posiciones y orientaciones de los complejos fueron determinados detalladamente en un supercomplejo bovino formado por el Complejo I, complejo III dimérico y Complejo IV (I₁III₂IV₁); El complejo III y IV se asociarían a la parte situada en la membrana del Complejo I y estarían en contacto el uno con el otro (Schafer et al., 2007; revisado en Lenaz y Genova, 2012). También ha sido propuesto que los complejos de la cadena respiratoria podrían ensamblarse en mayores niveles de organización, formando megacomplejos compuestos por los supercomplejos como bloques constructores, que podrían ser importantes para la morfología de la membrana mitocondrial interna (Bultema et al., 2009).

2.1.3. Radicales libres

Un radical libre es un átomo, molécula o compuesto con uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Esto les hace ser altamente reactivos y atacar sitios de alta densidad o inestabilidad electrónica, como por ejemplo los dobles

enlaces de los ácidos grasos insaturados y los átomos de nitrógeno de ADN, ARN y proteínas, modificando su estructura y sus funciones celulares.

Los radicales libres se denominan con frecuencia especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), se forman por la reducción parcial del oxígeno (Figura 6) y engloban radicales libres como el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el hidroxilo (OH^{\bullet}) o el perhidroxilo (HO_2^{\bullet}) y otras especies reactivas que no son propiamente radicales libres, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), pero que son muy propensas a reaccionar con radicales y reducir iones metálicos.

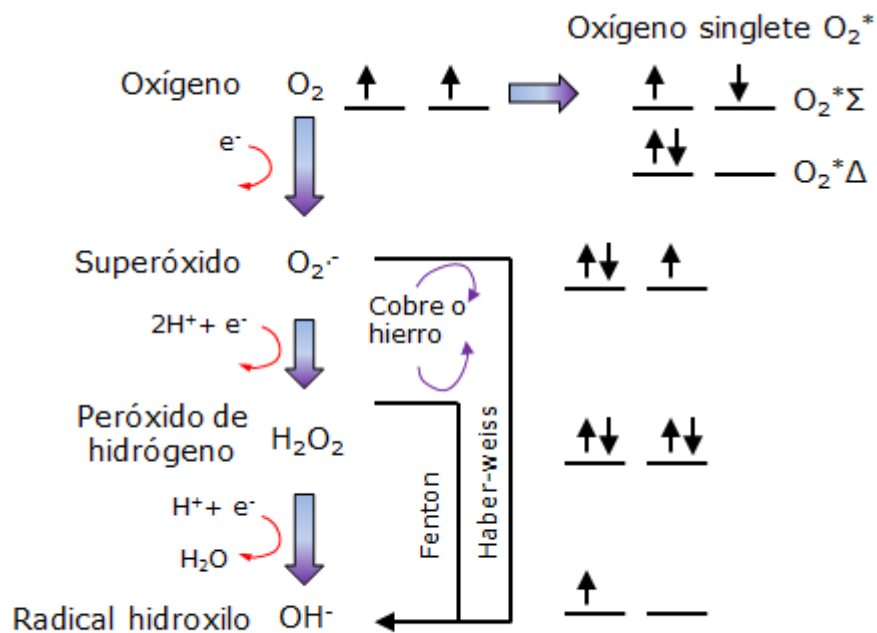


Figura 6. Formación de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) mediante la vía univalente de reducción del oxígeno. El oxígeno en estado basal presenta dos electrones desapareados con espines paralelos en su orbital más externo, lo que hace que acepte los electrones preferentemente de uno en uno (vía univalente). De este modo, el radical superóxido se genera cuando el oxígeno recibe un electrón, el peróxido de hidrógeno cuando recibe dos y el radical hidroxilo cuando recibe tres electrones. Además, el oxígeno molecular puede sufrir una redistribución de los electrones situados en sus orbitales más externos, alcanzando un nuevo estado más reactivo conocido como oxígeno en estado singlete que puede existir en dos formas (Σ y Δ) (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Los ROS se generan en las células a partir de fuentes exógenas (como la radiación UV y las toxinas ambientales) y de manera natural durante procesos metabólicos mediante la vía univalente de reducción de oxígeno (Boveris y Chance, 1973). Aunque

dentro de un organismo existen numerosos lugares productores de ROS, entre los sitios más importantes se encuentran el metabolismo peroxisomal de los ácidos grasos, las reacciones del citocromo P-450, las células fagocíticas y, especialmente importante en el caso del envejecimiento, la cadena respiratoria mitocondrial. Dado que la transferencia de electrones en la cadena respiratoria se produce de uno en uno, existen fugas en la cadena que darán lugar a la formación de tres tipos diferentes de ROS:

- ★ **Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$):** Se forma cuando el oxígeno recibe un electrón. Esta reacción está catalizada por varias enzimas como la xantina oxidasa, las peroxidasas y los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Aunque es poco reactivo puede atacar los centros hierro-sulfurados presentes en los complejos I y II (Raha y Robinson, 2000) y liberar hierro que, en presencia de peróxido de hidrógeno, producirá el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) mediante la reacción de Haber-Weiss (Figura 6). Además, la protonación del radical superóxido genera el radical perhidroxilo (HO_2^{\bullet}), que puede difundir a través de la membrana y es lo suficientemente reactivo como para iniciar procesos de peroxidación lipídica (Aikens y Dix, 1991; de Grey, 2002).
- ★ **Peróxido de hidrógeno (H_2O_2):** Se produce cuando el oxígeno, por adición de dos electrones, se reduce de forma incompleta en una reacción catalizada por enzimas oxidadas. Es una molécula relativamente estable (no es un radical libre puesto que carece de electrones desapareados) lo que le permite una mayor distancia de difusión. Puede oxidar grupos tiólicos esenciales e inactivar enzimas de forma directa. Además, en presencia de los metales de transición puede generar radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton.
- ★ **Radical hidroxilo (OH^{\bullet}):** Se genera mediante las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, lo que pone de manifiesto la importancia del hierro y del cobre como moduladores del daño oxidativo. El radical hidroxilo es altamente reactivo y puede reaccionar de forma inespecífica con cualquier molécula de manera inmediata, por ello no es capaz de difundir lejos de su punto de generación. Sin embargo, el radical superóxido y especialmente el peróxido de hidrógeno por

su gran estabilidad, son capaces de difundir lejos de su lugar de formación y generar el radical hidroxilo en cualquier localización celular mediante las reacciones ya comentadas, pudiendo atacar a casi cualquier molécula celular.

Como existen otras especies reactivas además de las derivadas del oxígeno, el término RS (*Reactive Species*) se ha generalizado incluyendo las especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS), entre las que destaca el óxido nítrico (NO^\bullet), un radical no muy reactivo y bien conocido por sus funciones como molécula de señalización (Rubio y Morales-Segura, 2004), a partir del cual se forman otras especies como el anión peroxinitrito (ONOO^-), anión nitroxilo (NO^-) y el dióxido de nitrógeno (NO_2).

2.1.4. Modulación de la producción de ROS en la cadena respiratoria

La generación de radicales libres en la mitocondria se produce cuando alguno de los transportadores de la cadena respiratoria cede algún electrón al oxígeno molecular, lo que **depende de la accesibilidad del oxígeno molecular y de la tendencia del transportador a donarlos que viene determinada por el potencial redox** (Speakman, 2003). Los valores positivos en el potencial redox indican una tendencia oxidante, mientras que los valores negativos indican una tendencia reductora (Muller, 2000). Así, a menor valor del potencial redox, mayor será la tendencia de la molécula a ceder electrones. Por lo tanto para que se produzca la generación del radical superóxido a partir del oxígeno molecular es necesario que el donante de electrones tenga un potencial redox menor que la pareja O_2/O_2^- , que se sitúa en torno a $-0,14$ V. Los complejos II y IV, con mayores valores del potencial redox, quedan descartados como generadores de superóxido, lo que además ha sido confirmado en diferentes estudios con mitocondrias funcionales (Barja y Herrero, 1998; Chance et al., 1979).

Teniendo en cuenta los potenciales redox así como diversos estudios donde se ha investigado la generación de ROS en mitocondrias aisladas, se ha sugerido que son el complejo I (Herrero y Barja, 1997; Barja, 1999; Herrero y Barja, 2000; Kudin et al., 2005; Muller et al., 2008) y el complejo III (Boveris et al., 1976; Barja, 1999; Muller et al., 2008) los principales productores de radicales libres en la mitocondria. Aunque el complejo III es un importante generador de radicales libres, como ya se ha comentado anteriormente, el **productor de radicales libres fundamental en el proceso de**

envejecimiento es el complejo I, entre otras razones, porque toda su producción de ROS se dirige a la matriz mitocondrial, donde puede dañar moléculas importantes como el ADN mitocondrial.

La producción mitocondrial de ROS depende del **grado de reducción electrónica de los generadores de ROS** (complejos I y III) y **de la presión parcial del oxígeno (pO_2)** local (Barja, 2007). El grado de reducción electrónica determina la capacidad de los complejos de donar electrones al oxígeno, de tal forma que a mayor grado de reducción electrónica, mayor producción de ROS. Cuando la tasa de flujo electrónico es baja, los electrones se acumulan en la cadena respiratoria y los complejos tienden a reducirse más, incrementando su capacidad de producción de ROS (Kushnareva et al., 2002). Por lo tanto, la generación mitocondrial de ROS será alta durante el estado 4 (con disponibilidad de sustrato respiratorio pero no con ADP, descrita como “*respiración controlada o en reposo*”) en el que la tasa de consumo de oxígeno es baja. Sin embargo, en el estado 3 (con abundante sustrato respiratorio y disponibilidad de ADP, definida como “*respiración activa*”) la tasa de flujo electrónico se incrementa, los electrones fluyen rápidamente a lo largo de la cadena, el grado de reducción electrónica desciende y por lo tanto, disminuye la producción de ROS (Loschen et al., 1971).

El incremento de la respiración mitocondrial disminuye la producción de ROS no sólo a través de la disminución del grado de reducción, sino también mediante el descenso en la pO_2 local debido al mayor consumo de oxígeno mitocondrial. Aunque la constante de afinidad (K_m) del complejo IV para el oxígeno es muy baja (alta afinidad) para asegurar la fosforilación oxidativa, la K_m para el oxígeno de los generadores de ROS es mucho mayor (baja afinidad), lo que significa que a una pO_2 baja, los generadores de ROS ven limitada su capacidad para reducir el oxígeno. Por lo tanto, la generación mitocondrial de ROS a pO_2 fisiológica será dependiente de la pO_2 (Barja, 2007; Hoffman et al., 2007).

Además, existen mecanismos fisiológicos capaces de modular la producción mitocondrial de ROS (Barja, 2007; Pamplona y Barja, 2011). Entre ellos cabe destacar:

- ★ **La cantidad de los complejos respiratorios mitocondriales:** Un mecanismo “sencillo” que disminuye la producción mitocondrial de ROS es la disminución

de la cantidad de los complejos respiratorios (Turrens, 2003; Lambert et al., 2010).

- ★ **Modificaciones post-traduccionales de los complejos respiratorios:** La regulación de la producción mitocondrial de ROS podría hacerse mediante una combinación de tres mecanismos: fosforilación, glutathionilización y nitración. La regulación por fosforilación se produciría por algún tipo de señal hormonal y de forma más específica mientras que el mecanismo de glutathionilización podría estar implicado en caso de que existiera un mecanismo sensible a variaciones en la composición de la dieta de los aminoácidos sulfurados. El incremento de la producción de ROS tras la glutathionilización y fosforilación de subunidades del complejo I han sido descritas (Raha et al., 2002; Taylor et al., 2003) mientras que hasta el momento la nitración se ha relacionado más con situaciones patológicas que con una regulación funcional del complejo en condiciones normales (Murray et al., 2003) .
- ★ **La acción de las proteínas desacoplantes:** El anión superóxido generado en las mitocondrias es muy sensible a la fuerza protón motriz, de manera que puede reducirse significativamente su producción mediante el desacoplamiento débil de la fosforilación oxidativa. Se ha sugerido que las proteínas desacoplantes (UCP1, UCP2 y UCP3) podrían funcionar como atenuadoras de la producción mitocondrial de ROS (Brand et al., 2004; Azzu et al., 2010)
- ★ **La regulación del grado de reducción electrónica de los generadores de ROS,** comentado anteriormente (Herrero y Barja, 1997; Barja y Herrero, 1998; Kushnareva et al., 2002; Barja, 2007).

2.2. DAÑO OXIDATIVO

La importancia de los radicales libres, en relación al envejecimiento, radica en la capacidad que tienen de modificar las distintas moléculas celulares: carbohidratos, lípidos, proteínas y ADN y alterar su función en la célula. A pesar de la existencia de muchos tipos de antioxidantes celulares, siempre existe un cierto nivel de daño oxidativo a las macromoléculas, cuyo grado viene determinado por la intensidad y

direccionalidad en la producción de radicales libres, la susceptibilidad de las moléculas a ser modificadas oxidativamente y por su capacidad de ser reparadas.

2.2.1. Daño oxidativo al ADN

Es el daño más importante para el envejecimiento porque el ADN es irremplazable. Mientras que el resto de moléculas biológicas pueden sustituirse gracias a la información codificada en el genoma, si todas las copias de un gen resultan dañadas, la información codificada en él se pierde definitivamente para la célula, siendo especialmente deletéreo en tejidos postmitóticos (Marnett y Plastaras, 2001).

El radical hidroxilo puede reaccionar con las bases nitrogenadas tanto púricas como pirimidínicas y con el esqueleto de desoxirribosa (Dizdaroglu et al., 2002; Cooke et al., 2003) y generar bases modificadas, roturas simples y dobles de cadena, mutaciones puntuales, puentes cruzados, deleciones y translocaciones entre otras alteraciones (Cooke et al., 2003; Cline, 2012; Lenaz, 2012). Las bases modificadas más habituales son la 8-hidroxi guanina, 8-oxoadenina, 2-hidroxiadenina, 5-hidroxi metiluracilo, 5-hidroxicitosina, citosina glicol y timidina glicol (Loft y Poulsen, 1996; Cadet et al., 2012). Entre ellas, la base modificada más estudiada es la 8-hidroxi guanina que se forma por la oxidación de la guanina en el carbono 8 (Figura 7). Su nucleósido, la **8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG)** es el **biomarcador más utilizado para cuantificar el daño oxidativo al ADN** (Dizdaroglu, 1992). De las cuatro bases nitrogenadas, la guanina tiene el potencial de reducción más bajo (1,29V) por lo que es el mejor donador de electrones y más susceptible a la oxidación (Dizdaroglu y Jaruga, 2012). Su base modificada, la 8-oxodG es una base altamente mutagénica, que inhibe la metilación y tiene el potencial de aparearse con adenosina en lugar de citosina durante la replicación del ADN, dando lugar a transversiones G:C→A:T, el tipo más frecuente de mutación espontánea (Moriya, 1993). Las lesiones oxidativas en el ADN han sido asociadas con numerosas patologías: una amplia variedad de cánceres, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y enfermedades cardiovasculares (Delaney et al., 2012; Malik y Herbert, 2012).

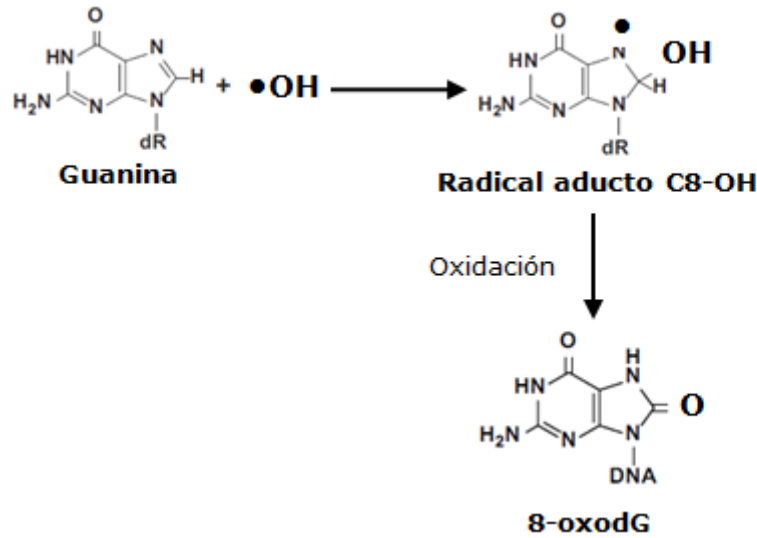


Figura 7. Formación de la base modificada 8-hidroxi guanina, que da lugar al nucleósido 8-oxodG, el biomarcador más utilizado para cuantificar el daño al ADN. La modificación de la guanina se produce mediante la oxidación en el carbono 8 por el radical hidroxilo. Dizdaroglu y Jaruga, 2012. dR=2' - desoxirribosa.

A pesar de que el ADN mitocondrial tan solo comprende cerca del 1% del ADN total en la célula, el daño oxidativo que se produce en él es el nexo de unión más probable entre la producción de radicales libres y el envejecimiento (Barja y Herrero, 2000; Hamilton et al., 2001). Aunque tanto el ADN nuclear como el mitocondrial son susceptibles de sufrir los efectos del daño oxidativo, diversos estudios han demostrado que **la oxidación que sufre el ADN mitocondrial es mayor que la del nuclear** (la frecuencia de mutaciones puntuales es 10 veces mayor en el ADN mitocondrial) tanto *in vitro* (Yakes y Van Houten, 1997; Suter y Richter, 1999) como *in vivo* (Ames et al., 1995; Richter et al., 1998; Barja y Herrero, 2000) lo que se explica por diversas razones:

- ★ **El ADN mitocondrial está localizado muy cerca o incluso en contacto con la principal fuente de ROS, el complejo I** (Albring et al., 1977; Barja, 1993; Stuart et al., 2005)
- ★ **La membrana mitocondrial interna es muy rica en ácidos grasos insaturados,** que al oxidarse producen compuestos que aumentan el daño (Pamplona et al., 2004).
- ★ **La ausencia de histonas,** que contribuyen a reducir el daño **y de intrones** que hace que cualquier alteración afecte a la región de control o codificadora.

Dado que el ADN mitocondrial se sitúa muy cerca o incluso en contacto con el complejo I, el riesgo de que la producción de radicales libres que genera este complejo sea perjudicial es muy alto (Costa et al., 2011). Aunque el anión superóxido generado por el complejo I es rápidamente transformado a peróxido de hidrógeno y en general ninguna de estas dos especies reactivas puede atacar directamente el ADN, la presencia de metales de transición hace que se favorezca la formación del radical hidroxilo. Este radical es extremadamente reactivo y puede promover tanto mutaciones puntuales como deleciones en el ADN mitocondrial mediante roturas de doble cadena (Figura 8).

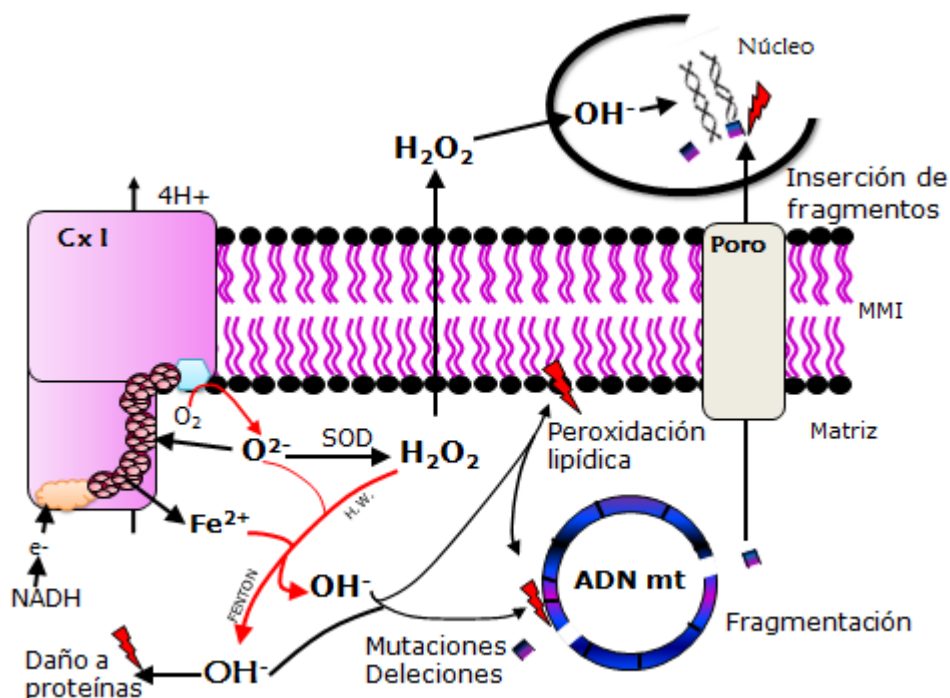


Figura 8. Efecto de la producción de ROS y daño oxidativo a las moléculas biológicas. El complejo I genera el anión superóxido, que es rápidamente convertido a H_2O_2 . A pesar de que esta reacción es rápida, el anión superóxido puede atacar los centros hierro-sulfurados del Complejo I y liberar hierro que favorece la formación del radical hidroxilo. Este radical es extremadamente reactivo y puede dañar el ADN mitocondrial generando roturas de la cadena con la consiguiente liberación de fragmentos. Además, el anión superóxido puede inducir la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial facilitando el “escape” de estos fragmentos y su inserción en el genoma nuclear (Halestrap y Pasdois, 2009). Por otro lado, el radical hidroxilo puede inducir agregación proteica (Tabner et al., 2006) e iniciar procesos de peroxidación lipídica (Almeida et al., 2006). H.W.= Reacción de Haber-Weiss; Cx I= Complejo I; MMI= Membrana mitocondrial interna. Modificado de Scialo et al., 2012.

Así, la producción mitocondrial de ROS contribuiría a la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial con el tiempo que podría llevar a la deficiencia bioenergética y al envejecimiento (Miquel et al., 1980; Crott et al., 2005). Según esta hipótesis, la mitocondria sería la fuente del problema y la diana. Sin embargo, existen una serie de hechos que hacen discutible esta hipótesis: Primero, hay muchas copias de ADN mitocondrial por célula, lo que hace que sólo si existe una gran mayoría de estas copias mutadas, puedan comprometerse las funciones bioenergéticas. Además, se ha demostrado que en tejidos vitales la proporción de células con ADN mitocondrial mutado en homoplasmia es muy bajo, del rango de 0,5 al 2% (Falkenberg et al., 2007), concentrándose esta fracción de células con ADN mitocondrial mutado en la región del cerebro denominada *substantia nigra* (Bender et al., 2006; Kraytsberg et al., 2006).

No obstante, el problema de la conexión de las mutaciones del ADN mitocondrial con el envejecimiento podría solucionarse con un cambio de perspectiva. **Los radicales libres de origen mitocondrial** pueden modificar oxidativamente las bases pero también **pueden “cortar” el ADN mitocondrial mediante roturas simples y dobles de las cadenas y generar fragmentos** (Figura 8). Según fue propuesto hace más de dos décadas (Richter, 1988), estos **fragmentos de ADN mitocondrial podrían escapar de la mitocondria y llegar a integrarse en el genoma nuclear, cuya alteración podría tener una influencia mayor en el envejecimiento**. La acumulación de estos fragmentos con el tiempo podría cambiar la información contenida en el genoma nuclear y contribuir a causar envejecimiento y cáncer (Suter y Richter, 1999).

Este proceso de transferencia de secuencias de ADN mitocondrial al núcleo se ha producido durante la evolución de los organismos eucariotas (Blanchard y Lynch, 2000) y se han encontrado fragmentos de ADN mitocondrial en el genoma nuclear de diversas especies como *Arabidopsis thaliana*, maíz, arroz, levadura, algunas especies de insectos o, incluso en humanos (Gellissen et al., 1983; Shay y Werbin, 1992; Juretic, 1995; Martin, 2003; Lough et al., 2008). De hecho existen estudios llevados a cabo en hígado de rata que confirman que los fragmentos de ADN mitocondrial se encuentran altamente oxidados (Suter y Richter, 1999) y se ha demostrado que la liberación de estos fragmentos se produce tras la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial

en mitocondrias de hígado de ratón (Patrushev et al., 2004). Además, estudios recientes han encontrado un incremento en la presencia de fragmentos de ADN mitocondrial en el genoma nuclear con la edad tanto en hígado como en cerebro de rata (Caro et al., 2010) y en *Saccharomyces cerevisiae* (Cheng y Ivesa, 2010).

Dado que estas inserciones tienen el potencial para alterar secuencias del ADN genómico, su acumulación en el núcleo a lo largo del tiempo podría alterar la información codificada por el ADN nuclear y contribuir al proceso de envejecimiento (Richter, 1988). Así, de acuerdo con este mecanismo, la mitocondria continuaría siendo la fuente del problema **pero la principal diana sería el núcleo.**

En apoyo al papel determinante del ADN mitocondrial en el envejecimiento se ha observado **una correlación negativa entre la longevidad máxima y los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial de corazón y cerebro de animales homeotermos (mamíferos y aves), que no ocurre en el nuclear** (Barja y Herrero, 2000) (Figuras 10 y 11). A pesar de que tanto el ADN nuclear como el mitocondrial cuentan con importantes sistemas de reparación de las lesiones oxidativas (Bohr, 2002), no existe correlación positiva entre la actividad de reparación del daño endógeno al ADN (Vía de reparación por escisión de bases- BER) y la longevidad máxima (Page y Stuart, 2012). Por lo tanto, la eliminación del daño no controlaría la tasa de envejecimiento, sino que lo haría la producción, lo que no descarta que el daño que se produce al ADN pueda estar situado entre las causas finales del envejecimiento.

2.2.2. Daño oxidativo a lípidos

El daño oxidativo a lípidos o peroxidación lipídica se produce como consecuencia de la **oxidación de los dobles enlaces de los ácidos grasos por los radicales libres**. Así, la susceptibilidad de los lípidos al ataque oxidativo aumenta según lo hace su número de dobles enlaces (Refsgaard et al., 2000; Winczura et al., 2012).

El radical hidroxilo y el oxígeno singlete son especies reactivas capaces de iniciar procesos de peroxidación lipídica, que tienen como consecuencia la alteración de las membranas mediante el incremento de la viscosidad, el descenso de la resistencia eléctrica, el aumento de la permeabilidad celular, el incremento en el intercambio de fosfolípidos entre las monocapas y el aumento de los entrecruzamientos con las

proteínas, que disminuye la movilidad lateral y rotacional de las mismas (Richter, 1987).

La peroxidación lipídica se produce en tres fases: iniciación, propagación y terminación (Figura 9). En la fase de iniciación, el radical libre extrae un electrón de un átomo de carbono contiguo a un doble enlace del ácido graso, lo que origina la aparición de un radical alquilo (L^{\cdot}) que forma enlaces cruzados dentro de la molécula o reacciona con otras moléculas diferentes, frecuentemente con el oxígeno, lo que genera el radical peroxilo (LOO^{\cdot}). Este radical reacciona con el doble enlace de un ácido graso adyacente, dando lugar a la fase de propagación, generando una reacción en cadena dado que se forma un hidroperóxido lipídico ($LOOH$) y un nuevo radical alquilo que puede iniciar nuevas reacciones con otras moléculas (Marnett, 1999). Por lo tanto, a partir de sólo un ácido graso alterado en la etapa de iniciación se puede dañar una gran cantidad de moléculas. Aunque los hidroperóxidos son bastante estables, en presencia de metales de transición y en una reacción análoga a la de Fenton se puede producir su reducción y la formación de un radical lipídico alcóxil (LO^{\cdot}), que puede fragmentarse dando lugar a diferentes aldehídos que son relativamente estables y pueden difundir a través de la célula y reaccionar con otras moléculas (Spiteller, 2010; Winczura et al., 2012; Lenaz, 2012).

Entre los numerosos productos generados mediante los procesos de peroxidación lipídica, dos principales y más extensamente estudiados son el malondialdeído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Estos compuestos son más estables que los ROS y debido a su estructura sin cargas, pueden migrar fácilmente a través de las membranas, por lo que pueden ser altamente tóxicos y ampliar los efectos dañinos por su elevada distancia de migración (Pamplona, 2011). Sus efectos más conocidos en las células son las interacciones con proteínas, pudiendo participar en dos tipos de reacciones químicas: la adición de Michael y la formación de bases de Schiff (Winczura et al., 2012).

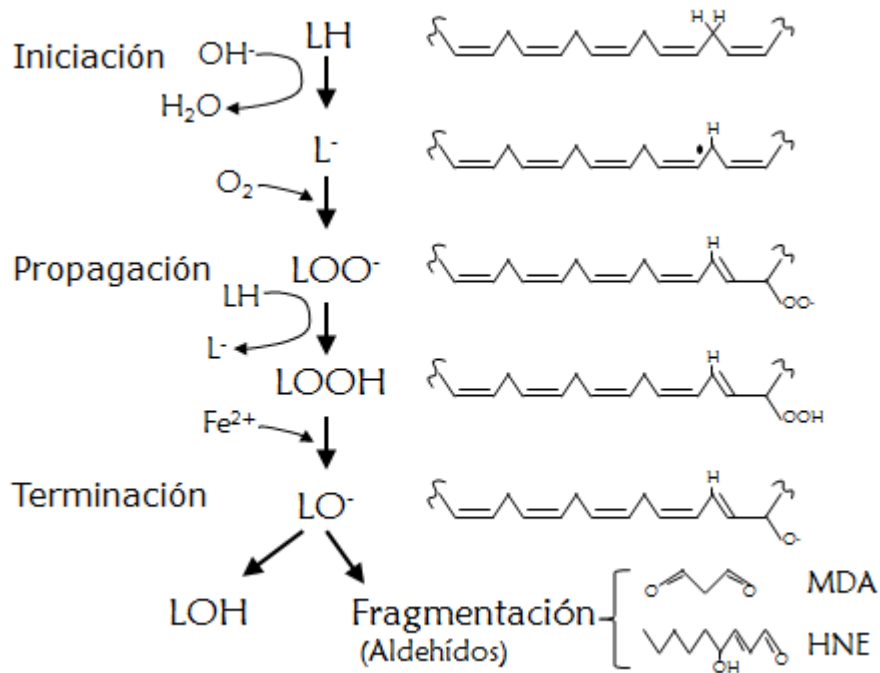


Figura 9. Esquema de las reacciones principales que se producen durante la peroxidación lipídica. LH = lípido intacto; L· = Radical lipídico alquilo; LOO· = radical lipídico peroxilo; LOOH = hidroperóxido lipídico; LO· = radical lipídico alcoxil; LOH = hidroxilo lipídico; MDA= Malondialdehído; HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, *polyunsaturated fatty acid*) de los lípidos de membrana son muy sensibles al ataque oxidativo debido a que tienen dobles enlaces. En cambio, los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, *monounsaturated fatty acid*) y saturados (SFA, *saturated fatty acid*) son muy resistentes al ataque oxidativo. De hecho, existe un efecto “exponencial”, a mayor número de dobles enlaces, mayor susceptibilidad al ataque por radicales libres. Por ello, su presencia en las membranas celulares juega un papel muy importante en la peroxidación lipídica y correlaciona con la longevidad máxima (Spiteller, 2010). Así, se ha observado una correlación negativa entre la longevidad máxima y el índice de dobles enlaces (DBI) de las membranas mitocondriales (Figuras 10 y 11).

2.2.3. Daño oxidativo a proteínas

El ataque de los radicales libres sobre las proteínas da a lugar a modificaciones oxidativas de las mismas, entre ellas, por ejemplo: la formación de hidroperóxidos,

hidroxilación o nitración de grupos aromáticos, oxidación de grupos sulfhidrilo, sulfoxidación del aminoácido metionina, la conversión de algunos aminoácidos a derivados carbonílicos, la ruptura de la cadena polipeptídica y la formación de puentes cruzados. Estas modificaciones pueden desencadenar en las proteínas la pérdida de sus funciones enzimáticas, su acumulación e inhibición de su degradación, como se ha observado en algunas enfermedades (Beckman y Ames, 1998).

Las cadenas laterales de todos los aminoácidos son susceptibles a la oxidación. Sin embargo, algunos residuos como la histidina, arginina, glutamato, tirosina, valina, prolina, treonina y especialmente, la cisteína y la metionina, son más vulnerables al ataque oxidativo por los ROS (Stadtman y Levine, 2003). El aminoácido metionina es altamente susceptible a ser oxidado por los radicales libres, de modo que al aumentar su presencia en las proteínas, también se incrementa la sensibilidad de éstas al daño oxidativo (Stadtman, 2004). De hecho, existe una correlación negativa entre la longevidad máxima de distintas especies de mamíferos y su contenido en metionina en el corazón (Ruiz et al., 2005) (Figuras 10 y 11).

Como resultado del ataque oxidativo sobre el aminoácido metionina se generan dos tipos de derivados: metionin-S-sulfóxidos (S-MetO) y metionin-R-sulfóxidos (R-MetO), que pueden ser reparados por dos enzimas metionina sulfóxido reductasas (Msr): MsrA que reduce específicamente el enantiómero S-MetO y MsrB, específica para R-MetO. Curiosamente, la sobreexpresión de la MsrA prolonga la longevidad de *D. melanogaster*, (Chung et al., 2010; Ruan et al., 2002) mientras que su disminución la reduce (Moskovitz et al., 2001) lo que pone de manifiesto la importancia de la reparación de los residuos de metionina alterados en relación con el envejecimiento.

Las proteínas también pueden ser modificadas por carbonilación, cuyos productos cuantitativamente más importantes son la formación de semialdehído glutámico (GSA) y semialdehído aminoacético (AASA) de la oxidación de arginina, prolina y lisina (Nystrom, 2005). Las modificaciones inducidas por carbonilación son irreversibles e irreparables, por lo que **la carbonilación proteica es el marcador de oxidación proteica más usado** (Dalle-Donne et al., 2006). Las proteínas carboniladas son marcadas para su degradación en los proteasomas, pero pueden escapar a ello formando agregados de gran tamaño molecular que van acumulándose con la edad.

Los agregados pueden volverse citotóxicos y han sido asociados con enfermedades como Alzheimer y Parkinson.

Además de ser alteradas por la oxidación directa provocada por la acción de los ROS, las proteínas pueden ser modificadas covalentemente por productos de peroxidación lipídica, como los aldehídos reactivos descritos en la sección anterior, MDA y HNE, que pueden dañar las proteínas por reacciones con el grupo amino de la lisina, el grupo sulfhidrilo de la cisteína o el grupo imidazol de la histidina, o por interacciones con otras especies reactivas como el radical alcoxilo y el radical peroxilo (Refsgaard et al., 2000). La modificación de los aminoácidos de las proteínas por productos de la peroxidación lipídica produce la formación de una variedad de aductos llamados en conjunto ALEs (*Advanced Lipoxidation Endproducts*), que incluyen, entre otros, el aducto Nε-(malondialdehído)-lisina (MDAL) y pueden servir como indicadores del estrés proteico lipooxidativo *in vivo* (Pamplona et al., 1998; Thorpe y Baynes, 2003). En este contexto, se ha demostrado que en especies animales longevas, un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos, tanto total como mitocondrial, va acompañado de una baja concentración de los ALEs, los aductos derivados de la lipooxidación en varios tejidos y proteínas mitocondriales (Pamplona et al., 2000; Pamplona et al., 2002a; Ruiz et al., 2005; Hulbert et al., 2007).

2.2.4. Daño oxidativo a hidratos de carbono

Los radicales libres catalizan la modificación química que los azúcares reductores ejercen sobre los residuos de aminoácidos en las proteínas (principalmente cisteína, histidina y lisina) a través de la reacción de Maillard (glicosilación proteica no enzimática). En ella, un glúcido reacciona con un grupo amino de una proteína lo que conduce a la generación de compuestos estables e irreversibles denominados AGEs (*Advanced Glycoxidation End-products*) (Thorpe y Baynes, 2003; Lenaz, 2012). Estos compuestos son extremadamente reactivos y contribuyen a la modificación química y entrecruzamiento de proteínas causando la acumulación de agregados durante el envejecimiento (Monnier, 2003; Pamplona, 2011). También pueden interactuar con los ácidos nucleicos, formando aductos con el ADN que pueden llevar a la aparición de mutaciones (Levi y Werman, 2001). Los AGEs son un grupo de compuestos heterogéneos que se forman constantemente en el organismo pero cuya generación

esta potenciada en condiciones de hiperglicemia o como consecuencia del ataque oxidativo (Vlassara, 2005).

Algunos de los compuestos más caracterizados derivados de estas reacciones y que sirven de indicadores específicos de daño glicoxidativo a proteínas *in vivo* son Nε-(carboximetil)-lisina (CML) (que también deriva de procesos lipoperoxidativos) y Nε-(carboxietil)-lisina (CEL) (Thorpe y Baynes, 2003).

Numerosos estudios avalan la idea de que los AGEs contribuyen al deterioro de la estructura y función proteica y al proceso de envejecimiento (Pamplona y Barja, 2007). Entre ellos, hay trabajos que muestran como, al igual que los niveles de ALEs, los niveles de AGEs correlacionan negativamente con la longevidad máxima en mamíferos (Sell et al., 1996) y su concentración es reducida en animales sometidos a restricción dietética (Pamplona et al., 2002b).

3. FACTORES QUE RELACIONAN EL ESTRÉS OXIDATIVO CON LA LONGEVIDAD MÁXIMA

Las dos características principales que relacionan la tasa de envejecimiento con el estrés oxidativo son: a) una baja tasa de generación de daño endógeno; b) una composición macromolecular altamente resistente a la modificación oxidativa (Figura 10) (Pamplona y Barja, 2011).

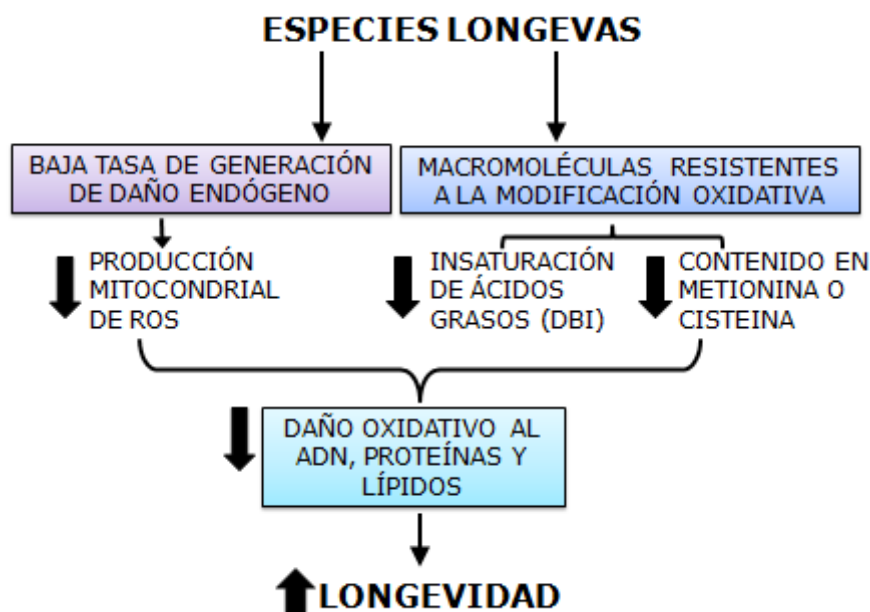


Figura 10. Características de las especies longevas.

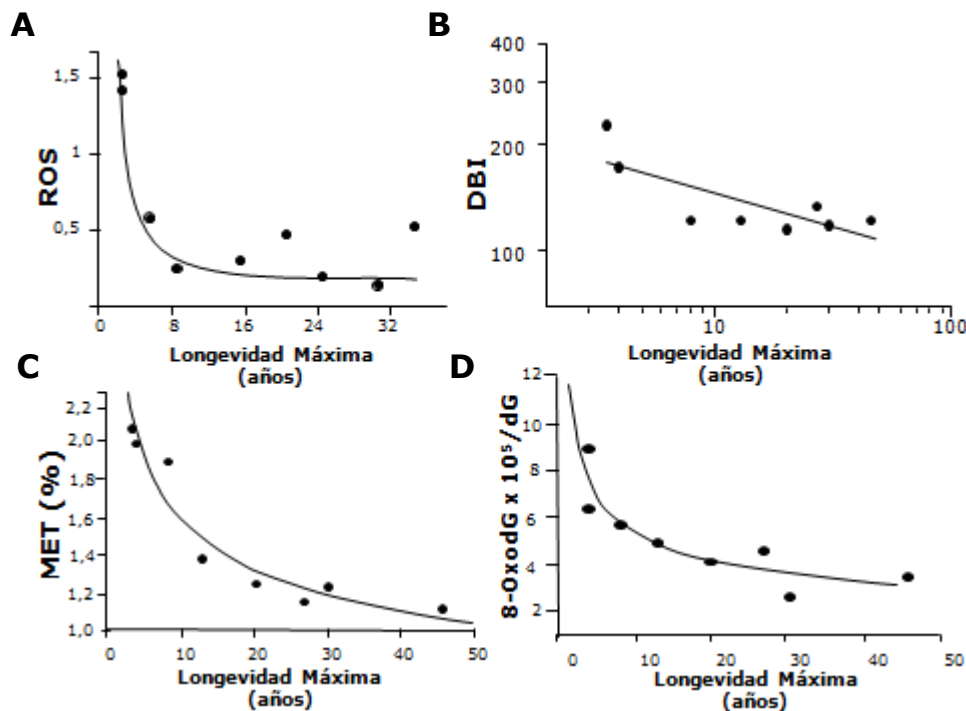


Figura 11. Correlaciones que pueden explicar el envejecimiento: Los factores relacionados con el estrés oxidativo que correlacionan con la longevidad máxima son: A) la producción mitocondrial de ROS en riñón, corazón, cerebro, pulmón e hígado, adaptado de Ku et al., 1993 y Barja et al., 1994a; B) el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas en hígado (representado por el DBI) y adaptado de Pamplona et al., 1998b; C) contenido en metionina de las proteínas en tejido cardíaco, adaptado de Ruiz et al., 2005; D) También existe una correlación frente al daño oxidativo al ADN mitocondrial en cerebro y corazón, estimado como el nivel del marcador 8-oxodG, adaptado de Barja y Herrero, 2000. Las especies utilizadas fueron: Ratón (*Mus musculus*, MLSP = 4 años), Rata (*Rattus norvegicus*, MLSP = 5 años), Cobaya (*Cavia porcelus*, MLSP = 12 años), Conejo (*Oryctolagus cuniculus*, MLSP = 13 años), Oveja (*Ovis aries*, MLSP = 19 años), Cerdo (*Sus scrofa*, MLSP = 21 años), Vaca (*Bos taurus*, MLSP = 49 años) y Caballo (*Equus caballus*, MLSP = 57 años). Además, en A se utilizaron: Periquito (*Melopsittacus undulatus*, MLSP = 21 años), Canario (*Serinus canaria*, MLSP = 24 años) y Paloma (*Columba livia*, MLSP = 35 años)

3.1. PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE RADICALES LIBRES

Teóricamente, el estrés oxidativo podría estar relacionado con el envejecimiento a través de la producción de ROS, su eliminación o ambos. Sin embargo, aunque los antioxidantes pueden estar implicados en la protección contra enfermedades que aparecen a edades avanzadas, no controlan la tasa de envejecimiento debido a los siguientes hechos:

- ★ **La cantidad de antioxidantes endógenos correlaciona negativamente con la longevidad en vertebrados.** Es decir, las especies longevas, incluyendo mamíferos, tienen constitutivamente menos (en vez de más) concentración de antioxidantes endógenos que las especies de vida corta (Perez-Campo et al., 1998).
- ★ **El incremento de los antioxidantes mediante suplementación en la dieta, inducción farmacológica o sobreexpresión génica no cambia la longevidad máxima,** tan sólo en algunos casos puede llegar a incrementar la longevidad media (Barja, 2004a; Sanz et al., 2006a).
- ★ **Los ratones *knockout* para enzimas antioxidantes** muestran diferentes patologías pero **no ven modificada su longevidad máxima** (Sanz et al., 2006a).

Todo ello indica que **no es la eliminación del daño lo que controla la tasa de envejecimiento, sino la modulación de su producción.** De hecho, hasta la fecha todos los estudios de Biología Comparada han demostrado que la producción mitocondrial de ROS es mucho menor en los animales longevos que en los de vida corta (Figura 11) (Barja, 2004a). Aunque los resultados de los primeros estudios no podían descartar el papel de la tasa metabólica en las correlaciones observadas (Pearl, 1928; Sohal et al., 1990; Ku y Sohal, 1993; Ku et al., 1993), el estudio de animales con una longevidad extraordinariamente elevada en relación a su tamaño corporal y tasa metabólica (aves, murciélagos y primates) ha sido realmente útil.

Respecto a las aves, a pesar de su alta tasa de consumo de oxígeno, los periquitos, canarios y palomas (con longevidades máximas de 21, 24 y 35 años respectivamente) presentan menores tasas de producción mitocondrial de ROS que los ratones y ratas (cuyas longevidades máximas están datadas en 3,5 y 4 años respectivamente) en sólo uno de los complejos mitocondriales, el complejo I y debido a: a) menor fuga de radicales libres (Barja, 2004a) y b) menor cantidad de complejo I (St-Pierre et al., 2002; Pamplona et al., 2005; Lambert et al., 2010)

Otras comparaciones entre roedores y murciélagos (Brunet-Rossini y Austad, 2004), roedores y primates (Kudin et al., 2004) o entre roedores con longevidades diferentes, por ejemplo ratón común y *Peromyscus leucopus*, ratón con longevidad de 8 años, confirmaron la menor producción mitocondrial de ROS en las especies más

longevas (Shi et al., 2013). En conjunto, estos estudios y el más reciente llevado a cabo por el profesor Martin Brand en la universidad de Cambridge (UK), comparando 12 especies animales (Lambert et al., 2007), sugieren que en general **la longevidad se asocia negativamente con la producción mitocondrial de ROS independientemente de su tamaño corporal y tasa metabólica**. Sin embargo, existe una excepción a esta regla, el roedor más longevo que existe, la rata topo desnuda (*naked mole rat*, *Heterocephalus glaber*), con una longevidad de 28 años y un peso corporal de 30 g (Sherman y Jarvis, 2002; Buffenstein, 2005), produce la misma cantidad de ROS que los ratones normales y tiene niveles elevados de daño oxidativo y bajos de antioxidantes (Andziak et al., 2005; Andziak y Buffenstein, 2006; Andziak et al., 2006). Las razones que podrían justificar esta excepción se desconocen, pero esta especie también presenta otras características que la hacen inusual: tiene un comportamiento social, es ectotérmica y vive en colonias bajo tierra. Además, se cree que existen ciertas diferencias en cuanto a la longevidad entre los individuos de la colonia, siendo la de los ejemplares destinados a reproducirse mayor de 17 años pero la de los restantes del orden de 2 a 3 años. Por ello sería interesante estudiar específicamente los ejemplares de la colonia con mayor longevidad y considerar otros factores relacionados con el estrés oxidativo como responsables de su elevada longevidad.

Además, los estudios de restricción de dieta (detallado en el apartado 4.1.) también apoyan el papel de la producción mitocondrial de ROS en el proceso de envejecimiento, dado que los animales sujetos a esta intervención muestran mayor longevidad máxima y menor producción mitocondrial de ROS específicamente y de nuevo por parte del complejo I y sin cambios en el consumo de oxígeno mitocondrial (Gredilla y Barja, 2005).

En resumen, **las especies longevas y los animales sometidos a restricción dietética presentan menor generación mitocondrial de ROS** y de acuerdo con esto, **menores niveles de 8-oxodG en su ADN mitocondrial** (Herrero y Barja, 1999; Barja y Herrero, 2000) (Figura 11) así como menor tasa de excreción urinaria de 8-oxodG (Foksinski et al., 2004). Por lo tanto, parece que disminuir la producción de ROS en vez de incrementar los antioxidantes o los sistemas de reparación es una estrategia

eficiente, simple y menos costosa desde un punto de vista energético utilizada por los animales longevos y los sometidos a RD.

3.2. MACROMOLÉCULAS RESISTENTES AL DAÑO OXIDATIVO

Además de caracterizarse por su baja generación mitocondrial de ROS, las especies longevas muestran una composición específica de macromoléculas en sus tejidos que les confiere mayor resistencia a la modificación oxidativa, lo que podría estar contribuyendo a su mayor longevidad. Esto se logra: a) en el caso de los lípidos, **disminuyendo la insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares** y b) respecto a las proteínas, **disminuyendo su contenido en aminoácidos sulfurados (metionina/cisteína)** (Figuras 10 y 11) (Pamplona y Barja, 2007).

3.2.1. Grado de insaturación de los ácidos grasos

Además de caracterizarse por poseer una baja producción mitocondrial de ROS, las especies longevas (aves, mamíferos e incluso humanos) tienen una composición de lípidos de membrana en los principales órganos vitales que les dotan de una **alta resistencia a la modificación oxidativa**. Sus membranas celulares y mitocondriales presentan un **menor grado de insaturación de los ácidos grasos** (menor índice de dobles enlaces, DBI: *Double Bond Index*, y menor índice de peroxidizabilidad, PI: *Peroxidizability Index*, este último calculado en base a las tasas relativas de peroxidación de los diferentes ácidos grasos que componen la membrana) que las especies de vida corta (Pamplona et al., 2002c; Sanz et al., 2006a; Hulbert et al., 2007) (Figura 11). Esto no se consigue a través de la reducción en la cantidad total de los PUFAs, *Polyunsaturated fatty acids* (Ácidos grasos poliinsaturados) presentes en la membrana, sino a través de una redistribución de los ácidos grasos insaturados (Pamplona et al., 2002c). Así, los ácidos grasos insaturados 20:4n-6 (ácido araquidónico) y especialmente el ácido 22:6n-3 (ácido docosahexaenoico) son sustituidos en las especies longevas por sus precursores 18:2n-6 (ácido linoleico) y 18:3n-3 (ácido linolénico), lo que hace que sus membranas sean mucho más resistentes a la peroxidación lipídica y que también disminuya la lipoxidación de proteínas tisulares (Pamplona et al., 1996, 1999a,b; 2002c; Hulbert et al., 2007).

La variación de longevidad entre individuos de una misma especie también se asocia con diferencias en la composición de la membrana. Cabe destacar los siguientes ejemplos: a) En ratón, dos cepas derivadas del genotipo silvestre tienen una longevidad mayor que otra cepa de ratón genéticamente heterogéneo y de laboratorio (Miller et al., 2002a). La composición de los ácidos grasos de sus membranas difiere en estas tres cepas, estando su PI relacionado con el grado de extensión de longevidad. Dado que las tres cepas de ratones fueron alimentadas con la misma dieta, se pone de manifiesto que las diferencias en la composición de membrana no se determinan por diferencias en la dieta sino que están genéticamente controladas (Hulbert et al., 2006); b) En insectos sociales, como las abejas (*Apis mellifera*), los ejemplares femeninos pueden llegar a ser “reinas” y vivir durante años u “obreras” cuya longevidad es de semanas (Winston, 1991), lo que depende del tipo de alimento que reciben. Mientras que las obreras comienzan su vida en la colmena alimentándose de polen, las reinas lo hacen de secreciones de jalea real. Esto es interesante porque el polen tiene un alto contenido en PUFAs y las jóvenes abejas obreras tras una semana alimentándose de este polen, incrementan dramáticamente los niveles de estos ácidos grasos en sus membranas celulares, lo que sugiere que la composición lipídica podría explicar las diferencias en la longevidad de ambos tipos de ejemplares de abejas (Haddad et al., 2007); c) En humanos, la composición de ácidos grasos de las membranas eritrocitarias de la descendencia de individuos nonagenarios difiere significativamente de sus controles, siendo menor el PI en la descendencia de los humanos longevos (Puca et al., 2008).

Otros casos en los que existe una relación entre la composición de membrana y la longevidad es el de especies como la rata topo desnuda *H. glaber* y el bivalvo *Arctica islandica* con longevidades extremas. En el primer caso, con una longevidad de 28 años, la rata topo desnuda muestra, con respecto al ratón, niveles similares de PUFAs pero cantidades muy bajas del ácido graso 22:6n-3, lo que se traduce en un menor PI y en membranas más resistentes a la peroxidación lipídica (Hulbert et al., 2006). En el segundo caso el bivalvo *A. islandica* con una longevidad datada en 507 años muestra también menor PI que el de otros moluscos bivalvos relacionados y, por lo tanto, una membrana más resistente a la peroxidación lipídica (Munro y Blier, 2012).

¿Cuáles son los mecanismos responsables de las diferencias en el perfil lipídico que se relacionan con la longevidad? En principio, podrían ser la **vía de desaturación de los ácidos grasos y el ciclo de deacilación-reacilación**, responsables de la composición de los ácidos grasos de las membranas celulares. Los PUFAs son generalmente sintetizados por la modificación de sus precursores, ácidos grasos saturados, mediante la inserción de dobles enlaces por la acción de las enzimas desaturasas y la elongación mediante incrementos de dos carbonos por la acción de las enzimas elongasas (Nakamura et al., 2004). Las especies longevas presentan menor actividad de las enzimas desaturasas delta-5 y delta-6 que las especies de vida corta (Pamplona et al., 2002c), lo que podría explicar los bajos niveles de los ácidos grasos altamente insaturados: 22:6n-3 y 20:4n-6 y altos de sus precursores (18:2n-6 y 18:3n-3) y, además, el ciclo de deacilación-reacilación también podría tener un papel importante en la regulación de su composición lipídica, dado que es el responsable de la introducción de ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos de membrana (Portero-Otin et al., 2001).

Modificar el grado de insaturación de las membranas celulares mediante intervenciones dietéticas es complicado aunque puede conseguirse utilizando dietas con distinto contenido en ácidos grasos saturados o insaturados (Sato et al., 1998; Pamplona et al., 2004). Sin embargo, aunque utilizar dietas especialmente diseñadas con alto contenido en ácidos grasos saturados puede disminuir la insaturación de las membranas celulares en la rata, esta manipulación también produce cambios no saludables en el perfil lipídico en plasma como por ejemplo el incremento en los niveles de colesterol (Pamplona et al., 2004).

En resumen, **los animales con una longevidad elevada muestran un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana basado en la redistribución entre los distintos tipos de PUFAs** sin alterar el contenido total (%) de éstos, la longitud media de cadena y la distribución de los fosfolípidos. Esto podría ser considerado como una estrategia evolutiva porque disminuiría la sensibilidad frente al daño oxidativo, tanto de manera directa (peroxidación lipídica) como indirecta (lipoxidación) sin alterar la fluidez y la microviscosidad de la membrana, fundamental para el funcionamiento correcto de receptores, bombas iónicas y transporte de metabolitos. Esto ocurriría

porque la fluidez de la membrana se incrementa de forma drástica con la introducción del primer y segundo doble enlace, mientras que los dobles enlaces adicionales causarían menor impacto en las variaciones de la fluidez (Brenner, 1984). Así, sustituir ácidos grasos con cuatro o seis dobles enlaces por aquellos que tienen dos (o algunas veces tres), disminuye la sensibilidad a la peroxidación lipídica y mantiene la fluidez de la membrana. Este fenómeno se ha denominado adaptación homeoviscosa a la longevidad de los homeotermos (Pamplona et al., 2002c). De acuerdo con esta interpretación, un estudio llevado a cabo por el profesor Jobson mostró que genes implicados en la composición lipídica (y particularmente en el sistema de desaturación) han sufrido la presión selectiva y la membrana celular ha sido una característica optimizada durante la evolución (Jobson et al., 2010).

3.2.2. Contenido en metionina o cisteína de las proteínas

Los estudios de Biología Comparada también sugieren que la metionina o la cisteína podrían estar relacionados con el envejecimiento. Muchos aminoácidos presentes en la secuencia proteica de las proteínas celulares pueden ser modificados por los radicales libres. Sin embargo, los residuos de aminoácidos sulfurados son particularmente susceptibles a la oxidación y la sensibilidad de las proteínas al estrés oxidativo se incrementa en función del número de estos residuos de metionina o cisteína (Stadtman et al., 2003; Stadtman et al., 2005). Tras estudiar la composición de aminoácidos en el músculo (Portero-Otin et al., 2004) y el corazón (Ruiz et al., 2005) de diferentes especies de mamíferos y aves, se encontró **una fuerte correlación negativa entre el contenido en metionina en las proteínas y la longevidad máxima** (Figuras 10 y 11). Llama la atención que en estos análisis la metionina fue el único aminoácido de las proteínas cardíacas que varió en función de la longevidad de las especies consideradas, aunque también cabe destacar que la técnica usada en el estudio no permitió determinar el contenido en cisteína.

Otros estudios han llevado a cabo análisis genómicos basándose en herramientas bioinformáticas. Así, se ha demostrado que las proteínas codificadas en el ADN mitocondrial en mamíferos de vida corta están enriquecidas con residuos de metionina cuando se comparan con las especies longevas (Aledo et al., 2011; Aledo et al., 2012). Los autores señalaron que sería la adición de residuos de metionina a las proteínas en

las especies de vida corta, más que la pérdida de los residuos de este aminoácido en las proteínas de animales longevos lo que estaría provocando esta diferencia y proponen que es el “uso” de la metionina más que su contenido el factor relacionado con la longevidad.

Sin embargo, otros autores han sugerido que el aminoácido relevante para la adaptación a la longevidad sería la cisteína en vez de la metionina (Moosmann y Behl, 2008). Sus análisis (248 especies incluidas en el meta-examen de las secuencias genómicas) han revelado que la frecuencia con la que la cisteína es codificada por el ADN mitocondrial podría considerarse un indicador de la longevidad, de tal forma que las especies longevas sintetizarían complejos de la cadena respiratoria empobrecidos en cisteína, lo que les protegería del daño oxidativo.

En resumen, estos datos sugieren que son necesarias más investigaciones en diferentes tejidos para clarificar si las especies longevas disminuyen la presencia de metionina y cisteína en sus proteínas para minimizar su susceptibilidad al daño oxidativo.

4. MANIPULACIONES QUE INCREMENTAN LA LONGEVIDAD MÁXIMA

4.1. RESTRICCIÓN DE DIETA

La restricción de dieta (RD; McCay et al., 1935) sigue siendo la **intervención mejor estudiada capaz de extender la longevidad media y máxima** en diversos organismos como levaduras, rotíferos, arañas, nematodos, peces y roedores de laboratorio (Mair y Dillin, 2008). En roedores, la RD puede llegar a extender la longevidad en un 50% (Yu et al., 1982) y sus efectos beneficiosos se producen no sólo cuando se lleva a cabo en animales jóvenes sino también en animales de edades avanzadas (Yu et al., 1985; Dhahbi et al., 2004). Los animales restringidos no sólo viven más sino que también están protegidos frente a la aparición y progresión de patologías asociadas a la edad como cáncer, nefropatías, sarcopenia, cardiomiopatías y neurodegeneración (Weindruch y Walford, 1988; Mattson et al., 2002; Weindruch, 2003; Martin et al., 2006; Jang et al., 2012). Incluso en ratones viejos un trabajo reciente ha demostrado que la RD puede revertir las cardiomiopatías asociadas a la edad (Yan et al., 2013). Sin embargo, la RD también conlleva una serie de efectos negativos debidos en parte al

menor nivel plasmático de la hormona de crecimiento, insulina, IGF-1, hormona estimulante del tiroides y gonadotropinas. Entre ellos se encuentran el retraso en la maduración sexual, la disminución de la fertilidad y una menor tasa de crecimiento (Gems y Patridge, 2001; Mobbs et al., 2001).

La idea de que la reducción de la ingesta de la dieta pudiese atenuar el envejecimiento en humanos recibió un fuerte estímulo en el año 2009 con la publicación de los resultados del primer estudio de restricción de dieta a largo plazo llevado a cabo en monos Rhesus durante 20 años (Colman et al., 2009). Los animales con menor ingesta (30% RD) mostraron menor mortalidad y menor número de casos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, atrofia cerebral y ausencia total de diabetes (Colman et al., 2009). Además, otros estudios llevados a cabo con monos viejos sujetos a RD a corto plazo mostraron como esta intervención mejoraba la regulación de la glucemia, el aprendizaje de tareas (Willette et al., 2012) y preservaba la masa muscular (McKiernan et al., 2012). Sin embargo, un segundo trabajo en monos ha obtenido resultados contradictorios (Mattison et al., 2012). En este estudio, la RD también redujo la incidencia de diabetes y de cáncer pero no se produjeron efectos sobre la mortalidad ni sobre las enfermedades cardiovasculares (Mattison et al., 2012). La razón de la discrepancia entre ambos estudios se desconoce aunque existen una serie de diferencias en cuanto al diseño experimental. Por ejemplo, las dietas usadas en el primer estudio fueron semipurificadas (evitando así la presencia de sustancias desconocidas) mientras que las del segundo no lo fueron. Además, los grupos control de ambos estudios fueron tratados de forma diferente: en el primero, los animales control eran alimentados *ad libitum* mientras que en el segundo lo eran con una cantidad fija, menor que la ingesta *ad libitum*. Esto, junto con otras diferencias experimentales, podría justificar los resultados discrepantes. En general, los estudios con animales han demostrado que la composición de la dieta es un aspecto más importante que las calorías en cuanto a sus efectos fisiológicos y sobre la longevidad, lo que concuerda con las conclusiones obtenidas en el trabajo de Mattison y colaboradores en el 2012 (Mattison et al., 2012) que proponen que lo que parece ser determinante sobre la longevidad es la composición de las dietas.

En humanos la restricción de dieta también parece tener beneficios similares a los observados en animales (Fontana et al., 2010). Esta intervención nutricional durante una media de 6 años en humanos (de 3 a 15 años de 32% de RD) protegió contra la obesidad, la resistencia a insulina, la hipertensión, la inflamación, la aterosclerosis y se asoció con muchos de los cambios hormonales implicados en la señalización de RD en roedores (Meyer et al., 2006; Fontana et al., 2010). Otros estudios a corto plazo indicaron que la RD en humanos disminuyó la temperatura corporal y el daño al ADN (Heilbronn et al., 2006), los factores de riesgo para la aterosclerosis y diabetes (Holoszy y Fontana, 2007), las enfermedades cardiovasculares y posiblemente el desarrollo de cáncer (Fontana y Klein, 2007; Omodei y Fontana, 2011).

A pesar del gran número de investigaciones y muchas décadas de trabajo científico, los mecanismos por los que la RD extiende la longevidad no han sido esclarecidos. Muchas hipótesis han sido propuestas incluyendo la disminución en la producción mitocondrial de ROS (Barja, 1993; Gredilla et al., 2001a; Gredilla y Barja, 2005) y cambios en las vías de señalización: Insulina/IGF-1, mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) y sirtuinas (Mair y Dillin, 2008; Selman et al., 2008; Harrison et al., 2009).

De acuerdo con las conclusiones obtenidas en estudios de Biología Comparada, numerosos trabajos han demostrado que la RD trabaja, al menos en parte, disminuyendo el estrés oxidativo mitocondrial (Gredilla y Barja, 2005). Al igual que en las especies longevas, **en los roedores sujetos a RD al 40% a largo plazo disminuye la producción mitocondrial de ROS en diferentes tejidos incluyendo hígado, corazón y cerebro** en rata (Gredilla et al., 2001a, b; Lopez-Torres et al., 2002; Hagopian et al., 2005; Sanz et al., 2005a) y en ratón (Sohal et al., 1994; Hagopian et al., 2011; Jang et al., 2012). Sin embargo, tras una intervención a corto plazo de RD (desde 6-7 semanas a 4 meses), la disminución de la producción mitocondrial de ROS se produce o no dependiendo del tejido estudiado (revisado en Gredilla y Barja, 2005). Por ejemplo, 6-7 semanas son suficientes para disminuir la producción mitocondrial de ROS y el daño oxidativo al ADN mitocondrial y nuclear en hígado de rata (Gredilla et al., 2001a) mientras que otros órganos requirieron más tiempo para que se produzcan estos efectos (Gredilla et al., 2001b; Gredilla et al., 2002). Aunque como se ha comentado

anteriormente el complejo I y el complejo III pueden generar ROS, al igual que sucede en las especies longevas, la restricción en la dieta disminuye la producción de ROS exclusivamente en el complejo I mediante una reducción en su concentración y en la fuga de radicales libres (Gredilla y Barja, 2005). Así, el complejo I de estos animales restringidos es sumamente eficaz evitando la producción de ROS, lo que hace que también se produzca un menor daño oxidativo al ADN mitocondrial así como el descenso del daño glicoxidativo, lipoxidativo y oxidativo a las proteínas mitocondriales (Pamplona et al., 2002b; Lambert et al., 2004).

En cambio, ni la expresión (Weindruch et al., 2001) ni la actividad (Sohal et al., 1994; Jang et al., 2012) de las enzimas antioxidantes, SOD (Superóxido dismutasa), catalasa o glutatión-peroxidasa (GSH) se ven modificadas en la RD. Tampoco se observan cambios acusados en la reparación de la 8-oxodG en el ADN mitocondrial (a través de la vía de reparación de escisión de bases, BER) (Stuart et al., 2004), aunque sí ha sido descrito un incremento en la actividad de la enzima APE (Endonucleasa apirimidinica/apurínica) tras esta intervención nutricional (Kisby et al., 2010).

Respecto al efecto de la restricción de dieta sobre la composición de los ácidos grasos de las membranas, los resultados son más complejos. Mientras algunos trabajos han demostrado que no se producen variaciones en el DBI de las mitocondrias de corazón de rata tras RD ni a corto ni a largo plazo (Pamplona et al., 2002b;c), otros autores hablan de descensos en el DBI en el músculo esquelético (Cefalu et al., 2000) y la reversión de su aumento asociado a la edad en las mitocondrias de hígado de rata a edades muy avanzadas (Lambert et al., 2004).

En resumen, la menor producción mitocondrial de ROS por parte del complejo I es un mecanismo común utilizado tanto por animales longevos como por animales restringidos con el fin de disminuir el grado de lesión oxidativa a las macromoléculas biológicas y especialmente al ADN mitocondrial y como consecuencia las mutaciones y la tasa de envejecimiento. Así, la disminución en la producción de ROS puede ser considerado un mecanismo altamente conservado de extensión de la longevidad que funciona tanto entre especies como dentro de una misma especie.

4.2. RESTRICCIÓN DE METIONINA

4.2.1. Efecto sobre la longevidad máxima

Tras muchas décadas de investigación sobre la RD y un consenso general que dictaba que los efectos de esta intervención se debían exclusivamente a la menor ingesta calórica, desde hace algunos años numerosos estudios cuestionan este consenso y proponen que *parte* de los efectos de la RD se deben a la menor ingesta de componentes particulares de la dieta. Entre éstos se encuentran la menor ingesta de proteínas y específicamente la menor ingesta del aminoácido metionina (Grandison et al., 2009; Simpson y Raubenheimer, 2009; Piper et al., 2011). Mientras que ni la restricción de carbohidratos ni la restricción lipídica parecen incrementar la longevidad en roedores (Ross, 1976; Khorakova et al., 1990; Shimokawa et al., 1996), la gran mayoría de estudios con restricción proteica (RP) al 40% (16 de 18 curvas de supervivencia diferentes) han demostrado el incremento de longevidad en rata y ratón, al igual que sucede con los estudios de restricción de metionina (revisado en Pamplona y Barja, 2006; Lopez-Torres y Barja, 2008; Sanchez-Roman y Barja, 2013).

Así, la restricción de metionina al 80% en la dieta incrementa la longevidad máxima en ratas F344 (Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994) **y ratones** (Miller et al., 2005; Sun et al., 2009) de forma similar a como lo hace la RP (con un incremento medio de extensión de longevidad del 18%), incluso cuando esta intervención se inicia en ratones con 12 meses de edad (Sun et al., 2009). Estos estudios coinciden con los llevados a cabo en *D.melanogaster*, en los que la restricción de metionina (Troen et al., 2007) y de caseína (Min y Tartar, 2006) incrementan la longevidad. Además, otros trabajos en levaduras y de nuevo en *D. melanogaster* han destacado el papel esencial de los aminoácidos y en concreto de la metionina en los efectos positivos de la RD sobre la longevidad (Grandison et al., 2009; Kabil et al., 2011; Petti et al., 2011). Dado que el incremento de la longevidad en los trabajos con restricción proteica y de metionina (18%) fue menor que el caracterizado para la restricción de dieta (40%), se podría concluir que parte del efecto de la RD sobre la extensión de la longevidad puede deberse a la menor ingesta de proteínas y específicamente del aminoácido metionina.

Además de extender la longevidad, la RP y la RMet ejercen numerosos efectos beneficiosos. Las dietas restringidas en proteínas atenúan la glomeruloesclerosis, retrasan la aparición de nefropatías y cardiomiopatías, protegen el hígado contra la exposición a tóxicos, retrasan la aparición de neuropatologías asociadas a la edad en ratón (Parrella et al., 2013) y disminuyen los niveles plasmáticos de IGF-1 en humanos (Fontana et al., 2008). En cuanto a **la restricción de metionina al 80%** (Figura 12), esta intervención **es capaz de reducir la incidencia de enfermedades degenerativas asociadas a la edad y disminuir los niveles en sangre de glucosa, insulina, IGF-1, colesterol, triglicéridos y leptina** (Perrone et al., 2012a). Además, la RMet protege contra los cambios asociados a la edad en el sistema inmune y disminuye el desarrollo de cataratas (Miller et al., 2005). Por otro lado, esta intervención también podría ser una estrategia importante para inhibir el crecimiento de tumores que exhiben el fenómeno de dependencia de metionina, entre los que se encuentran el cáncer de vejiga, de mama, de colon, renal, de próstata, gliomas, melanomas y otros cánceres en los que las células tumorales tienen mayor dependencia de la metionina que las células sanas (Hoffman, 1985; Komninou et al., 2006; Cavuoto y Fenech, 2012).

Una parte importante de los efectos beneficiosos de la RMet al 80% afecta a la adiposidad, de tal forma que esta intervención reduce la grasa visceral en un 70% (más de un 40% tras su corrección por masa corporal) y disminuye los niveles de leptina e incrementa los de adiponectina (Malloy et al., 2006). Incluso en roedores con una dieta RMet al 80% pero con alto contenido en grasa (60%), esta intervención es capaz de proteger frente a la obesidad inducida por la dieta y de la diabetes tipo 2 (Ables et al., 2012). Estos efectos beneficiosos (Figura 12) parecen estar mediados por respuestas específicas de tejido que favorecen un incremento de la biogénesis y de la función mitocondrial, de la oxidación de ácidos grasos y del gasto energético total, posiblemente mediado a través de la señalización β adrenérgica y de cambios en la homeostasis lipídica (Perrone et al., 2010), como el incremento del metabolismo lipídico en el tejido adiposo y muscular y la disminución de su síntesis en el hígado, a través de una serie de cambios en la expresión de un gran número de genes, como ha sido descrito en trabajos con RMet al 80% (Perrone et al., 2012a;b). Curiosamente, **añadir cisteína a la dieta restringida en metionina revierte la mayoría de los efectos**

beneficiosos con respecto a adiposidad y sensibilidad a insulina (Elshorbagy et al., 2011) y aumenta la transcripción de varios genes asociados con inflamación y carcinogénesis (Perrone et al., 2012b) por lo que los autores proponen que los cambios beneficiosos sobre el tejido adiposo observados en animales sujetos a RMet podrían ser atribuidos al menor nivel de cisteína en sangre y en hígado (Elshorbagy et al., 2010; Perrone et al., 2012a).

Efectos beneficiosos de la RMet al 80% en roedores

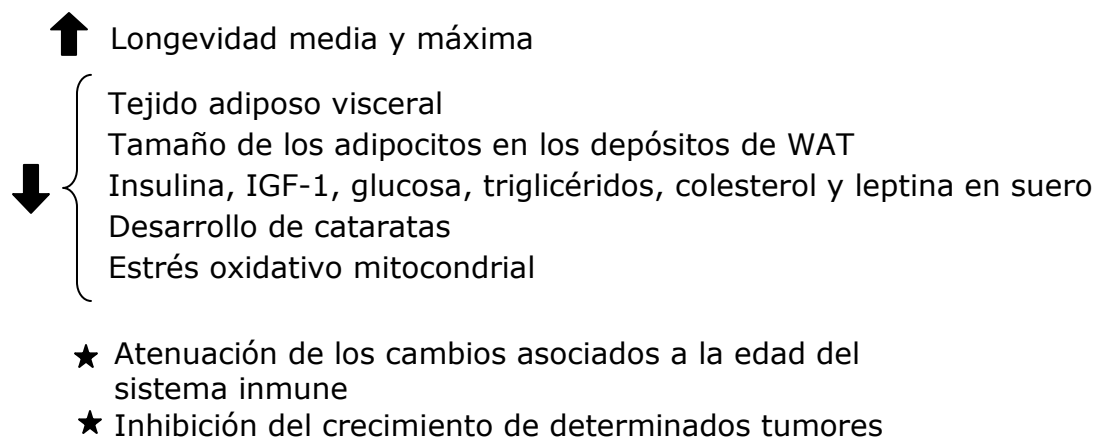


Figura 12. Esquema resumen de los efectos beneficiosos de la RMet al 80% en roedores. WAT: Tejido adiposo blanco: inguinal, epididimal, mesentérico y retroperitoneal.

4.2.2. Efectos sobre el estrés oxidativo mitocondrial

De acuerdo con la falta de efecto sobre la longevidad, ni la restricción lipídica al 40% (Sanz et al., 2006b), ni la restricción de carbohidratos al 40% (Sanz et al., 2006c) modifica la producción mitocondrial de ROS y el daño oxidativo al ADN. Sin embargo, la restricción proteica al 40% disminuye tanto la producción mitocondrial de ROS en el complejo I, como el daño oxidativo al ADN mitocondrial y a las proteínas y la insaturación de los ácidos grasos de membrana en hígado de rata (Sanz et al., 2004; Ayala et al., 2007) de forma similar, tanto cuantitativa como cualitativamente, a lo observado tras RD al 40%. En cuanto al aminoácido responsable de la disminución del estrés oxidativo en la RP, era lógico sospechar que la metionina estaría involucrada dado que su restricción al 80% en la dieta incrementa la longevidad en roedores (Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994; Miller et al., 2005; Sun et al., 2009). Así,

nuestro grupo, dirigido por el Dr. Gustavo Barja demostró que **la RMet tanto al 80% como al 40% en ratas jóvenes y durante 7 semanas disminuye la producción de ROS en el complejo I, la fuga de radicales libres, la cantidad del complejo I, el daño oxidativo al ADN mitocondrial (8-oxodG), los marcadores de modificación proteica oxidativa, glicoxidativa y lipoxidativa y la insaturación de los ácidos grasos de membrana en hígado** (Sanz et al., 2006d; Caro et al., 2008). Los mismos efectos beneficiosos se obtienen en corazón con RMet al 80% y en riñón y cerebro con RMet al 40% (aunque en este caso no se modifica la insaturación de los ácidos grasos de membrana) (Sanz et al., 2006d; Caro et al., 2009a; Lopez-Torres y Barja, 2008). Además, un estudio reciente en el que se investigaron los cambios genéticos inducidos por esta intervención nutricional demuestra que entre los numerosos genes que se ven modificados por el tratamiento, destacan los cambios en las enzimas responsables de la composición lipídica, lo que pone de manifiesto como esta intervención también podría estar actuando a través de la modulación de la composición lipídica de las membranas celulares (Perrone et al., 2012b). Por otro lado, la restricción en la dieta de todos los aminoácidos excepto la metionina no induce modificaciones ni en la producción mitocondrial de ROS ni en los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial, lo que confirma la ausencia de efecto del resto de aminoácidos sobre el estrés oxidativo (Caro et al., 2009b).

Llama la atención que tanto los mecanismos de acción que ejerce la RD sobre el estrés oxidativo como la magnitud de los cambios que produce son muy similares a los descritos en la RP y la RMet (Figura 13) (Lopez-Torres y Barja, 2008). Así, estos resultados sugieren que **las proteínas y en concreto el aminoácido metionina son los componentes de la dieta responsables de la disminución del daño oxidativo que tiene lugar durante la RD**. El grado de restricción de metionina también es un factor interesante dado que la restricción de este aminoácido al 80% comparte los efectos negativos descritos en la RD como retrasos en la tasa de crecimiento y el tamaño corporal. Sin embargo, la restricción de metionina al 40% no produce estos efectos negativos y en los órganos en los que ha sido estudiado (hígado, riñón y cerebro) disminuye el estrés oxidativo de forma similar a como lo hace la restricción al 80% (Caro et al., 2008, 2009a). Por lo tanto la RMet al 40% es una manipulación muy

interesante porque sería una opción mucho más viable para poder aplicarla a la población humana sin los efectos negativos sobre el crecimiento.

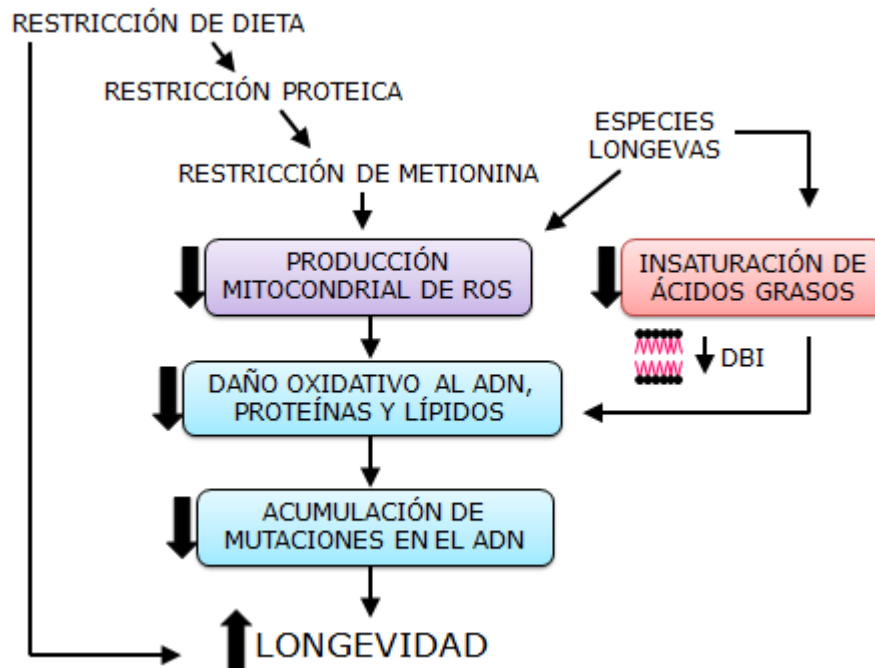


Figura 13. Estrés oxidativo mitocondrial y longevidad. La producción mitocondrial de ROS y el consiguiente daño oxidativo al ADN, proteínas y lípidos es menor en las especies longevas y en los animales sujetos a restricción de dieta, proteica y de metionina, manipulaciones que incrementan la longevidad máxima en roedores. A menor producción mitocondrial de ROS y menor daño oxidativo, menor será la acumulación de mutaciones en el ADN, lo que contribuirá junto con otros cambios a disminuir la tasa de envejecimiento y a incrementar la longevidad. La menor producción mitocondrial de ROS y el menor daño oxidativo en animales sujetos a RD y PR parecen estar inducidos por su baja ingesta en metionina. Además, otros mecanismos aún por clarificar estarían operando en RD. Por otro lado, los mamíferos y aves longevas tienen también un menor grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares (menor contenido en dobles enlaces, DBI) de sus tejidos, lo que les protege de la peroxidación lipídica y también da lugar a sus menores niveles de oxidación y lipoxidación de proteínas y contribuye probablemente a su menor oxidación.

Por otro lado, la ingesta excesiva de metionina en la dieta es tóxica y esta toxicidad excede a la producida por cualquier otro aminoácido (Harper et al., 1970). Así, tras la suplementación de metionina en la dieta se ha descrito el aumento del estrés oxidativo mitocondrial (Park et al., 2008; Gomez et al., 2009), de procesos de peroxidación lipídica (Hidiroglou et al., 2004) y de daño en órganos vitales como el aparato cardiovascular, el riñón y el hígado (Mori y Hirayama, 2000; Kumagai et al.,

2002; Troen et al., 2003) con efectos negativos similares a los observados en ratas alimentadas con una dieta con alto contenido en proteínas.

4.2.3. Metabolismo de la metionina y su impacto sobre la metilación del ADN

La metionina es un aminoácido esencial, neutro, que contiene un átomo de azufre y cuya fuente más importante son las proteínas de origen animal. Además de su función como precursor en la síntesis proteica, la metionina es necesaria para la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), el principal agente biológico donador de grupos metilo y la cisteína, el reactivo limitante para la síntesis de glutatión (GSH). Por lo tanto, el metabolismo de la metionina (Figura 14) es especialmente importante porque regula dos sistemas encargados de mantener la homeostasis celular como son los procesos de metilación y el balance redox (Martinov et al., 2010).

Llama la atención que el ciclo metabólico de la metionina se ve alterado, además de en la RMet, en la RD y en los ratones *Ames dwarf*, pudiendo existir un nexo entre este ciclo metabólico y la extensión de longevidad. Así, estudios llevados a cabo en *D.melanogaster* con RD han demostrado que la enzima CBS, que cataliza el paso determinante en la vía de transulfuración de la metionina (Figura 14), es un regulador positivo de la longevidad, siendo su sobreexpresión suficiente para mimetizar los efectos beneficiosos de la RD, que según proponen los autores, estaría actuando a través de la estimulación de esta enzima y por lo tanto de la vía de transulfuración (Kabil et al., 2011). Es esta enzima, la CBS, la que se encuentra también incrementada en los ratones longevos *Ames dwarf* que también muestran una mayor actividad de las enzimas GNMT y MAT y menor concentración de SAM (Uthus y Brown-Borg, 2006). Además, la deficiencia de la enzima CBS también ha sido asociada con la inducción de la senescencia celular *in vitro*, implicando disfunción mitocondrial y mayor vulnerabilidad de las células a la homocisteína exógena, sugiriendo un nuevo mecanismo que une la deficiencia de esta enzima al envejecimiento vascular (Albertini et al., 2012).

Acerca de la RMet, esta intervención disminuye los niveles en suero y en tejido hepático de los aminoácidos sulfurados: metionina, cisteína, cistationina y taurina (Perrone et al., 2012b), mientras que los niveles de homocisteína (Elshorbagy et al., 2010) y glutatión en plasma (Richie et al., 1994) se ven incrementados. Sin embargo,

los niveles de glutatión disminuyen en el hígado bajo esta intervención nutricional (Maddineni et al., 2013). Por el contrario y como es lógico la suplementación de metionina incrementa la metionina y sus metabolitos SAM y SAH en hígado y corazón (Gomez et al., 2009). Así, los efectos perjudiciales de esta intervención nutricional han sido atribuidos tanto a la metionina de forma directa (Gomez et al., 2011) como a sus metabolitos: SAM y SAH (Harper et al., 1970; Troen et al., 2007).

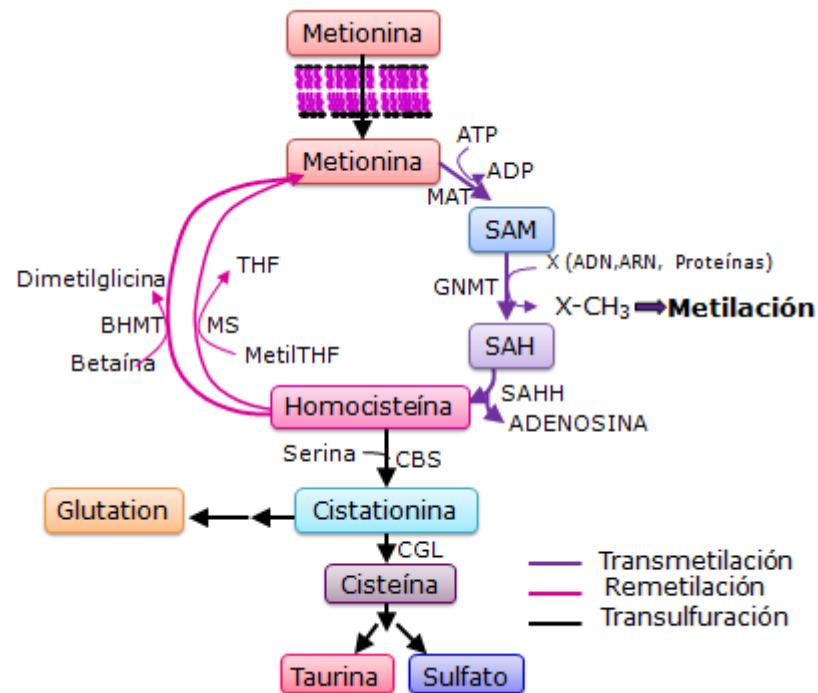


Figura 14: Esquema del ciclo metabólico de la metionina. Tras la ingesta proteica, la metionina llega a la célula donde puede sintetizar proteínas o entrar al ciclo metabólico que consta de varias partes. En la primera etapa, la metionina es activada como donador de grupos metilo por la enzima MAT produciendo el intermediario SAM, que por la acción de las enzimas metiltransferasas, puede donar su grupo metilo a distintos aceptores (Clarke y Banfield, 2001; Aposhian, 1997) y generar SAH, cuya hidrólisis produce la homocisteína. A este conjunto de reacciones se les denomina transmetilación. La homocisteína puede ser metilada para producir metionina mediante dos vías (remetilación), una por la acción de la MS y la otra, producida en el hígado y riñón de algunas especies por la BHMT. La vía de transulfuración es básicamente la única vía del catabolismo de la metionina bajo condiciones fisiológicas, existe en la mayoría de los tejidos excepto en el músculo esquelético, cardíaco y el endotelio y resulta en la transferencia del sulfuro de la metionina a la serina para formar cisteína (Rao et al., 1990) y los productos finales sulfato y taurina. MAT: Metionina adenosil transferasa; GNMT: Glicina N-metil transferasa; SAHH: S-Adenosilhomocisteína hidrolasa; CBS: Cistationina β sintasa; CGL: Cistationina y liasa; MS: Metionina Sintasa; BHMT: Betaína homocisteína metiltransferasa; SAM: S-Adenosilmetiona; SAH: S-Adenosilhomocisteína. THF:tetrahidrofolato.

Como consecuencia de la **alteración del ciclo de la metionina y en concreto de los niveles de SAM, puede verse modificada la metilación del ADN**, que es la modificación epigenética más estudiada, lo que puede modular la expresión génica en gran variedad de organismos y es susceptible de cambiar a través de la vida de un individuo especialmente durante el desarrollo y el envejecimiento de forma compleja (Fraga et al., 2005). El contenido total en metilcitosina puede disminuir con el envejecimiento, llevando a la hipometilación genómica en la mayoría de los tejidos en vertebrados, mientras que las regiones promotoras tienden a hipermetilarse en muchos genes (Murgatroyd y Spengler, 2012; Johnson et al., 2012). Además, el cáncer se asocia con frecuencia con la hipermetilación de los genes supresores de tumores al comparar con tejido normal (Ahuja y Issa, 2000). Con vistas a la relación entre la metilación del ADN y el envejecimiento, es importante tener en cuenta que las fluctuaciones en la dieta del aminoácido metionina o de otros compuestos como la colina o el folato, podrían tener efectos potenciales en la metilación del ADN. Aun así, existen pocos trabajos que evalúen el papel de la metionina en la dieta sobre la metilación del ADN. Como se comentó anteriormente, la suplementación de metionina en la dieta incrementa el potencial de metilación (SAM/SAH) sólo en el corazón (Gomez et al., 2009). Otros estudios con el mismo tipo de tratamiento no modifican la metilación de la región promotora del gen p53, pero sí se observa un incremento de SAH (Amaral et al., 2011). Con vistas a aclarar el papel que juega la metilación del ADN en la longevidad son necesarios estudios adicionales.

4.3. MANIPULACIONES GENÉTICAS

4.3.1. Sistema Insulina/IGF-1, TOR y sirtuinas.

Mientras que los efectos de la RD sobre la longevidad se conocen desde hace 70 años, su manipulación mediante factores genéticos se ha desarrollado recientemente (Selman y Withers, 2011). Así, durante la última década se han descrito muchos mutantes con pérdida de función (*Knockouts*) de genes individuales en el ratón que aumentan la longevidad máxima hasta en un 40%. La inmensa mayoría de estos mutantes longevos a los que se les ha eliminado un gen “pro-envejecimiento” lo son de genes de la vía de señalización celular IIS: Insulina/*Insulin-like growth factor 1* (IGF-1). Este sistema ha sido altamente conservado a lo largo de la evolución y propuesto

como un regulador de longevidad en una amplia variedad de animales, desde nematodos hasta mamíferos (Gems y Partridge, 2001).

En especies como el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Kenyon, 2001) e insectos como *D. melanogaster* (Clancy et al., 2001), las mutaciones en genes de la vía de señalización homólogos a IGF-1 e insulina incrementan la longevidad, al igual que en dos modelos clásicos de ratones enanos (*dwarf*): *Ames* (Brown-Borg et al., 1996) y *Snell* (Flurkey et al., 2001), que se caracterizan porque la mutación de un solo gen provoca un incremento drástico en la longevidad: el gen Prop-1 en los ratones *Ames* y el gen Pit-1 en los ratones *Snell*. La pérdida de estos genes provoca que la región hipofisiaria productora de hormona del crecimiento (GH), estimuladora del tiroides y prolactina no se diferencie y que la concentración de estas hormonas sea muy baja en sangre. Además, existen modelos de ratones *knockout* para la hormona del crecimiento (Coschigano et al., 2000; Bartke et al., 2001a), para el receptor de insulina (Selman et al., 2008) y para el receptor de IGF-1 (Holzenberger et al., 2003) en los que la longevidad se ve incrementada (aunque menos que en los modelos *dwarf*). Por otro lado, la sobreexpresión de la GH acorta la longevidad en ratones (Wolf et al., 1993). Además, en humanos, los polimorfismos en genes relacionados con esta vía de señalización correlacionan con la longevidad (van Heemst et al., 2005; Suh et al., 2008; Pawlikowska et al., 2009).

La observación de que la longevidad de los ratones *Ames dwarf* puede ser extendida por restricción de dieta (Bartke et al., 2001b) así como las evidencias de diferencias en la expresión génica entre roedores *Ames dwarf* y sometidos a RD (Miller et al., 2002b) sugiere que la vía por la que esta mutación y la RD incrementan la longevidad parecen ser independientes. Sin embargo, el hecho de que la RD no incrementa la longevidad en roedores mutantes para el receptor de GH complica la interpretación de estos resultados (Bonkowski et al., 2006). Además, los ratones *Ames* muestran signos de estrés oxidativo mitocondrial reducido (Sanz et al., 2002).

La vía de señalización TOR (*Target Of Rapamycin*) también tiene un papel importante y conservado en el control de la longevidad y está relacionado con la vía IIS. Estudios en nematodos y en la mosca de la fruta han demostrado que la inhibición genética del complejo 1 de la proteína TOR (TORC1) incrementa la longevidad (Vellai et

al., 2003; Jia et al., 2004; Kapahi et al., 2004) al igual que en levaduras, que además muestran un incremento de la respiración mitocondrial (Bonawitz et al., 2007). En ratones, la deleción de la proteína ribosomal S6 Kinasa 1 (S6K1), componente de la vía mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), incrementa la longevidad e induce resistencia a patologías asociadas a la edad, como la pérdida de la sensibilidad a la insulina y la disfunción motora (Selman et al., 2009). La proteína mTOR regula el crecimiento celular coordinando procesos anabólicos y catabólicos que responden a la disponibilidad de aminoácidos, glucosa, y oxígeno. De tal forma que niveles bajos de aminoácidos (al igual que sucede con las intervenciones dietéticas RD, RP y RMet), inhiben la vía mTOR, por lo que podría existir un nexo entre esta vía y las manipulaciones nutricionales que incrementan la longevidad citadas anteriormente: RD, RP y RMet (Gulati y Thomas, 2007). De hecho, un estudio llevado a cabo en el año 2009 por Sun y colaboradores demuestra que ratones sujetos a RD muestran cambios en la fosforilación de las proteínas: mTOR, su sustrato 4E-BP1 y las proteínas, Akt, Erk, Jnk2 y la kinasa p38, mientras que esto no ocurre en ratones sujetos a RMet, que sólo muestran cambios en la fosforilación de Akt y Jnk2 (Sun et al., 2009). Por esto podría deducirse que la implicación de esta vía de señalización en la RD es mucho mayor que en la RMet.

Otra familia de moléculas cuya actividad ha sido relacionada con el incremento de la longevidad en organismos modelo como nematodos, levaduras y moscas son las sirtuinas, un grupo conservado de deacetilasas dependientes de NAD⁺. En mamíferos existen siete tipos de sirtuinas (SIRT1-7) que modulan vías metabólicas y de respuesta al estrés. Su papel con respecto al envejecimiento fue descubierto en levadura, donde la sobreexpresión de Sir2 (homólogo de SIRT1 en mamíferos) incrementa la longevidad (Kaeberlein et al., 1999), al igual que en nematodos y en *D. melanogaster* (Tissenbaum et al., 2001; Rogina y Helfand, 2004; Viswanathan et al., 2005). Además, los estudios iniciales también indicaban que la RD incrementaba la longevidad activando sirtuinas en los modelos animales citados anteriormente (Lin et al., 2000; Rogina y Helfand, 2004). Sin embargo, estudios recientes ofrecen resultados contradictorios y ponen en duda la capacidad de estas moléculas para incrementar la longevidad. Estos trabajos muestran que las sirtuinas no determinan la longevidad ni en nematodos ni en la

mosca de la fruta (Burnett et al., 2011) al igual que tampoco median los efectos de la RD sobre la longevidad (Kaeberlein, 2010; Kenyon, 2010). Los autores proponen que la estandarización del fondo genético y el uso de controles apropiados anularía los efectos de la Sir2 en estos organismos modelo.

Otras sirtuinas interesantes por su localización mitocondrial y su influencia sobre el metabolismo mitocondrial son SIRT3, SIRT4 y SIRT5, que podrían responder a la señalización por nutrientes, facilitar la producción de energía y participar en procesos de apoptosis y señalización intracelular (Verdin et al., 2010). Se ha demostrado que SIRT3 actúa sobre la regulación de los niveles de ATP, la actividad del complejo I (Ahn et al., 2008), la modulación de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos (Hirschey et al., 2010) y la producción mitocondrial de ROS (Koyama et al., 2011). Un trabajo llevado a cabo con ratones deficientes para esta proteína (SIRT3^{-/-}) ha demostrado que SIRT3 es necesaria para que la restricción de dieta produzca efectos beneficiosos como la disminución de los niveles de 8-oxodG en el ADN y la prevención de la pérdida de audición asociada a la edad, que no se producen en los animales mutantes (SIRT3^{-/-}) sometidos a RD (Someya et al., 2010). El papel que juegan SIRT4 y SIRT5 sobre la cadena respiratoria no ha sido aún clarificado. Se sabe que SIRT5 interacciona con el Citocromo c y que SIRT4 se une al transportador de ATP, pero su significado biológico no ha sido desvelado (Ahuja et al., 2007). Por otro lado la sirtuina 5 también regula la enzima carbamil fosfato sintetasa (CPS1) que limita el primer paso del ciclo de la urea, participando en la detoxificación de los productos resultantes del catabolismo de aminoácidos en hígado (Nakagawa et al., 2009).

4.3.2. Modelo AC5 KO

Un modelo de extensión de longevidad sumamente interesante por ofrecer una nueva aproximación al problema del envejecimiento en mamíferos fue propuesto por Yan y colaboradores en el año 2007. Su estudio demuestra que **la interrupción de la señalización β -adrenérgica mediante el bloqueo de la expresión génica de la adenilato ciclasa tipo 5 (AC5) en ratones (AC5 *Knockout*) incrementa la longevidad media y máxima**, protege frente a cardiomiopatías y la pérdida de masa ósea asociadas a la edad, incrementa la resistencia al estrés oxidativo inducido experimentalmente y disminuye la apoptosis de los miocitos cardiacos (Yan et al.,

2007). Además otros estudios llevados a cabo con ratones AC5KO han demostrado que la delección de esta isoforma preserva la función cardíaca en respuesta a la sobrecarga crónica de presión arterial y al estrés catecolaminérgico, al menos en parte, a través de la inhibición de la apoptosis de los miocitos, que tiene un papel muy importante en el desarrollo del fallo cardíaco (Okumura et al., 2003; Iwatsubo, 2004; Okumura et al., 2009).

La adenilato ciclasa (AC) es una enzima que cataliza la síntesis de AMP cíclico (AMPC) desde ATP a partir de la activación de los receptores β -adrenérgicos. La vía de señalización AC-AMPC está implicada en importantes funciones fisiológicas y desencadena una cascada de señalización intracelular (reacciones de fosforilación) que regula la función de múltiples proteínas y factores transcripcionales (Ishikawa et al., 2005; Yan et al., 2007). Existen al menos nueve isoformas de membrana de AC (AC1-9) con distinta distribución tisular, propiedades bioquímicas, actividades catalíticas específicas y distintos mecanismos por los que son regulados. Las principales isoformas en el corazón son la AC5, que se expresa en los tejidos adultos cardíacos y también en regiones del cerebro asociadas al control motor, como el estriado y la AC6 que se expresa en tejidos cardíacos fetales (Ishikawa et al., 2005). La activación de la AC5 a partir de la unión de la adrenalina o noradrenalina a los receptores β -adrenérgicos cataliza la formación de AMPC, lo que produce un estímulo de la actividad de la Proteína Kinasa A (PKA). Esto conlleva la inhibición de Raf-1, y por lo tanto la pérdida de señal para la fosforilación de la proteína ERK (*Extracellular regulated signal kinase*) (Figura 15).

Los autores sugieren que los cambios beneficiosos y el incremento de longevidad que se observan en este modelo animal se deben a la estimulación de la vía de señalización Raf/MEK/ERK que estaría induciendo mayor resistencia al estrés oxidativo a través de la enzima MnSOD, que se encuentra incrementada. Por lo tanto el aumento de la actividad de p-ERK podría proteger frente al estrés oxidativo y la apoptosis, favoreciendo la supervivencia celular (Yan et al., 2007). Además, existen una serie de estudios que relacionan la vía de señalización Raf/MEK/ERK con el envejecimiento. Así, se ha demostrado que la activación de esta vía de señalización disminuye con la edad (Hutter et al., 2000; Lorenzini et al., 2002; Torres et al., 2003) y

que los ratones longevos *Snell dwarf* (Madsen et al., 2004) y los sujetos a RD (Ikeyama et al., 2002) presentan mayores niveles de p-ERK que sus respectivos controles. Además, esta proteína ha sido considerada como agente cardioprotector (Taylor y Starnes, 2003).

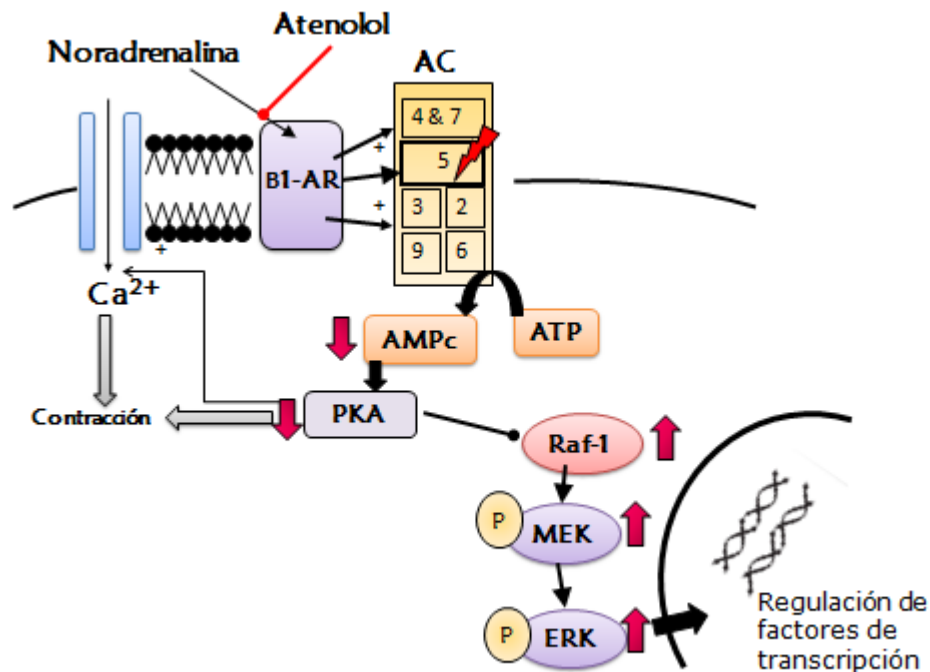


Figura 15. Interrupción de la señalización β-AR en ratones AC5 KO. La ausencia de la AC5 reduce la acumulación de AMPc lo que produce una disminución en la actividad de la PKA. Esto conlleva la pérdida de la inhibición sobre Raf-1, que activa la fosforilación de MEK y ERK. El atenolol es un fármaco β-1 bloqueante que inhibe la unión de la adrenalina al receptor. Las flechas indican los cambios que se esperarían en la vía de señalización por la pérdida de función de la AC5 o por la acción del fármaco atenolol. AC: Adenilato ciclasa; AMPc: AMP cíclico; PKA: Proteína kinasa A; ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*. Modificado de Yan et al., 2007.

La inhibición del sistema β-adrenérgico describe un nuevo modelo de roedores longevos producidos por la regulación a la baja de receptores relacionados con el sistema cardiovascular, lo que puede representar una posible estrategia terapéutica para extender la longevidad, dado que se podría “imitar” bloqueando la señalización adrenérgica mediante fármacos que son utilizados ampliamente en el tratamiento de la hipertensión y el fallo cardiaco.

4.4. APROXIMACIONES FARMACOLÓGICAS

4.4.1. Resveratrol, Rapamicina y Metformina: ¿Mimetizan la RD?

Dado que las dianas moleculares de estos tres fármacos forman una red interconectada de proteínas (SIRT1, mTOR y AMPK) que participan en la señalización por nutrientes, se pensó que las intervenciones con ellos podrían mimetizar los efectos beneficiosos de la RD. A pesar de lo prometedor que parecía, tan solo uno de los fármacos logró extender la longevidad máxima en un modelo de mamífero, la rapamicina. No obstante, el tratamiento con estos fármacos también ha sido asociado con efectos beneficiosos en roedores (Mouchiroud et al., 2010).

La molécula de resveratrol fue identificada inicialmente en 2003 en un estudio cuyo fin era aislar moléculas implicadas en la activación de la sirtuina 1 (SIRT1) (Howitz et al., 2003). El tratamiento con resveratrol extiende la longevidad en levaduras (Howitz et al., 2003), nematodos (Wood et al., 2004) y *D. melanogaster* (Bauer et al., 2004) con un efecto dependiente de Sir2 (homólogo de SIRT1). Sin embargo, esta extensión de longevidad no se observa en otros laboratorios con los mismos modelos animales, por lo que se propone que la acción del resveratrol podría requerir condiciones experimentales específicas (Kaeberlein et al., 2005; Bass et al., 2007). En roedores se confirmaron los efectos beneficiosos del resveratrol en ratones obesos y también en la protección frente a enfermedades asociadas a la edad, diferentes formas de cánceres y enfermedades cardiovasculares pero sin incremento de la longevidad (Baur et al., 2006; Lagouge et al., 2006; Sun et al., 2007; Pearson et al., 2008).

La metformina es una droga de la clase de las biguanidas, ampliamente usada como terapia en la diabetes de tipo 2 con efectos que presentan similitudes con los observados en animales sometidos a RD (Bailey y Turner, 1996). Respecto a su efecto sobre la longevidad, ésta se ve incrementada mediante el tratamiento con metformina en ratones susceptibles a desarrollar cáncer (Anisimov et al., 2003), ratones hipertensos (SHR, *spontaneously hypertensive rats*) (Anisimov et al., 2011) y en nematodos en un 40% (Onken y Driscoll, 2010) pero no así en ratas sanas (Smith et al., 2010). Acerca de las moléculas sobre las que la metformina ejerce su efecto, inicialmente se propuso que inhibía el complejo I de la cadena respiratoria en

hepatocitos (El-Mir et al., 2000) pero más tarde se demostró que su acción principal era la activación de la enzima AMPk en estas células (Zhou et al., 2001). Además, un trabajo reciente llevado a cabo por el Dr. David Gems y colaboradores ha descrito cómo la metformina incrementa la longevidad en levaduras mediante la alteración del metabolismo de la metionina (Cabreiro et al., 2013). Por lo tanto, las dianas de esta molécula podrían ser más amplias de lo esperado y podrían no funcionar en el mismo tejido y al mismo tiempo.

La rapamicina fue identificada inicialmente como un nuevo antibiótico con actividad antifúngica cuya molécula diana es la proteína TOR. Los derivados de la rapamicina se usan actualmente en clínica como inmunosupresores para prevenir rechazos en transplantes y también en el tratamiento del cáncer. El papel de la rapamicina y de la inactivación de TOR en la extensión de longevidad ha sido demostrado tanto en organismos simples como en mamíferos. La inactivación de TOR es suficiente para incrementar la longevidad en levaduras, nematodos y moscas al igual que ocurre en roedores tras la pérdida de función de la proteína S6 (en la vía de señalización de TOR) (Selman et al., 2009; Stanfel et al., 2009). Además, el tratamiento con rapamicina incrementa la longevidad media y máxima en ratones y este efecto también se observa cuando los ratones comienzan a ser tratados a edad avanzada (a los 600 días, que correspondería en humanos a 60 años) (Harrison et al., 2009). Estudios llevados a cabo en levaduras y *C.elegans* (Hansen et al., 2008) indican que la proteína TOR es requerida para la extensión de longevidad en RD. Así esta vía de señalización jugaría un papel importante en la respuesta a la falta de nutrientes en RD.

4.4.2. Atenolol

El atenolol es un **β bloqueante con fuerte cardioselectividad por los receptores β -1 adrenérgicos** (que se encuentran mayoritariamente en el corazón) que controla la tasa y la fuerza de contracción cardiaca, reduciendo así la presión sanguínea. Es un fármaco ampliamente utilizado en pacientes con hipertensión, enfermedades coronarias y arritmias (Baek et al., 2008; Berthonneche et al., 2009). La utilización de este fármaco posibilita el bloqueo de la señalización β -adrenérgica en el corazón, lo que resulta sumamente interesante dado que el bloqueo de esta señalización en los

ratones mutantes AC5KO descritos en la sección anterior, produce un incremento de la longevidad.

Los β bloqueantes muestran alta afinidad y especificidad por los receptores β -adrenérgicos (β -AR) e inhiben la actividad simpática en su manifestación β adrenérgica. Se fijan al β -AR pero no activan la adenilato ciclasa, bloqueando los efectos de la adrenalina en los receptores β -AR (Figura 14). Esto reduce los impulsos nerviosos que viajan a través del corazón y en consecuencia, el corazón no tiene que trabajar tan duro porque necesita menos sangre y oxígeno. Así reducen la frecuencia cardíaca, la contractilidad del miocardio y el gasto cardíaco (Meana y García-Sevilla, 2003).

El atenolol, al ser bloqueante selectivo de los receptores β_1 -AR presenta una serie de ventajas:

- ★ Reduce la actividad cardíaca con dosis que no alteran el tono bronquial, vascular o uterino.
- ★ No interfiere en el metabolismo de los hidratos de carbono.
- ★ Mantiene o amplía la eficacia hipotensora al no bloquear la acción vasodilatadora.

Sin embargo, el concepto de cardioselectividad es relativo, porque si las dosis se elevan suficientemente, el fármaco se combina con ambos tipos de receptores β -AR (β_1 y β_2). Aun así, está confirmado que estos fármacos producen en menor grado reacciones de broncoconstricción y que por lo tanto pueden ofrecer ventajas frente a los bloqueantes no selectivos (Meana y García-Sevilla, 2003).

La estimulación β -adrenérgica crónica es perjudicial para el corazón, incrementa la tasa cardíaca, la contractilidad, la presión sanguínea y la mortalidad, además de disminuir la resistencia al estrés oxidativo e incrementar el porcentaje de apoptosis en miocitos (Asai et al., 1999; Engelhardt et al., 1999; Du et al., 2000). Con respecto al envejecimiento, se ha demostrado que la actividad del sistema nervioso simpático, los niveles de los receptores β -AR y la estimulación β -adrenérgica se incrementan durante este proceso y podrían jugar un papel importante en el desarrollo de las cardiomiopatías asociadas a la edad y la acumulación lipídica en el hígado (Lakatta, 1993; Ghosh et al., 2012). Además, existen trabajos que relacionan la activación de la

señalización β -adrenérgica con la producción mitocondrial de ROS. Así, se ha demostrado que la estimulación β -adrenérgica crónica induce la despolarización de la membrana mitocondrial y la apoptosis en cardiomiocitos en la rata adulta (Remondino et al., 2003) e incrementa la producción mitocondrial de ROS en cardiomiocitos de ratón (Andersson et al., 2011). Por estas razones la desensibilización de la señalización β -adrenérgica ha sido propuesta como protectora frente a las cardiomiopatías que se desarrollan con la edad y podrían tener un papel importante frente al estrés oxidativo (Asai et al., 1999). Los β bloqueantes mejoran la supervivencia tras un infarto de miocardio, tienen efectos saludables en pacientes con fallo cardíaco, podrían tener efectos anti-ateroscleróticos y han sido usados durante décadas en humanos sin importantes efectos secundarios que afecten a la calidad de vida (Gottlieb, 1998; Milne y Hong, 2004). Además, estudios en rata han demostrado que el tratamiento con atenolol eleva el contenido en ATP en tejido cardíaco, lo que ha sido propuesto como mecanismo inductor del efecto protector de este fármaco en procesos de isquemia (Ushijima et al., 2013).

Estos estudios junto con el modelo de ratón longevo AC5KO hacen especular que las proteínas en la vía de señalización β -adrenérgica podrían estar implicadas en la longevidad y la resistencia al estrés oxidativo.

OBJETIVOS

Actualmente la teoría que goza de mayor apoyo por parte de la comunidad científica y se ve confirmada por numerosas evidencias procedentes tanto de investigaciones de la Biología Comparada como de la Biología Experimental es la Teoría Mitocondrial de Envejecimiento por Radicales Libres. La Biología Comparada ha demostrado que existen dos factores relacionados con el estrés oxidativo que correlacionan con la longevidad en mamíferos y aves: la intensidad de la producción mitocondrial de ROS y el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares de sus tejidos. Ambos parámetros son bajos en las especies longevas, lo que hace que el daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN mitocondrial se vea reducido, contribuyendo a disminuir su tasa de envejecimiento (Pamplona y Barja, 2011). Por otro lado, la restricción de dieta (RD), que es la manipulación mejor conocida que incrementa la longevidad en la mayoría de los organismos estudiados, reduce la producción mitocondrial de ROS y el daño oxidativo mitocondrial (Gredilla y Barja, 2005). Tras el estudio de diversas intervenciones nutricionales con el fin de encontrar el componente dietético responsable de los efectos beneficiosos de la RD, se ha demostrado que ni la restricción lipídica ni la restricción de carbohidratos afectan al estrés oxidativo lo que concuerda con la ausencia de efecto de estas manipulaciones sobre la longevidad en roedores. En cambio, la restricción proteica y concretamente, la de un solo aminoácido: la metionina restringida al 80%, incrementan la longevidad en roedores y disminuyen la producción mitocondrial de radicales libres y el daño oxidativo (Lopez-Torres y Barja, 2008).

Acerca de las manipulaciones genéticas que incrementan la longevidad, se ha descrito un nuevo modelo basado en la interrupción de la señalización β -adrenérgica mediante el bloqueo de la expresión génica de la adenilato ciclasa tipo 5 (AC5) en ratones (*AC5 Knockout*). Aunque se ha propuesto que el incremento de la longevidad en este modelo podría deberse a la mayor resistencia al estrés oxidativo inducido por la estimulación de la vía de señalización Raf/MEK/ERK, los mecanismos que conducen a estos efectos beneficiosos no se han aclarado (Yan et al., 2007).

Por estas razones, esta tesis tiene como objetivo general profundizar en los mecanismos a través de los cuales la restricción de metionina y el bloqueo de la señalización β -adrenérgica disminuyen la tasa de envejecimiento. Es decir, ¿Actúan

estas intervenciones sobre la modulación de la producción mitocondrial de ROS y/o el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana y así disminuyen la tasa de envejecimiento e incrementan la longevidad máxima?

Aclarar si los dos parámetros conocidos que relacionan el estrés oxidativo con la longevidad: la producción mitocondrial de ROS y el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, pueden verse modificados por estas intervenciones puede resultar sumamente interesante porque podría contribuir a descifrar los mecanismos que subyacen al proceso del envejecimiento.

Los objetivos concretos que esta tesis pretende aclarar son los siguientes:

Capítulo I: Efecto de la restricción de metionina en la dieta sobre el estrés oxidativo mitocondrial

El efecto de la restricción de metionina al 80% ha sido estudiado previamente por nuestro grupo en hígado (Sanz et al., 2006d; Caro et al., 2008) y corazón (Sanz et al., 2006d) y en ambos casos disminuye el estrés oxidativo mitocondrial. Sin embargo, este nivel de restricción de metionina al 80% induce, al igual que ocurre con la restricción de dieta al 40%, efectos negativos como la disminución en la tasa de crecimiento y el tamaño corporal. En cambio, la restricción de metionina al 40% no conlleva estos efectos negativos y sigue disminuyendo la producción mitocondrial de ROS y el daño oxidativo en los órganos en los que ha sido probada: hígado, cerebro y riñón de rata (Caro et al., 2008; Caro et al., 2009a; Sanchez-Roman y Barja, 2013). Sin embargo, se desconoce si estos cambios también ocurren en el corazón de rata, un órgano de gran importancia para el envejecimiento dado su carácter postmitótico y tras un periodo corto de tratamiento, 7 semanas, suficiente para ejercer efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo mitocondrial en otros estudios previos de restricción de dieta (RD) (Gredilla et al., 2001b), de proteínas (RP) (Sanz et al., 2004) y de metionina (RMet) al 80% (Sanz et al., 2006d). Tampoco se ha estudiado si el otro parámetro que relaciona el envejecimiento y el estrés oxidativo, la insaturación de los ácidos grasos de membrana, se ve afectado por dicho tratamiento y si la producción mitocondrial de ROS podría estar siendo modulada por factores como la cantidad de los complejos respiratorios y las proteínas: AIF, por su posible relación con el complejo I, MnSOD

(superóxido dismutasa manganeso), por su papel como antioxidante y la Sirtuina 5 por su localización mitocondrial y su posible implicación en la señalización inducida por falta de nutrientes (Verdin et al., 2010). Además, dado que la metionina es esencial para la síntesis de S-adenosilmetionina, un donador de grupos metilo, es interesante determinar si los cambios de metionina en la dieta tienen efectos sobre el grado de metilación del ADN. Para resolver estas cuestiones planteamos como primer objetivo un estudio de restricción de metionina al 40% a corto plazo en corazón de ratas Wistar.

El OBJETIVO 1 se propone para aclarar si la restricción de metionina al 40% a corto plazo (7 semanas) disminuye la producción mitocondrial de ROS, el daño oxidativo al ADN mitocondrial y a las proteínas mitocondriales, el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, el porcentaje de metilación global del ADN genómico y si, además, modifica la cantidad de complejos respiratorios, la enzima MnSOD, la proteína AIF y la sirtuina 5 en el corazón de rata Wistar.

Recientemente Sun y colaboradores han descrito que la restricción de metionina incrementa la longevidad máxima incluso cuando esta intervención comienza a aplicarse en ratones a edad avanzada (Sun et al., 2009). Sin embargo, en lo que respecta a sus efectos sobre el estrés oxidativo mitocondrial, todos los estudios con restricción de metionina se han llevado a cabo en ratas jóvenes (Sanz et al., 2006d; Caro et al., 2009a; Sanchez-Roman et al., 2013). Por ello, se desconoce si esta intervención puede disminuir la producción mitocondrial de ROS, el estrés oxidativo, y el grado de metilación del ADN en animales de edades avanzadas así como revertir los posibles efectos inducidos por la edad en los animales viejos. También se desconoce si la cantidad de complejos respiratorios y de factores relacionados con la biogénesis mitocondrial, como las proteínas AIF, PGC-1, y TFAM (Factor de transcripción mitocondrial A); con los antioxidantes, como Nrf2 (Factor nuclear respiratorio-2) y MnSOD y con proteínas relacionadas con la extensión de longevidad como la Sirtuina 1 pueden verse modificados por esta intervención aun cuando ésta es llevada a cabo a edades avanzadas. En resumen, el objetivo 2 trata de aclarar si un periodo corto de RMet es suficiente para provocar cambios beneficiosos en animales viejos, con el hígado como órgano objeto de estudio dado que es el órgano más sensible a cambios metabólicos y nutricionales.

El OBJETIVO 2 tiene como finalidad determinar si la restricción de metionina al 40% a corto plazo (7 semanas) disminuye la producción mitocondrial de radicales libres, el daño oxidativo al ADN mitocondrial y a las proteínas mitocondriales en el hígado de rata Wistar cuando la intervención nutricional comienza a edades avanzadas (24 meses) para comprobar si el tratamiento es efectivo disminuyendo el estrés oxidativo cuando se inicia en animales viejos. Además, también se plantea como objetivo estudiar el grado de metilación del ADN genómico, la cantidad de complejos respiratorios y las proteínas AIF, Sirtuina 1, PGC1, TFAM, Nrf2 y MnSOD.

Capítulo II: Modulación del estrés oxidativo mitocondrial mediante el bloqueo de la señalización β adrenérgica

La interrupción de la señalización β -adrenérgica (β -AR) mediante el bloqueo de la expresión génica de la Adenilato Ciclasa tipo 5 (AC5KO) incrementa la longevidad media y máxima en ratones C57BL/6 y protege frente a cardiomiopatías y a la pérdida de masa ósea asociada a la edad, lo que parece estar asociado a la estimulación de la vía de señalización Raf/MEK/ERK (Yan et al., 2007). Sin embargo, se desconocen los mecanismos implicados en la extensión de longevidad de este modelo. Por ello se propone estudiar si los dos factores que relacionan el estrés oxidativo con el envejecimiento, la producción mitocondrial de ROS y el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, así como el subsiguiente daño oxidativo, se modifican por el bloqueo de la señalización β -adrenérgica en el corazón. También es objeto de estudio la cantidad de los complejos respiratorios, por su posible papel sobre la producción mitocondrial de ROS, de la proteína AIF por su relación con el complejo I y de la proteína p-ERK con el fin de corroborar la activación de la vía de señalización Raf/MEK/ERK. El objetivo 3 se plantea para resolver estas cuestiones, siendo el bloqueo de la señalización β -adrenérgica inducido por el fármaco atenolol, que inhibe esta señalización a nivel del receptor β 1-adrenérgico. Este tipo de receptor se localiza de forma mayoritaria en el corazón, al igual que la AC5. Por esta razón y por su carácter postmitótico clave en estudios de envejecimiento, el órgano elegido fue el corazón.

El **OBJETIVO 3** se centra en determinar si el bloqueo de la señalización β -adrenérgica mediante el tratamiento a corto plazo (2 semanas) con el bloqueante del receptor β 1-adrenérgico, atenolol, modifica la producción mitocondrial de radicales libres, el daño oxidativo al ADN mitocondrial y a las proteínas mitocondriales, la insaturación de los ácidos grasos de membrana y la cantidad de complejos respiratorios, de la proteína AIF y de la proteína p-ERK en el corazón de ratón C57BL/6.

Capítulo III: Efectos sinérgicos e independientes del tratamiento conjunto de restricción de metionina en la dieta y bloqueo de la señalización β -adrenérgica sobre el estrés oxidativo mitocondrial

Los resultados obtenidos en el primer objetivo sugieren que la restricción de metionina al 40% disminuye el estrés oxidativo mitocondrial en el corazón de rata mientras que los referentes al tercer objetivo proponen que el tratamiento con atenolol disminuye el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas. Por lo tanto, queda de manifiesto como ambos tratamientos por separado son capaces de modificar los dos factores que relacionan el estrés oxidativo y el envejecimiento. Sin embargo, se desconoce si ambas manipulaciones experimentales, la restricción de metionina y el bloqueo de la señalización β -adrenérgica mediante el tratamiento con atenolol, son capaces de tener efectos aditivos o incluso sinérgicos respecto a la producción mitocondrial de ROS y la insaturación de los ácidos grasos de membrana. Por ello se propone estudiar estos parámetros y las vías de señalización implicadas en su modificación, tras la implementación de ambos tratamientos por separado o conjuntamente durante 7 semanas en el corazón de rata Wistar, dado que es en este órgano donde se han demostrado los efectos de ambos tratamientos por separado. El objetivo 4 trata de aclarar estas cuestiones.

El **OBJETIVO 4** tiene como finalidad determinar si la restricción de metionina (al 40%) en la dieta y el bloqueo de la señalización β -AR mediante el tratamiento con atenolol, implementados por separado o conjuntamente durante 7 semanas, son capaces de disminuir la producción mitocondrial de ROS y el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares (DBI y PI), así como el daño oxidativo molecular subsiguiente y modificar otros parámetros de interés para el estrés

oxidativo como la cantidad de los complejos respiratorios, de la proteína AIF, de la Sirtuina 3, por su posible papel como molécula inductora de los efectos de la RD (Someya et al., 2010) y de la proteína p-ERK en el corazón de rata Wistar.

Los objetivos que se exponen en la presente tesis doctoral contribuirán a esclarecer las vías a través de las cuales actúa la restricción de metionina y el bloqueo de la señalización β -AR en la modulación de la velocidad de envejecimiento de los mamíferos, y a facilitar posibles aumentos futuros de la longevidad máxima humana (con calidad de vida y reduciendo la incidencia de las enfermedades degenerativas) gracias a la aplicación de distintos protocolos dietéticos y farmacológicos.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

EFECTO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA EN LA DIETA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL

- ★ Forty percent methionine restriction lowers DNA methylation, complex I ROS generation, and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins in rat heart. *J Bioenerg Biomembr*, Vol. 43 No.6, pp. 699-708 (2011)
- ★ Effects of aging and methionine restriction applied at old age on ROS generation and oxidative damage in rat liver mitochondria. *Biogerontology*, Vol. 13 No. 4, pp. 399-411 (2012)
- ★ Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: Role of methionine restriction. *Exp Gerontology*, In press.

Forty percent methionine restriction lowers DNA methylation, complex I ROS generation, and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins in rat heart

Ines Sanchez-Roman · Alexia Gomez · Jose Gomez · Henar Suarez · Carlota Sanchez · Alba Naudi · Victoria Ayala · Manuel Portero-Otin · Monica Lopez-Torres · Reinald Pamplona · Gustavo Barja

Received: 22 June 2011 / Accepted: 29 September 2011 / Published online: 18 October 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Methionine dietary restriction (MetR), like dietary restriction (DR), increases rodent maximum longevity. However, the mechanism responsible for the retardation of aging with MetR is still not entirely known. As DR decreases oxidative damage and mitochondrial free radical production, it is plausible to hypothesize that a decrease in oxidative stress is the mechanism for longevity extension with MetR. In the present investigation male Wistar rats were subjected to isocaloric 40% MetR during 7 weeks. It was found that 40% MetR decreases heart mitochondrial ROS production at complex I during forward electron flow, lowers oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins, and decreases the degree of methylation of genomic DNA. No significant changes occurred for mitochondrial oxygen consumption, the amounts of the four respiratory complexes (I to IV), and the mitochondrial protein apoptosis-inducing factor (AIF). These results indicate that methionine can be the dietary factor responsible for the decrease in mitochondrial ROS generation and oxidative stress, and likely for part of the increase in longevity, that takes place during DR. They also highlight some of the mechanisms involved in the generation of these beneficial effects.

Keywords Methionine · Free radicals · Dietary restriction · Oxidative damage · DNA methylation

Introduction

Dietary restriction (DR) is the better described experimental manipulation that extends longevity in animals including mammals. Although the classical consensus proposed that this effect is due to the decreased intake of calories themselves, a role for particular dietary components is becoming apparent. Studies in insects suggest a role for aminoacids (Mair et al. 2005; Min and Tatar 2006; Grandison et al. 2009) and investigations in rodents indicate a role for dietary proteins. Review of the subject shows that in 16 out of 18 long-term survival studies in rats and mice protein restriction increased maximum longevity (Pamplona and Barja 2006) whereas the available studies do not indicate that carbohydrate or lipid restriction change rodent longevity (Iwasaki et al. 1988; Khorakova et al. 1990; Shimokawa et al. 1996). The magnitude of the longevity extension effect of protein restriction in rodents is up to 50% that of DR. Concerning particular amino acids, methionine restriction (MetR) without restriction of calories increases maximum longevity in rats and mice (Richie et al. 1994; Miller et al. 2005; Sun et al. 2009). The beneficial effects of MetR in rodents also include decreases in visceral fat, triglycerides, cholesterol, glucose, insulin and IGF1 (Malloy et al. 2006), slowing of cataract development, protection against age-related changes in immunity (Miller et al. 2005), improvements in colon tight junction barrier function (Ramaligan et al. 2010), enhanced metabolic flexibility (Hasek et al. 2010), and lowering of the incidence of cancer (Komninou et al. 2006). It has been

I. Sanchez-Roman · A. Gomez · J. Gomez · H. Suarez · C. Sanchez · M. Lopez-Torres · G. Barja
Department of Animal Physiology-II, Faculty of Biological Sciences, Complutense University of Madrid (UCM), Madrid, Spain

A. Naudi · V. Ayala · M. Portero-Otin · R. Pamplona (✉)
Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, University of Lleida-IRBLleida,
c/Montserrat Roig-2,
25008 Lleida, Spain
e-mail: reinald.pamplona@mex.udl.cat

also shown that overexpression of methionine sulfoxide reductase increases animal longevity (Chung et al. 2010). On the other hand, excessive intake of dietary methionine has toxic effects including increases in oxidative stress (Park et al. 2008; Yalcinkaya et al. 2009; Song et al. 2009; Gomez et al. 2009).

Concerning the possible mechanisms involved, previous studies have shown that DR in rodents invariably decreases mitochondrial reactive oxygen species (mitROS) generation and oxidative damage to mitochondrial DNA (mtDNA) and proteins (reviewed in Gredilla and Barja 2005). This is interesting since long-lived mammals have lower mitROS production and fatty acid unsaturation than short-lived ones (see Pamplona and Barja 2007 for review). Previous studies have shown that protein but not carbohydrate or lipid restriction also decrease mitROS production and oxidative stress (Lopez-Torres and Barja 2008) and the same occurs in the heart after restriction of a single amino acid, methionine (Sanz et al. 2006). Furthermore, when all the other dietary aminoacids except methionine are restricted the benefits in oxidative stress are no longer present (Caro et al. 2009a). All this suggests that methionine is the dietary factor responsible for the decrease in mitROS generation and oxidative stress in DR. However, the previous studies performed in rat heart (Sanz et al. 2006) were performed at 80% MetR whereas classic DR studies are performed at a level of 40% food restriction. To be able to attribute to dietary methionine the beneficial effects of standard DR (40%) on oxidative stress, the level of implementation of MetR must be also 40%, not 80%. Furthermore, the use of 40% MetR also avoids the decrease in growth rate, maturation, and final body size that occurs in 80% MetR and in 40% DR. Those decreases can complicate the interpretation of the results obtained.

In the present study the effect of 40% MetR during 7 weeks on mitROS generation and oxidative stress is investigated in the heart of male Wistar rats. This time of experimentation was selected since it successfully decreased mitROS production and oxidative stress in previous studies of DR, protein restriction, and 80% MetR. The heart was selected because it is a vital tissue and is mainly composed of postmitotic cells, making it ideal for aging-related studies. Measurements include various markers of oxidative damage in mitochondria since many MetR studies of this kind have focused in whole organs instead of in mitochondria (Sanz et al. 2006; Naudi et al. 2007; Caro et al. 2008). The parameters measured include mitochondrial oxygen consumption in both resting (state 4) and phosphorylating state (state 3), the rate of mitROS production and location of the free radical source, oxidative damage to mitochondrial DNA (8-oxodG; 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine), and five markers of oxidative, glyco-oxidative, and lipoxidative damage to proteins measured by gas chromatography/mass spectrometry techniques. Since

fatty acid unsaturation is negatively correlated with animal longevity (Pamplona and Barja 2007) and the degree of protein lipoxidation is secondarily influenced by the sensitivity of the membranes to lipid peroxidation, which strongly depends on their fatty acid unsaturation degree, the full fatty acid composition of heart lipids was also measured. The amounts of respiratory complexes I-IV were measured because they can modify the total electron flow in the respiratory chain and the total number of ROS generation sites, and therefore they can potentially affect the rates of mitROS generation. The amount of the mitochondrial enzyme MnSOD which scavenges superoxide anion was also measure to ascertain to what extent changes in mitochondrial superoxide radical release are due to modifications in the rate of superoxide radical production or elimination. The apoptosis-inducing factor was studied because it is considered a two-edged sword (Porter and Urbano 2006). It can stimulate apoptosis, but it is also required for the assembly/maintenance of complex I, the respiratory complex where mitROS generation is lowered in long-lived animals and in DR and MetR (Barja 2004; López-Torres and Barja 2008). Since sirtuins are considered important proteins in relation to longevity (Imai and Guarente 2010), the amount of the mitochondrial sirtuin SIRT5 was also measured. Finally, since dietary methionine is essential for synthesis of S-adenosylmethionine that provides methyl groups required for DNA methylation, an important mechanism of modification of gene expression, the global methylation of heart genomic DNA was also measured.

Materials and methods

Animals and diets

Male Wistar rats of 250–300 g of body weight were caged individually and maintained in a 12:12 (light-dark) cycle, 22 °C±2 °C and 50%±10% relative humidity. Semipurified diets prepared by MP biochemicals (Irvine, CA) and imported to Spain by Leti (Barcelona, Spain) were used. The detailed composition of the diet is shown in Table 1. The composition of the 40% MetR diet was similar to that of the control diet except that L-methionine was present at 0.516%, which corresponds to an amount of this amino acid 40% lower than in the control diet (0.86%). The 0.34% absolute decrease in L-methionine in the 40% MetR diet was compensated by increasing all the other dietary components in proportion to their presence in the diet. Since the % absolute decrease in L-methionine was small, with this procedure the % presence of all the other dietary components was almost the same in the two experimental diets. After 7 weeks of dietary treatment the animals were

Table 1 Detailed composition of the semi purified diets used in this study (control and 40% methionine restricted)

Component	Control (g/100 g)	40%MetR (g/100 g)
L-Arginine	1.12	1.124
L-Lysine	1.44	1.445
L-Histidine	0.33	0.331
L-Leucine	1.11	1.114
L-Isoleucine	0.82	0.823
L-Valine	0.82	0.823
L-Threonine	0.82	0.823
L-Tryptophan	0.18	0.181
L-Methionine	0.86	0.516
L-Glutamic acid	2.70	2.709
L-Phenylalanine	1.16	1.164
L-Glycine	2.33	2.338
Dextrine	5	5.017
Corn starch	31.80	31.92
Sucrose	31.79	31.92
Cellulose	5	5.017
Choline bitartrate	0.2	0.201
MP Vitamin diet fortification mixture	1.02	1.023
Mineral mix (AIN)	3.5	3.512
Corn oil	8	8.028
Total (% weight)	100	100

sacrificed by decapitation. The heart was then processed to isolate mitochondria, which were immediately used to measure mitochondrial respiration and H₂O₂ generation, and mitochondrial and heart samples were stored at -80 °C for the assay of the rest of the biochemical parameters.

Heart mitochondria isolation

Heart mitochondria were obtained from fresh tissue by the procedure of Mela and Seitz (1979) with modifications. The heart was chopped into small pieces and was homogenized with a loose-fitting glass-glass pestle in 10 ml of isolation buffer (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) containing 5 mg of subtilisin A and 25 mg of fatty acid-free albumin. After the sample stood for 1 min, 25 ml of additional isolation buffer containing 25 mg of albumin were added, and gentle homogenization was performed again with a tighter fitting pestle. The nuclei and cell debris were removed by centrifugation at 700×g for 10 min. Supernatants were centrifuged at 8,000×g for 10 min and the resulting supernatants were eliminated. The pellets were resuspended in 25 ml of isolation buffer and centrifuged at 8,000×g for 10 min. The mitochondrial pellets were resuspended in 1 ml of isolation buffer. All the above procedures were

performed at 4 °C. Mitochondrial protein was measured by the Biuret method. The final mitochondrial suspensions were maintained at high concentration of mitochondrial protein over ice and were immediately used for the oxygen consumption and H₂O₂ production measurements during the next two hours.

Mitochondrial H₂O₂ generation

The rate of mitochondrial ROS production (O₂⁻ + H₂O₂) was assayed by measuring the increase in fluorescence as a function of time (excitation at 312 nm, emission at 420 nm) due to oxidation of homovanillic acid by H₂O₂ in the presence of horseradish peroxidase, essentially as described (Barja 2002; Sanz and Barja 2006). Reaction conditions were 0.25 mg of mitochondrial protein per ml, 6 U/ml of horseradish peroxidase, 0.1 mM homovanillic acid, 50 U/ml of superoxide dismutase, and 2.5 mM pyruvate/2.5 mM malate, or 5 mM succinate as substrates in the presence or absence of 2 μM rotenone or 2 μM antimycin A in the incubation buffer (145 mM KCl, 30 mM Hepes, 5 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 0.1% albumin, pH 7.4) at 37 °C, in a total volume of 1.5 ml. Duplicated samples were incubated for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by transferring the samples to a cold bath and adding 0.5 ml of stop solution (2.0 M glycine, 2.2 M NaOH, 50 mM EDTA, pH 12), and the fluorescence was read in a LS50B Perkin-Elmer fluorometer. Known amounts of H₂O₂ generated in parallel by glucose oxidase with glucose as substrate were used as standards. Since the superoxide dismutase added in excess converts all O₂⁻ excreted by mitochondria (if any) to H₂O₂, the measurements represent the total (O₂⁻ plus H₂O₂) rate of mitochondrial ROS production.

Mitochondrial oxygen consumption

The rate of oxygen consumption of heart mitochondria was measured at 37 °C in a water-thermostated incubation chamber with a computer-controlled Clark-type O₂ electrode (Oxygraph, Hansatech, UK) in 0.5 ml of incubation buffer (145 mM KCl, 30 mM Hepes, 5 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 0.1% albumin, pH 7.4). The substrates used were complex I-linked (2.5 mM pyruvate/2.5 mM malate) or complex II-linked (5 mM succinate + rotenone). The assays were performed in the absence (State 4-resting) and in the presence (State 3-phosphorylating) of 500 μM ADP.

DNA analyses

For the measurement of oxidative damage to mtDNA, isolation of mtDNA was performed by the method of

Latorre et al. (1986) adapted to mammals (Asunción et al. 1996). The isolated mitochondrial DNA was digested to deoxynucleoside level by incubation at 37 °C with 5 U of nuclease P1 (in 20 µl of 20 mM sodium acetate, 10 mM ZnCl₂, 15% glycerol, pH 4.8) for 30 min and 1 U of alkaline phosphatase (in 20 µL of 1 M Tris-HCl, pH 8.0) for 1 h. All aqueous solutions used for mtDNA isolation, digestion and chromatographic separation were prepared in HPLC-grade water. Steady-state oxidative damage to mtDNA was estimated by measuring the level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) referred to that of the non-oxidized base (deoxyguanosine, dG). 8-oxodG and dG were analyzed by HPLC with on line electrochemical and ultraviolet detection respectively. The nucleoside mixture was injected into a reverse-phase Mediterranean Sea 18 column (5 µm, 4.6 mm×25 cm; Teknokroma, Barcelona, Spain), and was eluted with a mobile phase containing 6.5% acetonitrile and 50 mM phosphate buffer pH 5.0. The volume of sample injected in the column was 100 µl. A Gilson 305 pump with nanometric module 805 at 0.9 ml/min was used. 8-oxodG was detected with an ESA Coulochem II electrochemical coulometric detector (ESA, Inc. Bedford, MA) with a 5011A analytical cell run in the oxidative mode (350 mV/20 nA), and dG was detected with a Biorad model 1806 UV detector at 254 nm. For quantification, peak areas of dG standards and of three level calibration pure 8-oxodG standards (Sigma) were analyzed during each HPLC run. Comparison of areas of 8-oxodG standards injected with and without simultaneous injection of dG standards ensured that no oxidation of dG occurred during the chromatography.

For the measurement of genomic DNA methylation, genomic DNA was isolated with the GenElute Mammalian Genomic DNA miniprep Kit (G1N70 Sigma). The degree of methylation of this genomic DNA was quantified with a Methylamp Global DNA Methylation Quantification Kit (P-1014 Epigentek). In this assay, the methylated fraction of DNA (expressed as % of the total genomic DNA) is recognized by a 5-methylcytosine antibody and quantified through an ELISA-like reaction.

Mitochondrial complexes (I, II, III and IV), AIF, MnSOD and SIRT5

The protein contents of heart mitochondrial respiratory chain complexes, AIF, MnSOD and SIRT5 were estimated using western blot analyses. Mitochondrial protein concentration was measured using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay 500-0006) and mitochondrial proteins were separated by one-dimensional SDS-PAGE. The protease inhibitor mix (80-6501-23, Amersham Biosciences) was added to the samples. The samples were mixed with sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 20% 2-β-mercaptoethanol and 0.02% bromophenol blue)

and were heated for 5 min at 95 °C. Proteins (10 µg for respiratory chain complexes, AIF and MnSOD; and 70 µg for SIRT5) were subjected to electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide minigels. For immunodetection, proteins were transferred using a Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad) in a buffer containing 25 mM Tris, 192 mM Glycine and 20% methanol, to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P Millipore, Bedford, MA). The membranes were immersed in blocking solution (0.2% I-Block Tropix AI300, 0.1% Tween in PBS) for 1 h at room temperature. After blocking, the membrane was washed two times using 0.05% TBS-T buffer. Afterwards, the membrane was incubated in primary solution using specific antibodies for the 39 kDa (NDUFA9) and 30 kDa (NDUFS3) subunit of complex I (1:1000 in both cases), 70 kDa subunit (Flavoprotein) of complex II (1:500), 48.5 kDa (CORE 2) and 29.6 kDa (Rieske iron-sulfur protein) subunits of complex III (1:1000 in both cases), and COXI subunit of complex IV with apparent molecular weight of 57 kDa (1:1000) (ref. A21344, A21343, A11142, A11143, A21346 and A6403, respectively; Molecular Probes), anti-AIF (1:1000, ref. A7549, Sigma), anti-MnSOD and anti-SIRT5 (1:2000 and 1:500, respectively, ref. ab16956 and ab13697, Abcam). An antibody to porin (1:15000, ref. A31855, Molecular Probes) was also used in order to determine the proportion of protein levels referred to total mitochondrial mass. The primary antibody was incubated 1 h at room temperature, except in the case of MnSOD and SIRT5 which were incubated 16 h at 4 °C. The membrane was washed three times in 0.05% TBS-T buffer and was incubated 1 h at room temperature with the appropriate secondary antibodies: ECL Anti-mouse IgG, horseradish peroxidase linked whole antibody (1:5000; ref. NA93IV, GE Healthcare), and ImmunoPure Goat Anti-Rabbit IgG, (H + L), peroxidase conjugated (1:10000; ref. 31460, Pierce Biotechnology). After five washes with 0.05% TBS-T buffer, bands were visualized by using an enhanced chemiluminescence HRP substrate (Millipore, MA, USA). Signal quantification and recording was performed with a ChemiDoc equipment (Bio-Rad Laboratories, Inc., Barcelona, Spain).

Oxidation-derived protein damage markers

Markers of protein oxidation – the protein carbonyl glutamic (GSA) and amino adipic (AASA) semialdehydes-, glycoxidation (carboxyethyl lysine [CEL] and carboxymethyl lysine [CML]), and lipoxidation (malondialdehyde lysine [MDAL] and CML) were determined as trifluoroacetic acid methyl esters derivatives in acid hydrolyzed delipidated and reduced heart mitochondrial protein samples by GC/MS (Pamplona et al. 1999) using a HP6890 Series II gas chromatograph (Agilent, Barcelona, Spain)

with a MSD5973A Series and a 7683 Series automatic injector, a Rtx-5MS Restek column (30-m×0.25-mm×0.25-µm), and the described temperature program (Pamplona et al. 1999). Quantification was performed by internal and external standardization using standard curves constructed from mixtures of deuterated and non-deuterated standards. Analyses were carried out by selected ion-monitoring GC/MS (SIM-GC/MS). The ions used were: lysine and [²H₈]lysine, *m/z* 180 and 187, respectively; 5-hydroxy-2-aminovaleric acid and [²H₅]5-hydroxy-2-aminovaleric acid (stable derivatives of GSA), *m/z* 280 and 285, respectively; 6-hydroxy-2-aminocaproic acid and [²H₄]6-hydroxy-2-aminocaproic acid (stable derivatives of AASA), *m/z* 294 and 298, respectively; CML and [²H₄]CML, *m/z* 392 and 396, respectively; CEL and [²H₄]CEL, *m/z* 379 and 383, respectively; and MDAL and [²H₈]MDAL, *m/z* 474 and 482, respectively. The amounts of product were expressed as the µmolar ratio of GSA, AASA, CML, CEL or MDAL per mol of lysine.

Fatty acid analyses and global fatty acid unsaturation indexes

Fatty acid groups of mitochondrial heart lipids were analyzed as methyl esters derivatives by GC/MS as previously described (Pamplona et al. 1999). Separation was performed by a DB-WAX capillary column (30 m×0.25 mm×0.20 µm) in a GC System 7890A with a Series Injector 7683B and a FID detector (Agilent Technologies, Barcelona, Spain). Identification of fatty acid methyl esters was made by comparison with authentic standards (Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden). Results are expressed as mol%. The following fatty acid indexes were calculated: saturated fatty acids (SFA); unsaturated fatty acids (UFA); monounsaturated fatty acids (MUFA); polyunsaturated fatty acids from n-3 and n-6 series (PUFAn-3 and PUFAn-6); average chain length (ACL)=[(Σ%Total₁₄ × 14) + (Σ%Total₁₆ × 16) + (Σ%Total₁₈ × 18) + (Σ%Total₂₀ × 20) + (Σ%Total₂₂ × 22) + (Σ%Total₂₄ × 24)]/100]; double bond index (DBI)=[(1 × Σmol% monoenoic) + (2 × Σmol% dienoic) + (3 × Σmol% trienoic) + (4 × Σmol% tetraenoic) + (5 × Σmol% pentaenoic) + (6 × Σmol% hexaenoic)]; and peroxidizability index (PI)=[(0.025 × Σmol% monoenoic) + (1 × Σmol% dienoic) + (2 × Σmol% trienoic) + (4 × Σmol% tetraenoic) + (6 × Σmol% pentaenoic) + (8 × Σmol% hexaenoic)].

Statistics

Values were expressed as means ± standard error of the mean (SEM). Comparisons between control and MetR groups were analyzed by Student t-tests. The minimum level of statistical significance was set at *P*<0.05 in all the analyses.

Results

The mean body weight of the animals did not show significant differences between the two experimental groups at the start of the experiment (234±2.65 g in the control and 232±2.40 g in the MetR group) and no significant differences in body weight were observed after the 7 weeks of treatment (363±8.28 g in controls and 370±4.78 g in MetR). The weight of liver, heart, spleen, kidney, or brain and the food intake was not significantly modified by dietary treatment (results not shown).

The rate of oxygen consumption from heart mitochondria was measured in the absence (state 4) and in the presence (state 3) of 500 µM ADP, with complex I-linked (pyruvate/malate) and complex II-linked (succinate + rotenone) substrates (Table 2). MetR significantly increased state 4 oxygen consumption with succinate + rotenone but not with pyruvate/malate, whereas state 3 values did not change with any substrate.

The mitochondrial rate of ROS production was significantly decreased by MetR in heart mitochondria respiring with pyruvate/malate + rotenone (Table 3). However, when complex II-linked substrate (succinate) was used, no significant differences were observed between dietary groups either with succinate alone, with succinate + rotenone or with succinate + antimycin A.

Oxidative damage to mtDNA was estimated by measuring the marker 8-oxodG. The steady-state level of 8-oxodG in rat heart mtDNA was significantly decreased by MetR (Fig. 1). MetR also significantly decreased the global methylation of genomic DNA in the rat heart (Fig. 2).

Three general kinds of oxidative modification of rat heart mitochondrial proteins were measured, oxidative (the specific protein carbonyls GSA and AASA), glycooxidative (CEL and CML) and lipoxidative (CML and MDAL) markers (Fig. 3). All these five markers were significantly decreased by MetR. The marker showing the strongest

Table 2 Rates of oxygen consumption of heart mitochondria from control and 40% methionine restricted (MetR) rats

	Control	MetR
Pyruvate/malate (State 4)	57.5±4.9	46.3±3.0
Pyruvate/malate (State 3)	223.2±23.1	213.7±13.0
Pyruvate/malate (RCI)	4.1±0.3	4.7±0.2
Succinate + rotenone (State 4)	111.6±6.8	133.7±6.5 *
Succinate + rotenone (State3)	297.2±16.1	317.0±17.8
Succinate + rotenone (RCI)	2.5±0.1	2.3±0.1

Values are means ± SEM (nmoles of O₂/ min. mg protein) from 6–7 different animals. State 4: oxygen consumption in the absence of ADP. State 3: oxygen consumption in the presence of 500 µM ADP. RCI: Respiratory control index.**P*<0.05 Significant differences between Control and MetR rats

Table 3 Rates of reactive oxygen species (ROS) production of heart mitochondria from control and 40% methionine restricted (MetR) rats

	Control	MetR
Pyruvate/malate + rotenone	3.56±0.19	3.03±0.14*
Succinate	0.38±0.05	0.40±0.05
Succinate + rotenone	0.42±0.04	0.45±0.04
Succinate + antimycin A	5.37±0.27	5.72±0.21

Values are means ± SEM (nmoles of H₂O₂/min · mg protein) from 5–7 different animals. **P*<0.05 Significant differences between Control and MetR rats

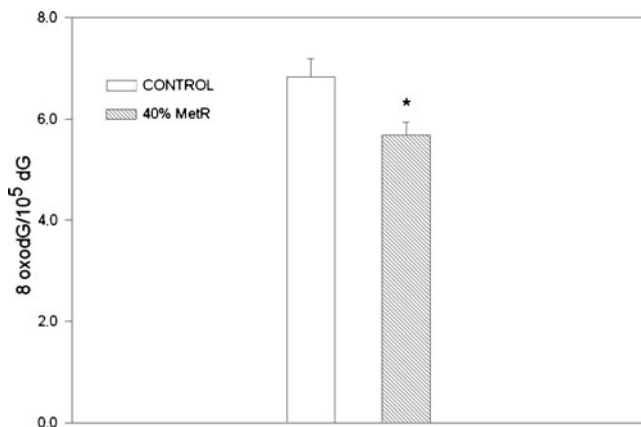
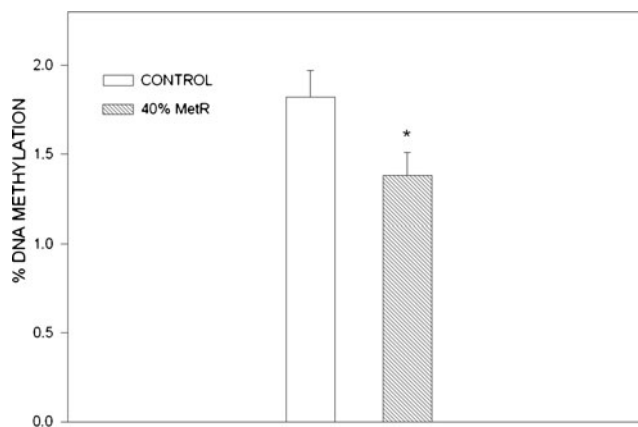
decrease after MetR was MDAL (58% decrease) whereas the other four markers showed 19–35% decreases.

Methionine restriction did not change the amounts of the peptides of heart mitochondrial respiratory complex I peptides (NDUFA9 and NDUFS3), complex II (flavoprotein), complex III (CORE II and Rieske iron-sulfur protein) and complex IV (COX I) (Table 4). The amounts of MnSOD, SIRT5 and AIF were not significantly changed by MetR either (Table 4).

Table 5 shows the full fatty acid composition of heart fatty acids in control and MetR rats. MetR significantly decreased 18:0 and 22:5n-3 and increased 16:1n-7. No significant differences in acyl chain length, general types of fatty acids (SFA, UFA, MUFA or PUFA), and global unsaturation indexes (DBI and PI) were observed between control and MetR rats.

Discussion

In this investigation it is shown for the first time that 7 weeks of 40% MetR significantly lowers mitROS production at complex I during forward electron flow, oxidative damage to mitochondrial DNA, oxidation, glycoxidation and lipoxidation

**Fig. 1** Oxidative damage in heart mitochondrial DNA from control and 40% methionine restricted rats. Values are means ± SEM from 5 different animals. Asterisks represent significant differences between control and MetR rats (*) *P*<0.05**Fig. 2** Genomic DNA methylation in heart from control and 40% methionine restricted rats. Values are means ± SEM from 8 different animals. Asterisks represent significant differences between control and MetR rats (*) *P*<0.05

of mitochondrial proteins as well as the methylation level of genomic DNA in the rat heart.

Previous studies have shown that the rate of mitROS generation is lowered at complex I both in long-lived species and in rodents subjected to 40% DR (Barja 2004; Gredilla and Barja 2005) as well as in 80% Mtr in rat heart (Sanz et al. 2006). In this investigation it is shown that 40% MetR is enough to decrease mitROS production in rat heart. Therefore, MetR can be responsible for the decrease in mitROS production and ensuing oxidative damage that occurs in the heart of rats subjected to (40%) DR which can be involved in their longevity extension. The decrease in mitROS generation after 40% MetR observed in our study

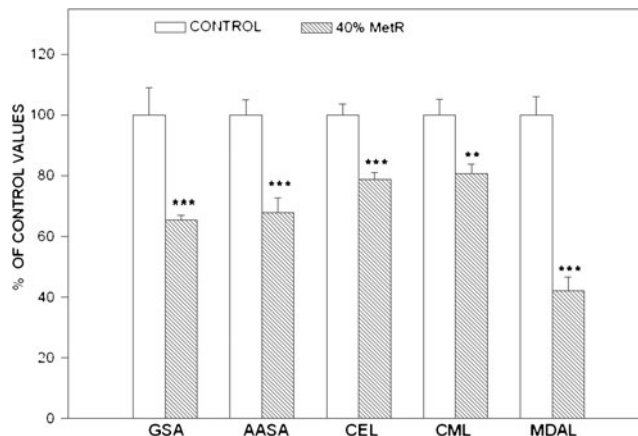
**Fig. 3** Protein oxidation, glycoxidation and lipoxidation markers in heart mitochondria from control and 40% methionine restricted rats. Values are means ± SEM from 7 different animals and are expressed as percentage of those in the controls for each parameter. Control values: 5,496.01±493.55 (glutamic semialdehyde, GSA); 216.96±10.74 (AASA, amino adipic semialdehyde, AASA); 675.19±24.54 (carboxyethyl-lysine, CEL); 1,932.61±99.90 (carboxymethyl-lysine, CML); 581.20±35.52 (malondialdehyde-lysine, MDAL). Units: μmol/mol lysine. Asterisks represent significant differences between control and MetR rats: ***P*<0.01, ****P*<0.001

Table 4 Amounts of respiratory chain complexes, SODMn, SIRT5 and AIF in heart mitochondria from control and 40% methionine restricted (MetR) rats

	Control	MetR
Complex I (39 KDa subunit, NDUFA9)	100±5.01	100.58±5.73
Complex I (30 KDa subunit, NDUF3)	100±15.47	117.56±12.88
Complex II (70 KDa subunit, Flavoprotein)	100±5.83	111.09±4.31
Complex III (48.5 KDa, CORE II)	100±4.70	110.21±5.62
Complex III (29.6 KDa subunit, Rieske iron–sulfur protein)	100±3.29	113.16±13.67
Complex IV (57 KDa subunit, COX I)	100±17.40	115.33±21.34
MnSOD	100±9.34	127.32±12.64
SIRT5	100±7.42	80.12±5.31
AIF	100±3.27	95.89±4.77

Values are means±SEM from 6–7 different animals. Units: Ratio complex I, II, III, IV, MnSOD, SIRT5, and AIF/porin in Arbitrary Units (AUs). Abbreviations: MnSOD, manganese superoxide dismutase, AIF, Apoptosis-inducing factor

took place exclusively at complex I since it occurred only with pyruvate/malate + rotenone, a condition in which the free radical source is confined to complex I. This conclusion is also consistent with the lack of significant changes in mitROS generation in the different assays performed with succinate (a complex II-linked substrate). The lack of changes with succinate alone indicates that the decrease in mitROS production does not occur during reverse electron flow from complex II to complex I. Instead, it must occur at a free radical generation site working during forward electron flow and located within complex I between the one receiving electrons from NADH and the rotenone inhibition site. This kind of result is consistent with a previous study in other rat tissues (Caro et al. 2009b).

Concerning the mechanism responsible for the decrease in mitROS production, a general decrease in electron flow is not involved since mitochondrial oxygen consumption only showed changes with succinate + rotenone, a situation in which electrons cannot flow back to complex I, but did not change with pyruvate/malate. Another possibility would be a decrease in the total amount of complex I which would decrease the total amount of superoxide radical generation. However, neither of the two subunits of complex I studied (the 39 and 30 KDa subunits NDUFA9 and NDUF3) showed changes in their amount, and the same was true for the subunits measured from the other complexes (complex II, III and IV). Therefore, qualitative rather than quantitative changes in complex I seem to be involved in the decrease in mitROS generation in 40% MetR. As previously suggested for DR models (Gredilla et al. 2001) this qualitative change can be due to a decrease in the steady-state degree of electronic reduction of the complex I

Table 5 Fatty acid composition (mol %) of total heart lipids from control and methionine restricted (MetR) rats

	Control	MetR
14:0	1.17±0.03	1.24±0.14
16:0	22.68±0.60	24.06±1.14
16:1n-7	0.91±0.04	1.12±0.07*
18:0	26.49±0.34	24.94±0.11***
18:1n-9	13.23±0.39	13.43±0.21
18:2n-6	9.27±0.42	10.34±0.63
18:3n-3	0.38±0.01	0.42±0.02
18:4n-6	0.11±0.01	0.11±0.01
20:0	0.20±0.01	0.19±0.01
20:1n-9	0.19±0.02	0.20±0.02
20:2n-6	0.97±0.14	0.96±0.04
20:3n-6	0.79±0.06	0.78±0.04
20:4n-6	15.69±0.45	15.09±0.77
20:5n-3	0.15±0.01	0.10±0.01
22:0	0.21±0.02	0.16±0.01
22:4n-6	0.73±0.06	0.69±0.06
22:5n-6	1.40±0.22	1.14±0.06
22:5n-3	0.84±0.04	0.71±0.04*
22:6n-3	4.28±0.26	4.07±0.37
24:0	0.25±0.04	0.19±0.01
ACL	18.15±0.03	18.07±0.06
SFA	51.02±0.71	50.80±1.24
UFA	48.97±0.71	49.19±1.24
MUFA	14.34±0.44	14.76±0.26
PUFA	34.63±0.94	34.43±1.45
PUFAn-6	28.97±0.92	29.12±1.13
PUFAn-3	5.66±0.25	5.31±0.33
DBI	142.16±3.51	138.8±5.74
PI	127.71±4.16	122.01±6.47

Values are means ± SEM from 8 different animals. For abbreviations see the “Materials and methods” section. Asterisks describe significant differences between Control and MetR rats: **P*<0.05; ****P*<0.001

generator which would decrease its tendency to univalently reduce oxygen to the superoxide radical. On the other hand, we observed that the amount of the superoxide dismutase mitochondrial form (MnSOD), the enzyme that scavenges superoxide radical, is not changed by 40% MetR in the rat heart. This is consistent with the idea that the decrease in superoxide radical release from the mitochondria observed in this investigation is due to a true decrease in superoxide radical production and not to an increase in its elimination by MnSOD.

Concerning the cellular mechanism responsible for the qualitative change leading to mitochondria with a lower rate of mitROS generation in MetR, a logical possibility is that changes in DNA methylation are involved. Many

microarray studies have shown that the longevity extension induced by dietary restriction in rodents is dependent on medium- or long-term changes in gene expression (Park and Prolla 2005). This has not been extensively studied in MetR, although a recent study found changes in various messenger RNAs and some protein signaling molecules in the liver of mice subjected to this dietary manipulation (Sun et al. 2009). Dietary methionine is essential for synthesis of S-adenosylmethionine that provides methyl groups required for DNA methylation, an important mechanism of gene expression modification. In fact, we have recently showed that lower levels of methionine supplementation in the diet lead to a lower concentration of S-adenosylmethionine (SAM) in the heart of Wistar rats (Gomez et al. 2009). Therefore, a lower level of global methylation of heart genomic DNA was expected in MetR as it was found indeed in this investigation. Thus, it is possible that the qualitative change leading to a lower mitROS production in DR is secondary to changes in gene expression induced by the decrease in DNA methylation observed in the heart genomic DNA, although this does not eliminate the possible additional involvement of other molecular mechanisms.

Another pro-longevity mechanism seems to involve sirtuin proteins. Classic studies in invertebrate models have related the sirtuin SIR2 to longevity. In mammals, seven sirtuins (SIRT1–7) have been described (Nagakawa et al. 2009; Verdin et al. 2010) and they are emerging as important proteins in aging, stress resistance and metabolic regulation. Three mammalian sirtuins, SIRT 3, 4 and 5 are located within the mitochondrial matrix and SIRT3 and SIRT5 are NAD(+)-dependent acetylases that remove acetyl groups from acetyllysine-modified proteins. Recent findings reveal that a large fraction of mitochondrial proteins are acetylated and that mitochondrial protein acetylation is modulated by nutritional status. Among mitochondrial sirtuins, recent studies have highlighted a role for SIRT3 in DR. It has been found that DR decrease oxidative DNA damage in mice tissues and prevents age-related hearing loss, but these changes do not occur in SIRT3-lacking mice (Someya et al. 2010). In that study it is proposed that in response to DR SIRT3 directly deacetylates and activates isocitrate dehydrogenase 2, leading to increased NADPH and increased reduced-to-oxidized glutathione ratio in mitochondria which would decrease mitochondrial oxidative stress and could be partially responsible for protection against age-related changes. To our knowledge this is the study better relating the action of a sirtuin to DR and oxidative stress. In our study, we measured the amount of SIRT5 in order to clarify if it could be involved in the life-extending MetR paradigm, which to our knowledge has never been previously studied. Our results show that the amount of SIRT5 is not modified by MetR in the rat heart. Therefore, SIRT5 does not seem to be

involved in the decreases in mitochondrial ROS generation and oxidative damage observed in this investigation. This would be consistent with a role for SIRT5 during DR different from oxidative stress modulation. It has been observed that SIRT5 deacetylates carbamoyl phosphate synthase 1, the rate limiting enzyme for urea synthesis in the urea cycle, increasing its activity (Huang et al. 2010). The regulation of this enzyme by SIRT5 supports a role for SIRT5 under conditions that require ammonia removal such as fasting, and DR. Under these conditions, SIRT5 is increased, resulting in deacetylation of carbamoyl phosphate synthase 1, increased activity of this enzyme, and subsequent conversion of ammonia into carbamoyl phosphate, to be excreted as urea. Therefore, the known role of SIRT5 seems to be rather related to modifications in catabolic flux. Although SIRT5 is likely to target other different mitochondrial substrates, our results do not support the idea that it is involved in the decreases in mitochondrial oxidative stress in MetR (and DR), although further studies are clearly needed before discarding that possibility.

Among possible mechanisms of aging, apoptosis can potentially decrease the number of cells leading to decrements in tissue functionality. This would be especially deleterious in organs like the heart almost exclusively composed of postmitotic cells if apoptosis occurs to a relevant extent in non-dividing cells. The lack of replacement of cells lost by apoptosis would be limiting during aging. In the present study we measured the amount of AIF. A recent investigation has found age-related increases in cytosolic AIF together with other apoptosis-related factors in rat heart which are associated with mitochondrial dysfunction (Ljubcic et al. 2010). AIF however, in addition to apoptotic functions, is also required for mitochondrial oxidative phosphorylation (Porter and Urbano 2006). AIF is a mitochondrial flavoprotein involved in the assembly/maintenance of complex I. Therefore, it has been considered a double edged sword having both life and death functions in cells (Porter and Urbano 2006). Our results show that the amount of AIF was not changed by 40% MetR in rat heart which is consistent with the lack of differences in the amount of complex I. In previous studies we have observed simultaneous decreases in the amounts of AIF and complex I in MetR in rat liver and brain (Caro et al. 2008, 2009b) whereas in the case of kidney (Caro et al. 2009b) no significant changes in AIF were found. All these data, taken together, indicate that the changes in AIF in MetR are tissue specific. In any case our AIF results do not suggest that changes in apoptosis are involved in the beneficial effects of 40% MetR in rat heart.

The decrease in the rate of mitROS production in the heart of MetR rats was accompanied by beneficial decreases in oxidative damage to important macromolecules. First,

oxidative damage to mtDNA was decreased by 40% MetR. Previous studies had found decreases in mitROS production and 8-oxodG in mtDNA in 80% MetR in rat heart (Sanz et al. 2006). The results obtained here show that 40% restriction of dietary methionine is enough to lower steady-state oxidative damage to mtDNA. This is important since standard DR is usually performed at 40% restriction of food intake. Previous investigations have shown that the lowering of mitROS production induced by 40% DR (Gredilla et al. 2001; Lopez-Torres et al. 2002) and by 40% protein restriction (Sanz et al. 2004) is always accompanied by decreases in the level of 8-oxodG in mtDNA in rat tissues. All these results, together with previous ones (Sanz et al. 2004; Caro et al. 2009a) are consistent with the hypothesis that the decreased ingestion of methionine is responsible for the decrease in mitROS generation and oxidative damage to mtDNA that occurs during (40%) DR and protein restriction. Since ROS can produce DNA single- and double-strand breaks in addition to oxidizing the bases, MetR could contribute to extend lifespan by helping to decrease the formation of mtDNA mutations that occur during rodent and human aging (Barja 2004; Khrapko and Vijg 2007). In addition to lowering 8-oxodG, in our study a global decrease in oxidative, lipoxidative, and glycoxidative damage to heart mitochondrial proteins was also found. The stronger decrement observed was that of the lipoxidation marker MDAL (58% decrease) whereas the other protein modification markers showed 19%–35% decreases. This higher sensitivity of MDAL compared to the other four protein modification markers has been also observed in various previous studies of DR and MetR, possibly indicating the prominent role of the decrease in MDA-related lipid peroxidation pathways in these anti-aging models. On the other hand, the decrease in the two lipoperoxidation-related markers CML and MDAL was not due to decreases in the degree of unsaturation and thus in the sensitivity to oxidative damage of heart mitochondrial fatty acids, because neither the total number of double bonds (DBI) nor the PI were changed by 40% MetR. Instead, the lower mitROS production of MetR animals seems to directly decrease protein oxidation (lower GSA and AASA) and to also lower glycoxidation and lipoxidation processes finally contributing to a decrease glycoxidative (lower CEL and CML) and lipoxidative (lower CML and MDAL) modification of rat heart mitochondrial proteins.

Finally, it is known that two traits correlate with maximum longevity across animal species. Long-lived mammals and birds have a low rate of mitROS production and a low degree of fatty acid unsaturation (low DBI), which lower their oxidative stress (Pamplona and Barja 2007). In many previous investigations (40%) DR, a longevity-extending manipulation, lowered mitROS production without changing tissue DBI. We have found that 80% MetR decreases rat

heart DBI (Sanz et al. 2006), but when we applied MetR at 40% in the present investigation no changes in this parameter were observed. This kind of result has been also observed in other rat organs (Caro et al. 2008, 2009b). Therefore, the lack of change in DBI at 40%MetR fits well with the lack of effect of (40%) DR on the global degree of fatty acid unsaturation. Decreases in DBI in MetR are limited to 80% MetR, a dietary modification not occurring in (40%) DR. Therefore, among the two main oxidative stress-related traits of long-lived animals, only a low rate of mitROS production (and not a low degree of fatty acid unsaturation) seems to be involved in the life extension effect of MetR and DR.

Acknowledgements This investigation was supported in part by I + D grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2008-00335/BFI) and a UCM/BSCCH Grant in 2010 to G. Barja; and I + D grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2009-118/79BFI), and the Generalitat of Catalonia (2009SGR735) to R. Pamplona. I. Sanchez received a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education (FPU) and A. Gomez received a fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation (FPI). We thank David Argiles for excellent technical assistance.

References

- Asunción JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J, Viña J (1996) Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 10:333–338
- Barja G (2002) The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 34:227–233
- Barja G (2004) Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Rev* 79:235–251
- Caro P, Gomez J, Lopez-Torres M, Sanchez I, Naudi A, Jove M, Pamplona R, Barja G (2008) Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 9:183–196
- Caro P, Gomez J, Sanchez I, Garcia R, López-Torres M, Naudi A, Portero-Otin M, Pamplona R, Barja G (2009a) Effect of 40% restriction of dietary amino acids -except methionine- on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology* 10:579–592
- Caro P, Gomez J, Sanchez I, Naudi A, Ayala V, Lopez-Torres M, Pamplona R, Barja G (2009b) Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. *Rejuven Res* 12:421–434
- Chung H, Kim AK, Jung SA, Kim SW, Yu K, Lee JH (2010) The *Drosophila* homolog of methionine sulfoxide reductase A extends lifespan and increases nuclear localization of FOXO. *FEBS Lett* 584:3609–3614
- Gomez J, Caro P, Sanchez I, Naudi A, Jove M, Portero-Otin M, Lopez-Torres M, Pamplona R, Barja G (2009) Effect of methionine dietary supplementation on mitochondrial oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver and heart. *J Bioenerg Biomembr* 41:309–321

- Grandison RC, Piper MDW, Partridge L (2009) Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature* 462:1061–1064
- Gredilla R, Barja G (2005) The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146:3713–3717
- Gredilla R, Sanz A, Lopez-Torres M, Barja G (2001) Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J* 15:1589–1591
- Hasek BE, Stewart LK, Henagan TM, Boudreau A, Lenard NR, Black C, Shin J, Huypends P, Malloy VL, Plaisance EP, Krajcik RA, Orentreich N, Gettys TW (2010) Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 299:R728–R739
- Huang JY, Hirschey MD, Shimazu T, Ho L, Verdin E (2010) Mitochondrial sirtuins. *Biochim Biophys Acta* 1804:1645–1651
- Imai S, Guarente L (2010) Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci* 31:212–220
- Iwasaki K, Gleiser CA, Masoro EJ, McMahan CA, Seo EJ, Yu BP (1988) Influence of the restriction of individual dietary components on longevity and age-related disease of Fischer rats: the fat component and the mineral component. *J Gerontol* 43:B13–B21
- Khorakova M, Deil Z, Khausman D, Matsek K (1990) Effect of carbohydrate-enriched diet and subsequent food restriction on life prolongation in Fischer 344 male rats. *Fiziol Zh* 36:16–21
- Khrapko K, Vijg J (2007) Mitochondrial DNA mutations and aging: a case closed? *Nat Genet* 39:445–446
- Komninou D, Leutzinger Y, Reddy BS, Richie JP Jr (2006) Methionine restriction inhibits colon carcinogenesis. *Nutr Canc* 54:202–208
- Latorre A, Moya A, Ayala A (1986) Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *PNAS USA* 83:8649–8653
- Ljubcic V, Menzies KJ, Hood DA (2010) Mitochondrial dysfunction is associated with pro-apoptotic cellular environment in senescent cardiac muscle. *Mech Ageing Dev* 131:79–88
- Lopez-Torres M, Barja G (2008) Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction. Possible implications for humans. *Biochim Biophys Acta* 1780:1337–1347
- Lopez-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G (2002) Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Rad Biol Med* 32:882–889
- Mair W, Piper MD, Partridge L (2005) Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLoS Biol* 3:e223
- Malloy VL, Krajcik RA, Bailey SJ, Hristopoulos G, Plummer JD, Orentreich N (2006) Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell* 5:305–314
- Mela L, Seitz S (1979) Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue. *Methods Enzymol* 55:39–46
- Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M (2005) Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 4:119–125
- Min KJ, Tatar M (2006) Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 127:643–646
- Nagakawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L (2009) SIRT5 deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* 137:560–570
- Naudi A, Caro P, Jove M, Gomez J, Boada J, Ayala V, Portero-Otin M, Barja G, Pamplona R (2007) Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuven Res* 10:473–484
- Pamplona R, Barja G (2006) Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta* 1757:496–508
- Pamplona R, Barja G (2007) Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Aging Res Rev* 6:189–210
- Pamplona R, Portero-Otin M, Requena JR, Thorpe SR, Herrero A, Barja G (1999) 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* 106:283–296
- Park SK, Prolla TA (2005) Lessons learned from gene expression profile studies of aging and caloric restriction. *Aging Res Rev* 4:55–65
- Park CM, Cho CW, Rosenfeld ME, Song YS (2008) Methionine supplementation accelerated oxidative stress and nuclear factor kappaB activation in livers of C57BL/6 mice. *J Med Food* 11:667–674
- Porter AG, Urbano AG (2006) Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioessays* 28:834–843
- Ramaligan A, Wang X, Gabello M, Valenzano MC, Soler AP, Ko A, Morin PJ, Mullin JM (2010) Dietary methionine restriction improves colon tight junction barrier function and alters claudin expression pattern. *Am J Physiol Cell Physiol* 299:C1028–C1035
- Richie JP Jr, Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy VL, Orentreich N, Zimmerman JA (1994) Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J* 8:1302–1307
- Sanz A, Barja G (2006) Estimation of the rate of production of oxygen radicals by mitochondria. In: Michael Conn (ed) *Handbook of Models for Human Aging*. Academic Press, pp 183–189
- Sanz A, Caro P, Barja G (2004) Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J Bioenerg Biomembr* 36:545–552
- Sanz A, Caro P, Ayala V, Portero-Otin M, Pamplona R, Barja G (2006) Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J* 20:1064–1073
- Shimokawa I, Higami Y, Yu BP, Masoro EJ, Ikeda T (1996) Influence of dietary components on occurrence of and mortality due to neoplasms in male F344 rats. *Aging Clin Exp Res* 8:254–262
- Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Denu JM, Prolla TA (2010) Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 143:802–812
- Song Y, Cho M, Cho C, Rosenfeld ME (2009) Methionine-induced hyperhomocysteinemia modulates lipoprotein profile and oxidative stress but not progression of atherosclerosis in aged apolipoprotein E knockout mice. *J Med Food* 12:137–144
- Sun L, Amir A, Akha S, Millar RA, Harper J (2009) Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64A:711–722
- Verdin E, Hirschey MD, Finley LWS, Haigis MC (2010) Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signalling. *Trends Biochem Sci* 35:669–675
- Yalcinkaya S, Unlucerci Y, Giris M, Olgac V, Dogru-Abbasoglu S, Uysal M (2009) Oxidative and nitrosative stress and apoptosis in the liver of rats fed on high methionine diet: protective effect of taurine. *Nutrition* 25:436–444

Effects of aging and methionine restriction applied at old age on ROS generation and oxidative damage in rat liver mitochondria

Inés Sanchez-Roman · Alexia Gómez · Irene Pérez ·
Carlota Sanchez · Henar Suarez · Alba Naudí · Mariona Jové ·
Mónica Lopez-Torres · Reinald Pamplona · Gustavo Barja

Received: 31 January 2012 / Accepted: 20 April 2012 / Published online: 13 May 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract It is known that a global decrease in food ingestion (dietary restriction, DR) lowers mitochondrial ROS generation (mitROS) and oxidative stress in young immature rats. This seems to be caused by the decreased methionine ingestion of DR animals. This is interesting since isocaloric methionine restriction in the diet (MetR) also increases, like DR, rodent maximum longevity. However, it is not known if old rats maintain the capacity to lower mitROS generation and oxidative stress in response to MetR similarly to young immature animals, and whether MetR implemented at old age can reverse aging-related variations in oxidative stress. In this investigation the effects of aging and 7 weeks of MetR were investigated in liver mitochondria of Wistar rats. MetR implemented at old age decreased mitROS generation, percent free radical leak at the respiratory chain and mtDNA oxidative damage without changing oxygen consumption. Protein oxidation, lipoxidation and glycoxidation increased with age, and MetR in old

rats partially or totally reversed these age-related increases. Aging increased the amount of SIRT1, and MetR decreased SIRT1 and TFAM and increased complex IV. No changes were observed in the protein amounts of PGC1, Nrf2, MnSOD, AIF, complexes I, II and III, and in the extent of genomic DNA methylation. In conclusion, treating old rats with isocaloric short-term MetR lowers mitROS production and free radical leak and oxidative damage to mtDNA, and reverses aging-related increases in protein modification. Aged rats maintain the capacity to lower mitochondrial ROS generation and oxidative stress in response to a short-term exposure to restriction of a single dietary substance: methionine.

Keywords Calorie restriction · Methionine restriction · Diet · Mitochondria · Reactive oxygen species

Abbreviations

AASA	Amino adipic semialdehyde
CEL	Carboxyethyl-lysine
CML	Carboxymethyl-lysine
DR	Dietary restriction
FRL	Percent free radical leak at the respiratory chain
GSA	Glutamic semialdehyde
MetR	Methionine restriction
mitROS	Mitochondrial ROS
mtDNA	Mitochondrial DNA
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

I. Sanchez-Roman · A. Gómez · I. Pérez ·
C. Sanchez · H. Suarez · M. Lopez-Torres ·
G. Barja (✉)

Department of Animal Physiology-II, Faculty
of Biological Sciences, Complutense University
of Madrid (UCM), c/Jose Antonio Novais 2,
Madrid, Spain
e-mail: gbarja@bio.ucm.es

A. Naudí · M. Jové · R. Pamplona
Department of Experimental Medicine, Faculty
of Medicine, University of Lleida-IRBLLEIDA,
Lleida, Spain

8-oxodG	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
PGC1	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1
ROS	Reactive oxygen species
SIRT1	Sirtuin 1
MnSOD	Mitochondrial manganese superoxide dismutase
TFAM	Mitochondrial transcription factor A

Introduction

The results of many investigations including those concerning age-related changes, comparisons between short- and long-lived animals, and the effects of global decreases in food ingestion (dietary restriction, DR) in relation to longevity, are generally consistent with the mitochondrial free radical theory of aging (Harman 1972; Barja 2004a). Damage to mitochondrial DNA (mtDNA) has been linked to aging and longevity in many studies performed in laboratory mammals, as well as in rhesus monkeys (Castro et al. 2012). Previous studies have identified two characteristics of long-lived animals linked to oxidative stress. Long-lived mammals and birds show a low rate of reactive oxygen species (ROS) generation at mitochondria (Barja 2004a, b), and have cellular membranes with a low degree of fatty acid unsaturation (Pamplona et al. 2002; Pamplona and Barja 2011). Their low ROS production decreases the damage to key molecules like mtDNA, and the low fatty acid unsaturation diminishes the intensity of lipid peroxidation (Pamplona 2011). Among those two factors, DR lowers the first one, the rate of mitochondrial ROS (mitROS) production (Gredilla et al. 2001; Gredilla and Barja 2005).

The best characterized experimental intervention that increases longevity in animals including mammals is DR. Although the exact mechanisms by which DR increases longevity are unknown, many previous investigations have shown that DR lowers oxidative stress in mammals. In particular, DR lowers the rate of mitROS production (Gredilla and Barja 2005) and the steady-state level of oxidative damage to mtDNA in rats and mice. Previous studies from our laboratory have clarified that the cause of these decreases is the lowered ingestion of dietary protein of DR animals (Sanz et al. 2004), whereas the lowered ingestion of dietary carbohydrates (Sanz et al. 2006a), lipids (Sanz

et al. 2006b), or the calories themselves are not involved. Further studies have identified the amino acid methionine as the dietary factor responsible for these beneficial changes in protein restricted and DR animals. Thus, isocaloric methionine restriction (MetR) reproduces the decreases in mitROS generation and oxidative damage to mtDNA observed in protein restricted and DR rodents (Caro et al. 2008; López-Torres and Barja 2008). This is interesting, taking into account that long-life experiments have shown that isocaloric MetR increases maximum longevity in rats and mice (Richie et al. 1994; Miller et al. 2005; Sun et al. 2009) and recent studies link essential amino acids and especially methionine with the positive effect of DR on longevity also in insects and yeast (Grandison et al. 2009; Min and Tatar 2006; Kabil et al. 2011; Petti et al. 2011; Piper et al. 2011).

However, all the previous studies showing that MetR lowers mitochondrial oxidative stress have been performed in young immature rats. It is currently unknown if MetR can also decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in old animals and whether it can reverse putative increases in oxidative damage in aged individuals. Furthermore, it is not known if a short period of MetR is enough to bring about these beneficial changes in animals that have already experienced the long-term deleterious effects of aging. There is hope that scarcely stressful life extending manipulations in animals could be extrapolated to humans in the future. Since a large part of the human population is already mature or old, interventions capable of ameliorating the health state in mature adult or old individuals are desirable. These interventions, ideally, should show efficacy even when they are started late in the life span, when the individuals have lived most of their previous life span without being exposed to them. In particular, it is important to know if a short period of MetR applied at old age is beneficial in animals that have been feeding ad libitum during all their previous lifespan.

Trying to overcome those limitations, we have studied the effect of short-term (7 weeks) MetR in 24 months old Wistar rats. Three groups of animals were used, Young mature controls, Old controls, and Old MetR. In liver mitochondria from these animals, mitochondrial ROS generation, free radical leak (FRL), oxygen consumption, oxidative damage to mtDNA, oxidative, glycoxidative and lipoxidative protein modification, the amount of mitochondrial

respiratory complexes (I–IV), and the apoptosis-inducing factor (AIF) were measured. Since dietary methionine is essential for synthesis of S-adenosyl-methionine that provides methyl groups required for DNA methylation, an important modification mechanism of gene expression, the global methylation of liver genomic DNA was also measured. In order to look for possible factors and mechanisms involved in the effects of MetR, various specific proteins, mitochondrial biogenesis and antioxidant-related factors that seem to be involved in the longevity effects of DR were also studied. Thus, Sirtuin 1 (SIRT1), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 (PGC1), Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM), Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), and mitochondrial manganese superoxide dismutase (MnSOD) were also measured.

Materials and methods

Animals and diets

Male Wistar rats of 6 months (Young mature adult controls) and 24 months (Old controls and Old MetR animals) of age were obtained from Charles River, were caged individually, and were maintained in a 12:12 (light–dark) cycle, 22 ± 2 °C and 50 ± 10 % relative humidity during the experimental period of dietary methionine restriction (7 weeks). Semipurified diets were specifically prepared after our request by MP biochemicals (Irvine, CA) and were imported to Spain by Leti (Barcelona, Spain). Young controls and Old controls received the control diet and the Old-MetR group received the 40 % MetR diet. The composition of the control diet (in g/100 g of diet) was: L-arginine 1.12, L-lysine 1.44, L-histidine 0.33, L-leucine 1.11, L-isoleucine 0.82, L-valine 0.82, L-threonine 0.82, L-tryptophan 0.18, L-methionine 0.86, L-glutamic acid 2.70, L-phenylalanine 1.16, L-glycine 2.33, Dextrine 5.0, Corn starch 31.82, sucrose 31.79, cellulose 5.0, choline bitartrate 0.20, MP vitamin diet fortification mixture 1.0, mineral mix (AIN) 3.50 and corn oil 8.0. The composition of the 40 % MetR diet was similar to that of the control diet except that L-methionine was present at 0.516 %, which corresponds to an amount of this amino acid 40 % lower than in the control diet (0.86 %). This 0.34 % decrease in L-methionine in the 40 % MetR

diet was compensated by increasing all the rest of the dietary components in proportion to their presence in the diet. Since the decrease in L-methionine was very small, with this procedure the percent presence of all the rest of the dietary components was almost the same in the two experimental diets. After 7 weeks of dietary treatment the animals were sacrificed by decapitation. The liver was then processed to isolate mitochondria, which were immediately used to measure mitochondrial respiration and H₂O₂ generation, and liver mitochondrial samples were stored at -80 °C for the assay of the rest of the measurements.

Isolation of mitochondria

Liver was rinsed and fat was removed before homogenization in 60 ml of isolation buffer (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM Hepes, 1 mM EDTA, pH 7.35). Nuclei and cell debris were removed by centrifugation at $1000 \times g$ for 10 min. Supernatants were centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min and the resulting supernatants were eliminated. Pellets were resuspended in 40 ml of isolation buffer without EDTA and centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min. Mitochondria were obtained after centrifugation of the supernatants at $10,000 \times g$ for 10 min. After every centrifugation step any overlaying layer of fat was eliminated. Mitochondrial pellets were resuspended in 1 ml of isolation buffer without EDTA. All the above procedures were performed at 5 °C. Mitochondrial protein was measured by the Biuret method. The final mitochondrial suspensions were maintained over ice and were immediately used for H₂O₂ production and O₂ consumption measurements.

Mitochondrial ROS generation

The rate of mitochondrial ROS production (O₂⁻ + H₂O₂) was assayed by measuring the increase in fluorescence as a function of time (excitation at 312 nm, emission at 420 nm) due to oxidation of homovanillic acid by H₂O₂ in the presence of horseradish peroxidase, as previously described (Barja 2002; Sanz and Barja 2006). Reaction conditions were 0.25 mg of mitochondrial protein per ml, 6 U/ml of horseradish peroxidase, 0.1 mM homovanillic acid, 50 U/ml of superoxide dismutase, and 2.5 mM glutamate/2.5 mM malate, or 5 mM succinate in the incubation buffer (145 mM KCl, 30 mM Hepes, 5 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTGA,

0.1 % albumin, pH 7.4) at 37 °C, in a total volume of 1.5 ml. In some assays 2 μ M rotenone or 2 μ M antimycin A were also added. Duplicated samples were incubated for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by transferring the samples to a cold bath and adding 0.5 ml of stop solution (2.0 M glycine, 2.2 M NaOH, 50 mM EDTA, pH 12), and the fluorescence was read in a LS50B Perkin-Elmer fluorometer. Known amounts of H₂O₂ generated in parallel by glucose oxidase with glucose as substrate were used as standards. Since the superoxide dismutase added in excess converts all O₂^{•-} excreted by mitochondria (if any) to H₂O₂, the measurements represent the total rate of mitochondrial ROS production (O₂^{•-} plus H₂O₂).

Mitochondrial oxygen consumption

The rate of oxygen consumption of liver mitochondria was measured at 37 °C in a water-thermostated incubation chamber with a computer-controlled Clark-type O₂ electrode (Oxygraph, Hansatech, UK) in 0.5 ml of incubation buffer (145 mM KCl, 30 mM Hepes, 5 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 0.1 % albumin, pH 7.4). The substrates used were complex I-linked (2.5 mM glutamate/2.5 mM malate) or complex II-linked (5 mM succinate + rotenone). The assays were performed in the absence (State 4-resting) and in the presence (State 3-phosphorylating) of 500 μ M ADP.

Free radical leak

The rates of H₂O₂ production and O₂ consumption of rat liver mitochondria were measured in parallel in the same samples under similar experimental conditions. This allowed the calculation of the percentage of electrons out of sequence, which reduce O₂ to ROS at the respiratory chain (the percent free radical leak, FRL) instead of reaching cytochrome oxidase to reduce O₂ to water. Since two electrons are needed to reduce 1 mol of O₂ to H₂O₂ whereas four electrons are transferred in the reduction of 1 mol of O₂ to water, the FRL was calculated as the rate of H₂O₂ production divided by twice the rate of O₂ consumption, and the result was multiplied by 100 (FRL).

Oxidative damage to mitochondrial DNA

The isolation of mtDNA was performed by the method of Latorre et al. (1986) adapted to mammals

(Asunción et al. 1996). The isolated mitochondrial DNA was digested to deoxynucleoside level by incubation at 37 °C with 5 U of nuclease P1 (in 20 μ l of 20 mM sodium acetate, 10 mM ZnCl₂, 15 % glycerol, pH 4.8) for 30 min and 1 U of alkaline phosphatase (in 20 μ l of 1 M Tris-HCl, pH 8.0) for 1 h. All aqueous solutions used for mtDNA isolation, digestion and chromatographic separation were prepared in HPLC-grade water. Steady-state oxidative damage to mtDNA was estimated by measuring the level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) referred to that of the non-oxidized dG (deoxyguanosine) and the results were expressed as 8-oxodG/10⁵ dG. 8-oxodG and dG were analyzed by HPLC with on line electrochemical and ultraviolet detection respectively. The nucleoside mixture was injected into a reverse-phase Mediterranean Sea 18 column (5 μ m, 4.6 mm \times 25 cm; Teknokroma, Barcelona, Spain), and was eluted with a mobile phase containing 6.5 % acetonitrile and 50 mM phosphate buffer pH 5.0. The volume of sample injected in the column was 100 μ l. A Gilson 305 pump with nanometric module 805 at 0.9 ml/min was used. 8-oxodG was detected with an ESA Coulochem II electrochemical coulometric detector (ESA, Inc. Bedford, MA) with a 5011A analytical cell run in the oxidative mode (350 mV/20 nA), and dG was detected with a Biorad model 1806 UV detector at 254 nm. For quantification, peak areas of dG standards and of three level calibration pure 8-oxodG standards (Sigma) were analyzed during each HPLC run. Comparison of areas of 8-oxodG standards injected with and without simultaneous injection of dG standards ensured that no oxidation of dG occurred during the chromatography.

Protein oxidation, glycooxidation and lipoxidation

Markers of protein oxidation—the protein carbonyls glutamic (GSA) and amino adipic (AASA) semialdehydes, glycooxidation (carboxyethyl-lysine [CEL] and carboxymethyl-lysine [CML]), and lipoxidation (CML)—were determined as trifluoroacetic acid methyl esters derivatives in acid hydrolyzed delipidated and reduced heart mitochondrial protein samples by GC/MS (Ayala et al. 2007) using a HP6890 Series II gas chromatograph (Agilent, Barcelona, Spain) with a MSD5973A Series and a 7683 Series automatic injector, a Rtx-5MS Restek column (30-m \times 0.25-mm \times 0.25- μ m), and the described

temperature program (Ayala et al. 2007). Quantification was performed by internal and external standardization using standard curves constructed from mixtures of deuterated and non-deuterated standards. Analyses were carried out by selected ion-monitoring GC/MS (SIM-GC/MS). The ions used were: lysine and [$^2\text{H}_8$]lysine, m/z 180 and 187, respectively; 5-hydroxy-2-aminovaleric acid and [$^2\text{H}_5$]5-hydroxy-2-aminovaleric acid (stable derivatives of GSA), m/z 280 and 285, respectively; 6-hydroxy-2-aminocaproic acid and [$^2\text{H}_4$]6-hydroxy-2-aminocaproic acid (stable derivatives of AASA), m/z 294 and 298, respectively; CML and [$^2\text{H}_4$]CML, m/z 392 and 396, respectively; and CEL and [$^2\text{H}_4$]CEL, m/z 379 and 383, respectively. The amounts of product were expressed as the μmolar ratio of GSA, AASA, CML, or CEL per mol of lysine.

Mitochondrial complexes (I, II, III and IV), AIF, SIRT1, PGC1, TFAM, Nrf2, MnSOD

The protein contents of liver mitochondrial respiratory chain complexes (Complex I-Complex IV), AIF, SIRT1, PGC1, TFAM, Nrf2, and MnSOD were estimated using western blot analyses. Mitochondrial protein concentration was measured using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay 500-0006) and mitochondrial proteins were separated by one-dimensional SDS-PAGE. The protease inhibitor mix (80-6501-23, Amersham Biosciences) was added to the samples. The samples were mixed with sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 10 % glycerol, 20 % 2- β -mercaptoethanol and 0.02 % bromophenol blue) and were heated for 5 min at 95 °C. Proteins (10 μg for respiratory chain complexes, AIF and MnSOD; and 80 μg for SIRT1, PGC1, TFAM, Nrf2) were subjected to electrophoresis on 10 % SDS-polyacrylamide minigels. For immunodetection, proteins were transferred using a Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad) in a buffer containing 25 mM Tris, 192 mM Glycine and 20 % methanol, to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P Millipore, Bedford, MA). The membranes were immersed in blocking solution (0.2 % I-Block Tropix AI300, 0.1 % Tween in PBS) for 1 h at room temperature. After blocking, the membrane was washed two times using 0.05 % TBS-T buffer. Afterwards, the membrane was incubated in primary solution using specific antibodies for the 39 kDa (NDUFA9) and 30 kDa (NDUFS3) subunit of complex I (1:1000 in both

cases), 70 kDa subunit (Flavoprotein) of complex II (1:500), 48.5 kDa (CORE 2) and 29.6 kDa (Rieske iron-sulfur protein) subunits of complex III (1:1000 in both cases), and COXI subunit of complex IV with apparent molecular weight of 57 kDa (1:1000) (ref. A21344, A21343, A11142, A11143, A21346 and A6403, respectively; Molecular Probes), anti-AIF (1:1000, ref. A7549, Sigma), anti-SIRT1 (1:500, ref. Ab28170, Abcam), anti-PGC1 (1:100, ref.101707, Cayman), anti-TFAM (1:500, ref.3885-100, Biovision), anti-Nrf2 (1:200, ref. SC722, Santa Cruz Biotechnology) and anti-MnSOD (1:2000, ref. Ab16956, Abcam). An antibody to porin (1:15000, ref. A31855, Molecular Probes) and to actin (1:10000, ref. A5441, Sigma) was also used in order to determine the proportion of protein levels referred to total mitochondrial mass or total mass, respectively. The primary antibody was incubated 1 h at room temperature, except in the case of SIRT1, PGC1, TFAM and Nrf2 which were incubated 16 h at 4 °C. The membrane was washed three times in 0.05 % TBS-T buffer and was incubated 1 h at room temperature with the appropriate secondary antibodies: ECL Anti-mouse IgG, horseradish peroxidase linked whole antibody (1:5000; ref. NA93IV, GE Healthcare), and ImmunoPure Goat Anti-Rabbit IgG, (H + L), peroxidase conjugated (1:10000; ref. 31460, Pierce Biotechnology). After five washes with 0.05 % TBS-T buffer, bands were visualized by using an enhanced chemiluminescence HRP substrate (Millipore, MA, USA). Signal quantification and recording was performed with a ChemiDoc equipment (Bio-Rad Laboratories, Inc., Barcelona, Spain).

Genomic DNA methylation

Genomic DNA was isolated with the GenElute Mammalian Genomic DNA miniprep Kit (G1N70 Sigma). The degree of methylation of this genomic DNA was quantified with a Methylamp Global DNA Methylation Quantification Kit (P-1014 Epigentek). In this assay, the methylated fraction of DNA (expressed as percentage of the total genomic DNA) is recognized by a 5-methylcytosine antibody and quantified through an ELISA-like reaction.

Statistics

Values were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were

analyzed by ANOVA followed by DMS tests for paired groups. The minimum level of statistical significance was set at $P < 0.05$ in all the analyses.

Results

Methionine restriction did not change the total body weight and the fresh weight of the main vital organs (heart, brain, liver, kidney, spleen, and visceral adipose tissue) in Old-MetR compared to Old controls (results not shown).

Methionine restriction significantly decreased the rate of ROS production of liver mitochondria with glutamate/malate as substrates (in Old-MetR rats compared to Old controls; Fig. 1A). The Old-MetR values were also significantly lower than in Young controls (Fig. 1A). In the presence of glutamate/malate + rotenone, however, no significant differences were present among the three groups of animals (Table 1). No significant differences in ROS production between groups were observed either with succinate, succinate + rotenone, or succinate + rotenone + antimycin A (Table 1).

Table 2 shows the rates of oxygen consumption of rat liver mitochondria with different combinations of substrates and inhibitors. High values were observed for the respiratory control index (RCI), around 4 with succinate plus rotenone and around 8 with glutamate/malate. Old controls showed lower state 4 oxygen consumption than Young control animals both with glutamate/malate and with succinate + rotenone as substrates. Old-MetR rats also showed lower values than Young controls with succinate + rotenone in state 4. The rest of the comparisons did not show significant differences in oxygen consumption.

Similarly to what was observed for mitROS production, the percent free radical leak (FRL) of rat liver mitochondria was significantly lower in Old-MetR rats than in both Old and Young controls with glutamate/malate (Fig. 1B) whereas it did not change with succinate + rotenone (results not shown). Methionine restriction also significantly decreased the steady-state level of oxidative damage of liver mtDNA (8-oxodG) in Old-MetR animals below that of Old controls (Fig. 2).

Old controls showed significantly higher levels of protein oxidation (GSA and AASA), glycoxidation (CEL and CML) and lipoxidation (CML) than Young controls (Fig. 3, a*). All these four different markers

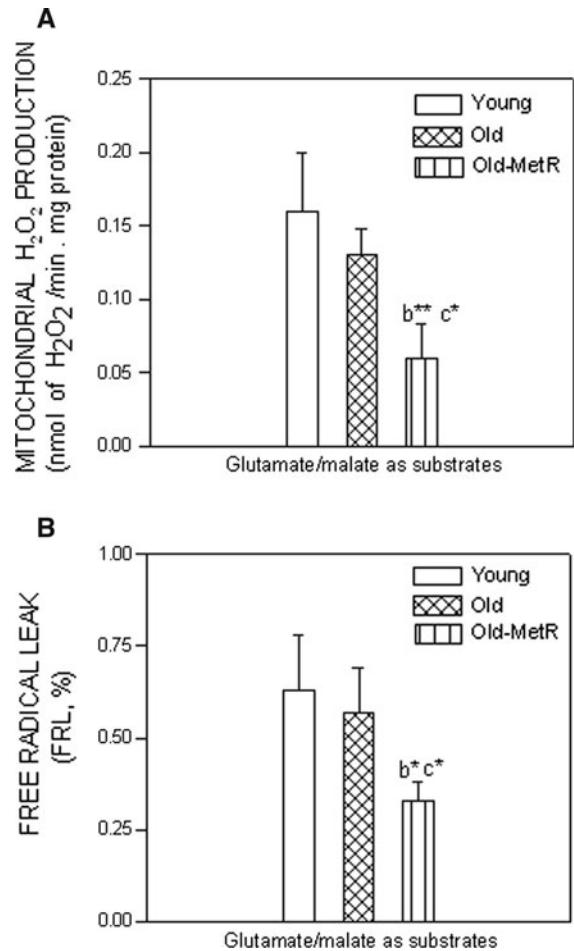


Fig. 1 Rates of ROS production (A) and Free Radical Leak (B) of liver mitochondria from Young control, Old control and Old MetR rats with glutamate/malate as substrates. Values are means \pm SEM from 7 to 8 different animals. *b** Significant difference between Old control and Old-MetR, *c** significant difference between Young control and Old-MetR, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

of protein modification were significantly lower in Old-MetR than in Old Controls (Fig. 3, b*). CEL was higher in Old-MetR than in Young controls (Fig. 3, c*), whereas GSA, AASA and CML did not show differences between these two groups.

The amounts of the respiratory protein complex I (measured both as the 39 and 30 kDa subunits), complex II (70 kDa) and complex III (48.5 and 29.6 kDa subunits) as well as the AIF did not show significant differences among the three experimental groups (Table 3). Only complex IV of Old-MetR animals showed higher levels than those of Young controls (Table 3).

Table 1 Rates of reactive oxygen species (ROS) production of liver mitochondria from Young control, Old control and Old MetR rats under different assay conditions

	Young	Old	Old-MetR
Glutamate/malate + rotenone	0.57 ± 0.06	0.44 ± 0.05	0.36 ± 0.08
Succinate	0.68 ± 0.11	0.45 ± 0.10	0.45 ± 0.08
Succinate + rotenone	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.02
Succinate + rotenone + AA	1.01 ± 0.18	0.97 ± 0.16	0.87 ± 0.09

Values are means ± SEM (nmoles of H₂O₂/min mg protein) from 7 to 8 different animals

AA Antimycin A

Table 2 Rates of oxygen consumption and respiratory control index of liver mitochondria from Young control, Old control and Old MetR rats

	Young	Old	Old-MetR
Glutamate/malate (State 4)	13.3 ± 1.1	10.9 ± 0.8 ^{a*}	10.8 ± 1.2
Glutamate/malate (State 3)	96.2 ± 3.7	88.8 ± 3.5	89.0 ± 3.3
Glutamate/malate (RCI)	7.5 ± 0.6	8.4 ± 0.5	8.7 ± 0.7
Succinate + rotenone (State 4)	34.4 ± 2.3	27.2 ± 1.7 ^{a*}	27.8 ± 2.5 ^{c*}
Succinate + rotenone (State3)	124.5 ± 7.7	109.8 ± 7.3	117.2 ± 3.5
Succinate + rotenone (RCI)	3.8 ± 0.1	4.1 ± 0.3	4.4 ± 0.4

Values are means ± SEM (nmoles of O₂/min mg protein) from 8 different animals. *State 4* oxygen consumption in the absence of ADP. *State 3* oxygen consumption in the presence of 500 μM ADP. *RCI* Respiratory control index. *a** Significant difference between Young and Old control rats, *c** significant difference between Young control and Old-MetR, * *P* < 0.05

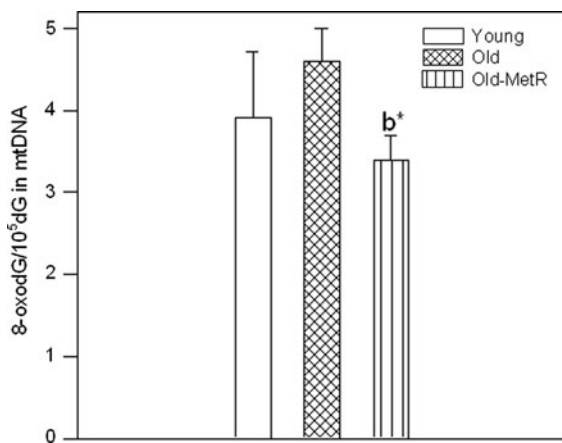


Fig. 2 Oxidative damage to mtDNA in liver mitochondria from Young control, Old control and Old MetR rats. Values are means ± SEM from 6 to 7 different animals. *b** Significant difference between Old control and Old-MetR, **P* < 0.05

Representative immunoblots of the mitochondrial biogenesis and antioxidant factors measured are shown in Fig. 4. SIRT1 was higher in Old controls than in Young controls, and lower in Old-MetR than in

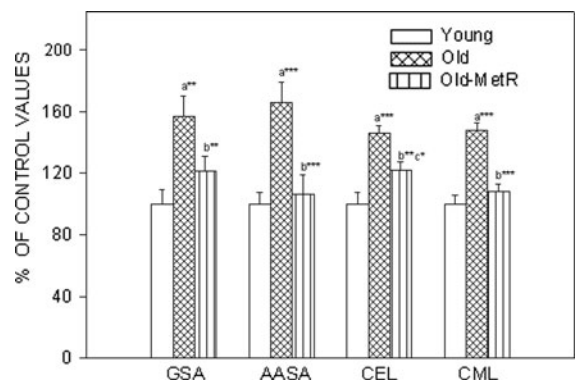


Fig. 3 Protein oxidation, glycoxydation and lipoxydation indicators in liver mitochondria from Young control, Old control and Old MetR rats. Values are means ± SEM from 8 different animals and are expressed as percentage of those in the controls for each protein modification marker. Control values: 3,637.91 ± 325.25 (glutamic semialdehyde, GSA); 108.03 ± 7.52 (AASA, amino adipic semialdehyde, AASA); 225.35 ± 16.26 (carboxyethyl-lysine, CEL); 949.07 ± 54.37 (carboxymethyl-lysine, CML). Units: μmol/mol lysine. *a** Significant difference between Young and Old control rats, *b** significant difference between Old control and Old-MetR, *c** significant difference between Young control and Old-MetR, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

Table 3 Amounts of respiratory complexes and AIF in liver mitochondria from Young control, Old control and Old MetR rats

	Young	Old	Old-MetR
Complex I (39 kDa subunit, NDUFA9)	100 ± 2.35	95.1 ± 5.41	97.8 ± 16.7
Complex I (30 kDa subunit, NDUFS3)	100 ± 0.11	99.7 ± 0.18	100.1 ± 0.30
Complex II (70 kDa subunit, Flavoprotein)	100 ± 6.23	138.9 ± 16.85	140.7 ± 14.10
Complex III (48.5 kDa, CORE II)	100 ± 8.58	95.6 ± 2.85	110.7 ± 2.40
Complex III (29.6 kDa subunit, Rieske iron-sulfur protein)	100 ± 10.83	132.2 ± 12.86	102.0 ± 13.50
Complex IV (57 kDa subunit, COXI)	100 ± 13.22	143.9 ± 21.11	164.3 ± 4.80 ^{c*}
AIF (Apoptosis-inducing factor)	100 ± 9.55	91.29 ± 8.77	107.7 ± 8.50

Values are means ± SEM from 7 to 8 different animals. Units: ratio of complex I, II, III or IV and AIF/porin in arbitrary units. c* Significant difference between Young control and Old-MetR rats, * $P < 0.05$

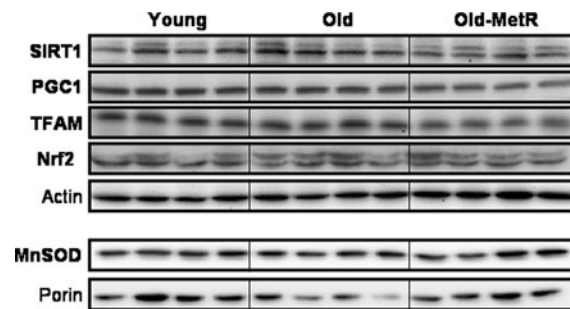


Fig. 4 Representative immunoblots showing relative levels of the mitochondrial biogenesis and antioxidant factors PGC1, TFAM, Nrf2 and MnSOD, as well as SIRT1, and actin and porin (used for reference) in liver from Young control, Old control and Old MetR rats

Old controls (Table 4). TFAM was significantly lower in Old-MetR than in Old controls. PGC1, Nrf2, MnSOD and genomic DNA methylation did not show significant differences between groups (Table 4).

Discussion

In this investigation it is shown for the first time that old rats maintain the capacity to lower the rate of mitochondrial ROS production and percent free radical leak at complex I as well as the oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins in the liver in response to a short period of isocaloric 40 % methionine restriction in the diet, similarly to what occurs during 40 % caloric restriction (Gredilla and Barja 2005), and during 40 % MetR in various tissues (including liver) of young immature animals (Caro et al. 2008, 2009a).

It has been described that among components of the mitochondrial respiratory chain, complex III and complex I (Barja and Herrero 1998; Treberg et al. 2011) produce ROS, but the decrease in mitROS production induced by DR has been localized at complex I (Barja 2004b; Gredilla et al. 2001). The decrease in the basal rate of mitROS production induced by 7 weeks of MetR in old rats in the present

Table 4 Mitochondrial biogenesis and antioxidant factors, SIRT1, and genomic DNA methylation, in liver from Young control, Old control and Old MetR rats

	Young	Old	Old-MetR
SIRT1	100 ± 8.29	128.57 ± 8.29 ^{a*}	80.00 ± 7.14 ^{b**}
PGC1	100 ± 0.09	100.07 ± 0.04	100.05 ± 0.07
TFAM	100 ± 5.07	109.26 ± 7.99	83.45 ± 4.89 ^{b*}
Nrf2	100 ± 34.54	111.29 ± 12.33	89.84 ± 20.63
MnSOD	100 ± 19.23	148.31 ± 16.37	117.07 ± 12.59
% DNA methylation	0.74 ± 0.008	0.60 ± 0.086	0.70 ± 0.113

Values are means ± SEM from 4 to 8 different animals. Units: ratio protein content/actin except for MnSOD (protein content/porin) and DNA methylation (methylated genomic DNA as percentage of total genomic DNA). a* Significant difference between Young and Old control rats, b* significant difference between Old control and Old-MetR, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

investigation took place also at complex I because it was observed with glutamate/malate but not with succinate + rotenone as substrates. Electrons flow through complex I in the first but not during the second of these conditions. Thus the notion that the lowering of complex I ROS generation during DR is due to decreased ingestion of methionine and not to other dietary components or to the calories themselves (Caro et al. 2009b; López-Torres and Barja 2008) is reinforced by the present data and it is extended to aged animals. Such decrease, in agreement with other lines of evidence (Pérez-Campo et al. 1998; Barja 2004a, b), does not seem to be secondary to an increase in enzymatic superoxide radical scavenging since the mitochondrial form of superoxide dismutase (MnSOD) was not changed by the MetR treatment, although since what we measured was the amount of MnSOD protein, changes in SOD activity can not be totally ruled out. The decrease in mitROS generation was not a by-product of variations in oxygen consumption either, since this parameter did not change in MetR with glutamate/malate as substrate in State 4 (the condition in which mitROS production decreased). On the other hand, the decreases in mitochondrial oxygen consumption in old animals compared to young ones do not imply a lowered bioenergetic capacity during aging since they were observed only in state 4 but not in the ATP producing state 3. Another possible mechanism to lower complex I ROS generation is a simple decrease in amount of the complex I protein, as it has been described in the long-lived pigeon compared to the much more short-lived rat species (St-Pierre et al. 2002). But this does not seem to be the case in the present model either, because no changes in the amounts of complex I, II and III were observed in MetR. The absence of changes in AIF in MetR also agrees with the lack of changes in the amount of complex I because AIF, in addition to apoptotic functions, is also required for mitochondrial oxidative phosphorylation and has a specific role in the biogenesis and maintenance of complex I (Vahsen et al. 2004; Porter and Urbano 2006). Only the increase in the amount of complex IV detected in the present investigation in Old MetR animals could indirectly contribute to lower mitROS generation. The higher availability of complex IV could in principle facilitate the rate of electron transport and therefore would tend to decrease the accumulation of electrons upwards in the respiratory

chain, lowering the degree of electronic reduction of complex I and thus its tendency to generate ROS. However, against this possibility are the following facts: (a) complex IV is usually in large excess and therefore is usually not limiting for the rate of electron flow; (b) the rate of oxygen consumption in state 4 was not increased in Old MetR rats; (c) the increase in complex IV was significant only when compared to Young but not to Old control animals. On the other hand, the lack of changes in maximum mitROS production (which was measured with glutamate/malate + rotenone and with succinate + rotenone + AA for complexes I and III respectively) also agrees with the idea that the lowering of mitROS generation in MetR is not secondary to changes in the amounts of the mitochondrial ROS generators. Instead, what was decreased by MetR was the FRL, the percentage of total electron flow in the respiratory chain directed to ROS production. Thus, the liver mitochondria from Old MetR animals are more efficient than those of Old controls in avoiding ROS generation. They leak less radicals per unit of electron flow in the respiratory chain, similarly to what has been found in long-lived compared to short-lived animals (Barja 2004a, b). This increased efficiency in avoiding free radical leak was localized at complex I since the decrease in FRL in MetR was observed with glutamate/malate as substrates but not with succinate + rotenone.

In agreement with the decrease in mitROS generation, the mtDNA of Old MetR animals showed a significantly lower level of steady-state oxidative damage (measured as 8-oxodG) than that of Old controls. And the mtDNA 8-oxodG level, like mitROS production, did not show significant differences between Young and Old control animals. Previous results have shown the same kind of results in DR (Gredilla et al. 2001; López-Torres et al. 2002), and in MetR models (Caro et al. 2008) in young animals. This close correspondence between variations or lack of changes between these two parameters suggests that the decrease in 8-oxodG in the mtDNA of Old MetR animals is due, at least in part, to their lowered mitROS production, whereas the mtDNA oxidative damage did not change as a function of age because there were no changes in mitROS generation between Young and Old controls either.

In our study, the lowering of oxidative damage was not limited to mtDNA since it took place also in liver mitochondrial proteins. All the four protein modification markers measured showed MetR-induced

decreases in Old animals, similarly to what has been observed in various rat organs during DR, and during MetR in young animals (López-Torres and Barja 2008). Thus, protein oxidation, lipoxidation and glycoxidation were lower in Old MetR than in Old control animals, similarly to what has been found in liver tissue, and in kidney and brain mitochondria of young immature animals subjected to MetR (Caro et al. 2008, 2009a). On the other hand, in the present investigation Old controls showed higher levels of all the protein modification markers (GSA, AASA, CEL, AND CML) than the Young controls. Therefore, MetR was able to partially (CEL) or totally (GSA, AASA and CML) reverse the aging-related increases in protein modification. The lowering of aging-related increases in protein damage is one of the most prominent beneficial effects of MetR among those found in the present investigation. While the decrease in mitROS generation in MetR could contribute to those reversals in protein damage it is not necessarily the only factor controlling protein oxidative modification since Old controls had a higher level of the four protein markers than Young controls whereas their rates of mitROS production were similar. Another factor that could be involved is an increased catabolism of modified proteins in Old MetR animals. Aging is known to increase protein oxidation in association with a functional decline of proteasome activity (Kastle and Grune 2011) whereas decreases in protein oxidation and increases in the catabolism of modified proteins have been described in DR (Dhabi et al. 2001).

Although not specifically measured in the present study, the decreases in mitochondrial ROS production and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins induced by MetR likely lead to beneficial effects on health and functionality of the animals. This relates to many previously published studies. Thus, it has been shown that MetR decreases visceral fat mass, improves glucose tolerance, strongly decreases plasma insulin and IGF-1 and lowers blood cholesterol and triglycerides in rats, independently of calorie restriction (Malloy et al. 2006). Diets low in methionine decrease the risk of obesity (Newby et al. 2005) and diabetes (Vang et al. 2008) in humans, and MetR enhances metabolic flexibility and increases uncoupling respiration (Hasek et al. 2010). In addition, a recent study showed that expressing the yeast Ndi1 complex I analogue in *Drosophila* decreased mitochondrial ROS production and specific protein

oxidation markers and increased mean and maximum lifespan of the animals (Sanz et al. 2010). Most importantly, it has been repeatedly found that MetR increases mean and maximum longevity in both rats and mice (Richie et al. 1994; Miller et al. 2005; Sun et al. 2009). Maximum longevity integrates all the different functional age-related changes and its increase is an excellent indicator of decreases in aging rate. Increases in maximum longevity only occur when the many different age-related decreases in molecular, tissue and organism functionalities and the incidence of age-related diseases are coordinately minimized or delayed.

What are the signalling mechanisms possibly involved in the beneficial changes induced by MetR detected in this investigation? Many signalling pathways have been linked to the aging process not only in invertebrate model animals but also in mammals (Taguchi and White 2008; Mair and Dillin 2008), and many microarray studies have shown that DR (which necessarily includes MetR) modifies the expression of many different genes (Park and Prolla 2005). On the other hand, partly separated although finally convergent pathways are being delineated for the actions of DR (the insulin/IRS pathway) on the one hand, and of diet-derived amino-acids on the other (the amino acid response pathway) (Mair and Dillin 2008; Taguchi and White 2008; Liu and Qian 2011). This last pathway could be specifically implicated in the mechanism of action of MetR. On the other hand, sirtuins have been implicated in the control of life span during DR, although this concept is currently under debate (Baur et al. 2010). Other possible mechanisms involved in the beneficial effect of DR on aging are an induction of mitochondrial biogenesis (Nisoli et al. 2005; López-Lluch et al. 2006; Hock and Kralli 2009), or decreased methylation of DNA which can change gene expression (Robert et al. 2010; Passarino et al. 2010; Madrigano et al. 2012). Dietary methionine is essential for the synthesis of S-adenosylmethionine that provides methyl groups required for DNA methylation. Increases in transmethylation of methionine and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio in the liver of protein restricted rats (Kalhan et al. 2011) and increases in S-adenosylmethionine in the heart of dietary methionine-supplemented rats (Gómez et al. 2009) have been recently observed. Therefore, this last result indicates that a lower level of DNA methylation could be expected in MetR.

In order to look generally at those different signalling mechanisms, in this investigation we have measured some proteins that could be involved in those pathways. Among them, only an increase in the amount of SIRT1 with age, and decreases in SIRT1 and TFAM with MetR were detected, whereas PGC1, Nrf2, MnSOD and percent DNA methylation did not change in either situation. Among sirtuins, SIRT1 is the better one characterized in mammals. SIRT1 seems to be induced by DR and it has been proposed that this decreases mitROS generation through the increased expression of antioxidant-related genes induced by the forkhead/FOXO family of transcription factors (Hajnoczky and Hoek 2007). But our results suggest that MetR does not decrease mitROS generation and oxidative stress through this pathway in our model because a decrease (instead of an increase) in SIRT1 back to young levels was observed, and MnSOD was not changed. Perhaps the mechanisms of action of short-term MetR, which are only a fraction of those of DR, do not involve SIRT1 induction at least in old rat liver. The decrease in TFAM and the lack of changes in its upstream factor PGC1 do not suggest that increased mitochondrial biogenesis is involved in the lowering of oxidative stress by MetR in our model either. The lack of changes in most of the multiprotein complexes of the respiratory chain observed in our study also point in the same direction. We have previously observed an increase in the amount of PGC1 α in the brain of young rats with the same MetR protocol used in the present investigation (Naudí et al. 2007). Therefore, the effects of MetR on mitochondrial biogenesis could be tissue- or age-specific. Concerning Nrf2, it is currently referred as a “master regulator” of the antioxidant response. It up-regulates a battery of about 100 antioxidant response element-driven genes including the familiar antioxidant enzymes as well as many others related to immunity and inflammation (Kensler et al. 2007; Hayes et al. 2010). Nrf2 induces the expression of a number of genes involved in protecting cells against free radicals, electrophiles, and oxidative stress, including those coding for superoxide dismutases. The lack of changes in Nrf2 and MnSOD in the present study, however, suggests that the decrease in mitROS generation induced by MetR is not antioxidant-dependent, which would be consistent with a large body of previous evidence concerning DR as well as comparisons among animal species widely differing in longevity

(Pérez-Campo et al. 1998; Sohal et al. 1994; Barja 2004a). However, like in the case of MnSOD, since what we measured was the amount of the Nrf2 protein, the possibility that Nrf2 could be activated through nuclear translocation can not be discarded. Concerning DNA methylation, we have previously found that the same protocol of MetR used here led to a small but statistically significant decrease in global DNA methylation in the liver of young immature rats (Sanchez-Roman et al. 2011), whereas in the present study performed in old rats the decrease in this parameter did not reach statistical significance. Since the difference between both studies was the age of the animals, this could mean that the capacity of MetR to decrease global DNA methylation is lost during aging in rat liver.

In summary, the results of the present investigation demonstrate for the first time that old rats maintain the capacity to respond to methionine restriction with decreases in mitROS production and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins. Importantly, these beneficial changes, which are well described in DR rats, can be obtained after subsection of old animals to only 7 weeks of methionine restriction in the diet without any decrease in the ingestion of calories. Further studies are needed to delineate what are the exact molecular mechanisms by which MetR, a hardly stressful and quick intervention, exerts these benefits in aged individuals.

Acknowledgments This investigation was supported in part by I + D grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2008-00335/BFI) and a UCM/BSCH Grant in 2010 to G. Barja; and I + D grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2009-118/79BFI) and the Generalitat of Catalonia (2009SGR735) to R. Pamplona. I. Sanchez received a pre-doctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education (FPU) and A. Gomez received a fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation (FPI). We thank David Argiles for excellent technical assistance.

References

- Asunción JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J, Viña J (1996) Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 10:333–338
- Ayala V, Naudi A, Sanz A, Caro P, Portero-Otin M, Barja G, Pamplona R (2007) Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *J Gerontol Biol Sci* 62A:352–360

- Barja G (2002) The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 34:227–233
- Barja G (2004a) Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 27:595–600
- Barja G (2004b) Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Rev* 79:235–251
- Barja G, Herrero A (1998) 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* 30:235–243
- Baur JA, Chen D, Chini EN, Chua K, Cohen HY, de Cabo R, Deng C, Dimmeler S, Gius D, Guarente LP, Helfand SL, Imai S, Itoh H, Kadowaki T, Koya D, Leeuwenburgh C, McBurney M, Nabeshima Y, Neri C, Oberdoerffer P, Pestell RG, Rogina B, Sadoshima J, Sartorelli V, Serrano M, Sinclair DA, Steegborn C, Tatar M, Tissenbaum HA, Tong Q, Tsubota K, Vaquero A, Verdin E (2010) Dietary restriction: standing up for sirtuins. *Science* 328:321–326
- Caro P, Gómez J, López-Torres M, Sánchez I, Naudí A, Jove M, Pamplona R, Barja G (2008) Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 9:183–196
- Caro P, Gomez J, Sanchez I, Naudi A, Ayala V, Lopez-Torres M, Pamplona R, Barja G (2009a) Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. *Rejuven Res* 12:421–434
- Caro P, Gomez J, Sanchez I, Garcia R, López-Torres M, Naudí A, Portero-Otin M, Pamplona R, Barja G (2009b) Effect of 40 % restriction of dietary amino acids—except methionine—on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology* 10:579–592
- Castro MR, Suarez E, Kraiselburd E, Isidro A, Paz J, Ferder L, Ayala-Torres S (2012) Aging increases mitochondrial DNA damage and oxidative stress in liver of rhesus monkeys. *Exper Gerontol* 47:29–37
- Dhabi JM, Monte PL, Wingo J, Rowley BC, Cao SX, Waldford RL, Spindler SR (2001) Caloric restriction alters the feeding response of key metabolic enzyme genes. *Mech Ageing Dev* 122:1033–1048
- Gómez J, Caro P, Sanchez I, Naudi A, Jove M, Portero-Otín M, López-Torres M, Pamplona R, Barja G (2009) Effect of methionine dietary supplementation on mitochondrial oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver and heart. *J Bioenerg Biomembr* 41:309–321
- Grandison RC, Piper MDW, Partridge L (2009) Amino acid imbalance explains extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature* 462:1061–1064
- Gredilla R, Barja G (2005) The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146:3713–3717
- Gredilla R, Sanz A, Lopez-Torres M, Barja G (2001) Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at Complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J* 15:1589–1591
- Hajnoczky G, Hoek JB (2007) Mitochondrial longevity pathways. *Science* 315:607–609
- Harman D (1972) The biological clock: the mitochondria. *J Am Geriatr Soc* 20:145–147
- Hasek BE, Stewart LK, Henagan TM, Boudreau A, Lenard NR, Black C, Shin J, Huypens P, Malloy VL, Plaisance EP, Krajcik RA, Orentreich N, Gettys TW (2010) Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states. *Am J Physiol* 299:R728–R739
- Hayes JD, McMahon M, Cowdry S, Dinkova-Kostova AT (2010) Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antiox Redox Signal* 13:1713–1748
- Hock MB, Kralli A (2009) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol* 71:177–203
- Kabil H, Kabil O, Banerjee R, Harshman LG, Pletcher SD (2011) Increased transulfuration mediates longevity and dietary restriction in *Drosophila*. *PNAS* 108:16831–16836
- Kalhan SC, Uppal SO, Moorman JL, Bennett C, Gruca LL, Parimi PS, Dasarathy S, Serre D, Hanson RW (2011) Metabolic and genomic response to dietary isocaloric protein restriction in the rat. *J Biol Chem* 286:5266–5277
- Kastle M, Grune T (2011) Protein oxidative modification in the aging organism and the role of the ubiquitin proteasomal system. *Curr Pharm Des* 17:4007–4022
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:89–116
- Latorre A, Moya A, Ayala A (1986) Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *PNAS* 83:8649–8653
- Liu B, Qian SB (2011) Translational regulation in nutrigenomics. *Adv Nutr* 2:511–519
- López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhun M, Jamieson H, Hilmer S, Cascajo MV, Allard J, Ingram DK, Navas P, de Cabo R (2006) Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *PNAS* 103:1768–1773
- López-Torres M, Barja G (2008) Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction. Possible implications for humans. *Biochim Biophys Acta* 1780:1337–1347
- López-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G (2002) Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Rad Biol Med* 32:882–889
- Madrigano J, Baccarelli A, Mittleman MA, Sparrow D, Vokonas PS, Tarantini L, Schwartz J (2012) Aging and epigenetics: longitudinal changes in gene-specific DNA methylation. *Epigenetics* Jan 1; 7(1), <http://dx.doi.org/10.4161/epi.7.1.187949>
- Mair W, Dillin A (2008) Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu Rev Biochem* 77:727–754
- Malloy VL, Krajcik RA, Bailey SJ, Hristopoulos G, Plummer JD, Orentreich N (2006) Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell* 5:305–314

- Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M (2005) Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 4:119–125
- Min KJ, Tatar M (2006) Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 127:643–646
- Naudí A, Caro P, Jové M, Gómez J, Boada J, Ayala V, Portero-Otín M, Barja G, Pamplona R (2007) Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuven Res* 10:473–484
- Newby PK, Tucker KL, Wolk A (2005) Risk of overweight and obesity among semivegetarian, lactovegetarian, and vegan women. *Am J Clin Nutr* 81:1267–1274
- Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO (2005) Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310:314–317
- Pamplona R (2011) Advanced lipoxidation end-products. *Chem Biol Interact* 192:14–20
- Pamplona R, Barja G (2011) An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology* 12:409–435
- Pamplona R, Barja G, Portero-Otín M (2002) Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation. *Ann N Y Acad Sci* 959:475–490
- Park SK, Prolla TA (2005) Lessons learned from gene expression profile studies of aging and caloric restriction. *Ageing Res Rev* 4:55–65
- Passarino G, Rose G, Bellizzi D (2010) Mitochondrial function, mitochondrial DNA and ageing: a reappraisal. *Biogerontology* 11:575–588
- Pérez-Campo R, López-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G (1998) The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol B* 168:149–158
- Petti AA, Crutchfield CA, Rabinowitz JD, Botstein D (2011) Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. *PNAS* 108:E1089–E1098
- Piper MDW, Partridge L, Raubenheimer D, Simpson SJ (2011) Dietary restriction and aging: a unifying perspective. *Cell Metab* 14:154–160
- Porter AG, Urbano AG (2006) Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioassays* 28:834–843
- Richie JP Jr, Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy V, Orentreich N, Zimmerman JA (1994) Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J* 8:1302–1307
- Robert L, Labat-Robert J, Robert AM (2010) Genetic, epigenetic and posttranslational mechanisms of aging. *Biogerontology* 11:387–399
- Sánchez-Roman I, Gomez A, Gomez J, Suarez H, Sanchez C, Naudí A, Ayala V, Portero-Otín M, Lopez-Torres M, Pamplona R, Barja G (2011) Forty percent methionine restriction lowers DNA methylation, complex I ROS generation, and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins in rat heart. *J Bioenerg Biomembr* 43:699–708
- Sanz A, Barja G (2006) Estimation of the rate of production of oxygen radicals by mitochondria. In: Conn M (ed) *Handbook of models for human aging*. Academic Press, New York, pp 183–189
- Sanz A, Caro P, Barja G (2004) Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J Bioenerg Biomembr* 36:545–552
- Sanz A, Gómez J, Caro P, Barja G (2006a) Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J Bioenerg Biomembr* 38:327–333
- Sanz A, Caro P, Gómez J, Barja G (2006b) Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. *Ann N Y Acad Sci* 1067:200–209
- Sanz A, Soikkeli M, Portero-Otín M, Wilson A, Kemppainen E, McLroy G, Ellilä S, Kemppainen KK, Tuomela T, Lakanmaa M, Kiviranta E, Stefanatos R, Dufour E, Hutz B, Naudí A, Jové M, Zeb A, Vartiainen S, Matsuno-Yagi A, Yagi T, Rustin P, Pamplona R, Jacobs HT (2010) Expression of the yeast NADH dehydrogenase Ndi1 in *Drosophila* confers increased lifespan independently of dietary restriction. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:9105–9110
- Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H (1994) Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction. *Mech Ageing Dev* 74:121–133
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277:44784–44790
- Sun L, Amir A, Akha S, Millar RA, Harper J (2009) Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64A:711–722
- Taguchi A, White MF (2008) Insulin-like signalling, nutrient homeostasis, and life span. *Annu Rev Physiol* 70:191–212
- Treberg JR, Quinlan CL, Brand MD (2011) Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 286:27103–27110
- Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schagger H, Rustin P, Kroemer G (2004) AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* 23:4679–4689
- Vang A, Singh PN, Lee JW, Haddad EH, Brinegar CH (2008) Meats, processed meats, obesity, weight gain and occurrence of diabetes among adults: findings from Adventist Health Studies. *Ann Nutr Metab* 52:96–104



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Experimental Gerontology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/expgero

Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: Role of methionine restriction

Ines Sanchez-Roman, Gustavo Barja *

Department of Animal Physiology-II, Faculty of Biological Sciences, Complutense University of Madrid (UCM), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2012

Received in revised form 17 January 2013

Accepted 21 February 2013

Available online xxx

Section Editor: Christiaan Leeuwenburgh

Keywords:

Aging

Reactive oxygen species

Dietary restriction

Mitochondria

Complex I

DNA damage

ABSTRACT

Comparative studies indicate that long-lived mammals have low rates of mitochondrial reactive oxygen species production (mtROSp) and oxidative damage in their mitochondrial DNA (mtDNA). Dietary restriction (DR), around 40%, extends the mean and maximum life span of a wide range of species and lowers mtROSp and oxidative damage to mtDNA, which supports the mitochondrial free radical theory of aging (MFRTA). Regarding the dietary factor responsible for the life extension effect of DR, neither carbohydrate nor lipid restriction seems to modify maximum longevity. However protein restriction (PR) and methionine restriction (at least 80% MetR) increase maximum lifespan in rats and mice. Interestingly, only 7 weeks of 40% PR (at least in liver) or 40% MetR (in all the studied organs, heart, brain, liver or kidney) is enough to decrease mtROSp and oxidative damage to mtDNA in rats, whereas neither carbohydrate nor lipid restriction changes these parameters. In addition, old rats also conserve the capacity to respond to 7 weeks of 40% MetR with these beneficial changes. Most importantly, 40% MetR, differing from what happens during both 40% DR and 80% MetR, does not decrease growth rate and body size of rats. All the available studies suggest that the decrease in methionine ingestion that occurs during DR is responsible for part of the aging-delaying effect of this intervention likely through the decrease of mtROSp and ensuing DNA damage that it exerts. We conclude that lowering mtROS generation is a conserved mechanism, shared by long-lived species and dietary, protein, and methionine restricted animals, that decreases damage to macromolecules situated near the complex I mtROS generator, especially mtDNA. This would decrease the accumulation rate of somatic mutations in mtDNA and maybe finally also in nuclear DNA.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

What are the mechanisms regulating the rate of aging? Although perhaps multi-causal, the main causal factors determining the rate of aging are expected to be relatively few (Barja, 2008) and highly conserved across closely related species like different mammals. Numerous theories of aging have been proposed (Medvedev, 1990). However, any appropriate theory should be able to explain the four main characteristics of aging (Strehler, 1962): it is progressive, endogenous, irreversible, and deleterious (for the individual). Denham Harman first proposed in 1956 that free radicals, and especially those of mitochondrial origin (Harman, 1956; Harman, 1972; Miquel et al.,

1980), are among the main causes of aging. The Mitochondrial Free Radical Theory of Aging (MFRTA) is supported by different kinds of experimental and comparative studies (Barja, 2004a,b; Barja et al., 1994a; Pamplona and Barja, 2011; Pérez-Campo et al., 1998; Sohal and Weindruch, 1996). This review summarizes the available evidence concerning the MFRTA focusing in dietary models that increase maximum longevity (dietary, protein and methionine restriction), comparative studies and the underlying mechanisms involved.

2. Mitochondrial free radical theory of aging

In the absence of pathology, mitochondria are an important cellular source of reactive oxygen species (ROS) that can oxidatively damage many different kinds of cellular macromolecules including lipids, proteins and, especially in the case of aging, mitochondrial DNA (mtDNA) (Barja et al., 1994a). MFRTA fits well with the four Strehler's rules of aging: mitochondrial ROS production (mtROSp) comes from endogenous sources (the mitochondrial respiratory chain), progressively and continuously occurs throughout life, and it is finally detrimental (for the individual) in an irreversible way due to the capacity of ROS to give rise to established somatic mutations in mtDNA (Barja, 2004a,b; Barja and Herrero, 2000; Barja et al., 1994a,b; Ku et al., 1993; Sohal

Abbreviations: 8-oxodG, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; BER, base excision repair; DR, dietary restriction; %FRL, percentage free radical leak; IGF, insulin-like growth factor; IIS, insulin/insulin-like growth factor signaling; MetR, methionine restriction; mtDNA, mitochondrial DNA; MFRTA, mitochondrial free radical theory of aging; mtVO₂, mitochondrial oxygen consumption; mtROSp, mitochondrial ROS production; nDNA, nuclear DNA; PR, protein restriction; SAH, S-adenosylhomocysteine; SAM, S-adenosylmethionine.

* Corresponding author at: Departamento de Fisiología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, c/ Jose Antonio Novais 2, Madrid 28040, Spain. Tel.: +34 91 3944919; fax: +34 91 3944935.

E-mail address: gbarja@bio.ucm.es (G. Barja).

0531-5565/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2013.02.021>

Please cite this article as: Sanchez-Roman, I., Barja, G., Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: Role of methionine restriction. *Exp. Gerontol.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2013.02.021>

et al., 1990), and maybe finally also in nuclear DNA (nDNA) (Caro et al., 2010). Therefore, mtROSp seems to be one of the main factors that genetically determine the aging rate and the species-specific maximum life span potential (from here on called “longevity”).

It is now well known that mtROS generation occurs not only at complex III (Boveris and Cadenas, 1975; Boveris et al., 1976) but also at complex I (Barja and Herrero, 1998; Genova et al., 2001; Herrero and Barja, 1997; Kudin et al., 2004; Kushnareva et al., 2002; Lambert and Brand, 2004). The main electron transport components that can be responsible for complex I ROS generation are the following: those located in the hydrophilic complex I domain facing the mitochondrial matrix, the flavin, and some of the FeS clusters (Genova et al., 2001; Herrero and Barja, 2000), or that situated in the inner membrane arm of complex I, the ubiquinone (Herrero and Barja, 2000; Lambert and Brand, 2004; Murphy, 2009; Treberg et al., 2011). In contrast, complex III would produce ROS directed only to the cytosolic side of the inner membrane, although recent studies suggest that part of the production could also occur towards the matrix (Brand, 2010). Oxygen derived radicals can damage all kinds of macromolecules, but mtDNA is especially important in the case of aging because the final result can be the irreversible loss or alteration of all the copies of relevant DNA-coded information of a cell, which are needed for its survival or proper functioning (Marnett and Plastaras, 2001). Determinant mechanisms of the steady-state level of oxidative mtDNA damage include its location, very close to or even in contact with the site/s of mtROS production at the inner mitochondrial membrane (Barja, 2004b; Barja et al., 1994a).

Comparative studies have shown that long-lived species have low rates of mtROSp and oxidative damage (Barja, 2004a,b; Barja and Herrero, 1998; Barja et al., 1994a,b; Herrero and Barja, 1997, 1998; Lambert et al., 2007; Sohal et al., 1994). Long-lived species produce lower amounts of ROS at their tissue mitochondria than short-lived ones, and this difference seems to occur at complex I, not at complex III. This is due in various cases to the possession of a lower percent leakage of total electron flow in the respiratory chain (%free radical leak: %FRL; Barja, 2004a). The frequently low %FRL of the mitochondria from animals with longevity higher than expected for their body size and metabolic rate means that these animals usually have mitochondria more efficient in avoiding ROS generation. In addition, they can also have (as in pigeons) a lower amount of complex I protein (Lambert et al., 2010; Pamplona et al., 2005; St-Pierre et al., 2002), and then less mtROSp. In summary, available scientific data supports a negative correlation between mtROS production and longevity in vertebrates.

In agreement with their low rates of mtROS generation, long-lived mammals have lower steady-state levels of oxidative damage (estimated by measuring 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: 8-oxodG by HPLC-EC) in their mtDNA (Barja, 2004a,b; Barja and Herrero, 2000). It is interesting to note that long-lived animals do not possess higher levels of molecules protecting from free radicals. Contrarily to this, long-lived animals have lower tissue levels of endogenous antioxidants (reviewed in Pérez-Campo et al., 1998; see also Table 1 in Pamplona and Constantini, 2011) as well as lower repair activities of endogenous DNA damage (base excision repair – BER pathway; Page and Stuart, 2011) and of protein repair through the 20S/26S proteasome (Portero-Otín et al., 2004; Salway et al., 2011) than short-lived ones. The low or very low antioxidant levels of long-lived animals, up to 15 lower in humans than in hamsters in the case of liver GSH-peroxidase (see Fig. 3 in Pérez-Campo et al., 1998), was a seminal observation that led us to propose that long-lived animals should have low rates of mtROSp and that this was the relevant trait for aging, not the antioxidant levels (Barja et al., 1994a; Ku et al., 1993; Lambert et al., 2007; López-Torres et al., 1993a; Pérez-Campo et al., 1994, 1998). Besides, many experimental studies have shown that increasing antioxidant enzymes like SOD, catalase or GSH-peroxidases in transgenic mice or in the diet does not increase animal longevity (Barja, 2004a; Muller et al., 2007; Sanz et al.,

Table 1
Summary of methionine restriction (MetR) longevity experiments in mice and rats.

Manipulation	Species	Number of animals ^a	Change in (maximum) longevity	Reference
80% MetR ^b	Fisher 344 rat	30	↑ 12%	Orentreich et al. (1993)
80% MetR ^b	Fisher 344 rat	16	↑ 44%	Richie et al. (1994)
65% MetR ^c	Mice (CB6F1)	40	↑ 10%	Miller et al. (2005)
65% MetR ^c at middle age (12 months)	Mice (CB6F1)	51	↑ 5.5%	Sun et al. (2009)

↑: increase; CB6F1 = (BALB/c × C57BL/6)F1.

^a Number of different animals per dietary group in each life-long experiment.

^b Control diet: 0.86% methionine; MetR diet: 0.17% methionine.

^c Control diet: 0.43% methionine; MetR diet: 0.15% methionine.

2006a) except in *Caenorhabditis elegans* (Melov et al., 2000) but only under specific conditions (Keaney and Gems, 2003). If there is a low rate of mtROS induced damage in long-lived species, there is also a smaller need for endogenous antioxidants, or for protein and DNA repair systems, which could be transiently induced when needed to come back again to low levels when the episodic increase in oxidative stress has been overcome (Lee et al., 1996; López-Torres et al., 1993b). In this way cells save much energy which otherwise would be invested in the protein synthesis needed to continuously maintain high levels of antioxidants and DNA repair enzymes when they are not needed. Instead, long-lived species decrease mtROSp which is simpler, more efficient, and much less energetically expensive than continuously maintaining high levels of endogenous antioxidants and repair systems. On the other hand, long-lived mammals also have a low degree of fatty acid unsaturation in their cellular membranes which protects them against the deleterious process of lipid peroxidation (Naudi et al., 2011; Pamplona et al., 1996, 2002a; Pamplona and Barja, 2007).

The studies summarized below (Sections 3 and 4) show that dietary restriction (DR), protein restriction (PR) and methionine restriction (MetR) increase longevity and decrease mtROS generation and oxidative damage to mtDNA in rodents. Those studies connect longevity and experimental studies with the MFRTA. They offer a plausible mechanism by which both long-lived animal species and DR, PR or MetR animals can slow down the rate of aging: by decreasing mtROSp. This in turn lowers mtDNA oxidative damage and then the long-term accumulation of (irreversible) somatic mutations in mtDNA (Barja, 2004a) including point mutations, as well as deletions, and therefore generating also less mtDNA fragments. These mtDNA fragments show higher levels of 8-oxodG adducts than wild type mtDNA (Suter and Richter, 1999), and are released from mouse liver mitochondria upon opening of the mitochondrial permeability transition pore (Patrushev et al., 2004). Interestingly, these fragments are present also in nDNA, and a recent study has found that the mtDNA fragments present in nDNA increase with age in both rat liver and brain (Caro et al., 2010). Such insertions have the potential to alter the nDNA sequences. According to the “mtDNA fragments insertion inside nDNA” mechanism (Barja, 2010; Caro et al., 2010) the mitochondria would continue to be the source of the aging problem in the MFRTA but the main target would be the nucleus.

In addition to the dietary studies, it has been shown that genetic manipulations also might modulate ageing. Among others, specific mutations in the insulin/insulin-like growth factor (IGF) signalling (IIS) pathway and the target of rapamycin (TOR) pathway extend longevity in a wide range of organisms (Harrison et al., 2009; Mair and Dillin, 2008; Selman et al., 2008; Taguchi and White, 2008). These upstream nutrient signalling pathways might converge and modulate transcription factors. These changes could affect nuclear responses related to mitochondrial functions, as mitochondrial biogenesis or

regulation of ROS production (Csiszar et al., 2008; Page et al., 2010; Sanz et al., 2002). However, little is known about these processes and it is necessarily more work to elucidate the underlying mechanisms.

3. The dietary restriction life-extension effect

3.1. Longevity studies

Dietary restriction (DR; McCay et al., 1935) continues to be the most robust metabolic intervention capable of extending longevity and improving healthspan in diverse organisms including yeast, rotifers, spiders, nematodes, fish, laboratory rodents, and perhaps too in rhesus monkeys and humans (Mair and Dillin, 2008). The life-extension effect of DR in rodents can reach up to 50% (Yu et al., 1982) and it is observed not only when initiated at a young age, but also when started at middle age (Dhahbi et al., 2004; Yu et al., 1985). Besides, DR also mitigates the incidence, time of onset and progression of many age-related pathologies including cardiomyopathy, nephropathy, type-II diabetes, muscle atrophy, hypertension-related diseases, autoimmune diseases and several neurodegenerative disorders like Parkinson's or Alzheimer's disease in rodents (Jang et al., 2012; Martin et al., 2006; Mattson et al., 2002; Weindruch, 2003). Recently, it has been reported that DR also ameliorates detrimental age-related changes in specific metabolic products of lipid and fatty acid metabolism and bile acid biosynthesis in mice (De Guzman et al., 2012).

In rhesus monkeys it was observed that 30% DR strongly decreases age-related mortality (from 37% to 13%), neoplasias (by 50%), cardiovascular diseases (by 50%), diabetes (no incidence at all in the DR group), and age-associated brain atrophy (Wisconsin study, Colman et al., 2009). In aged monkeys, DR also improves glucose regulation, ameliorates task learning and performance (Willette et al., 2012) and preserves total muscle mass (McKiernan et al., 2012). However, a study describing lack of DR effects on the longevity of rhesus monkeys has been recently published (NIA study; Mattison et al., 2012). The reason for the discrepancy between the two available studies with primates is not known although the diets used in the Wisconsin study were semipurified whereas those of the NIA study were not. Using semipurified diets avoids the unexpected presence of undesired substances at levels which could affect the final results obtained. Maybe this methodological difference could justify at least part of the discrepant results concerning the survival outcomes. There were also other differences in dietary composition between both studies including much lower sucrose, the presence of antioxidant flavonoids, or higher vitamin and mineral supplementation in the NIA compared to the Wisconsin study, as well as differences in the source of protein and fat between both investigations. Although the NIA study did not demonstrate lifespan extension, there were benefits concerning age-related diseases (like in the Wisconsin study) in restricted animals and it was concluded that diet composition rather than the calories themselves strongly affect the life-prolonging effect of DR (Mattison et al., 2012). Therefore, taking into account all these considerations, with the information available DR seems to be beneficial regarding mortality and degenerative diseases also in upper primates, although more studies are clearly needed to resolve which are the lifespan effects of DR in primates and human beings.

DR also has benefits for human health (Fontana et al., 2010) similar to those observed in rodents. This nutritional intervention in humans during a mean of six years (3–15 years of 32% DR) protects against obesity, insulin resistance, detrimental effects on heart function and changes in blood pressure, ameliorates hypertension, inflammation and atherosclerosis, and is associated with many of the hormonal changes involved in the signaling of the anti-aging effects of DR in rodents (Fontana et al., 2010; Meyer et al., 2006). Other short-term studies indicated that DR in humans lowers fasting insulin, core body temperature and DNA damage (Heilbronn et al., 2006), lowers risk factors for atherosclerosis and diabetes (Holoszy and Fontana, 2007), and

decreases cardiovascular diseases and possibly cancers (Fontana and Klein, 2007; Omodel and Fontana, 2011).

Other effects of DR in animals are: delays in sexual maturation, decreases in fertility and a lowered final body size together with a depressed growth rate of young animals. These negative effects are in part due to physiological changes induced by DR; among others: decreased fat mass and visceral adiposity, lowered body temperature and decreased plasma glucose, growth hormone (GH), insulin, IGF-1, thyroid stimulating hormone, and gonadotropins (Gems and Partridge, 2001; Mobbs et al., 2001).

Despite a large number of investigations and many decades of scientific work, the precise mechanism/s of longevity extension induced by DR have not been clarified. Many hypotheses have been proposed including those involving changes in the insulin/IGF-1 axis and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway, which affect longevity in a wide range of animals from nematodes to mammals (Harrison et al., 2009; Mair and Dillin, 2008; Selman et al., 2008). These upstream nutrient signaling pathways might converge on common sets of longevity related genes subjected to transcriptional regulation (Liu and Qian, 2011). However, contrasting results have been obtained in the different model organisms. Ames dwarf mice are deficient in pituitary hormones including GH and exhibiting low levels of IGF-1. They live 50% longer than their control siblings (Brown-Borg et al., 1996). DR increases longevity of Ames dwarf mice, supporting the idea that DR and the *df/df* genotype could extend life span at least in part through different mechanisms. However, the observation that DR does not extend the life span of the long-lived growth hormone receptor knockout (GHRKO) mutant mice further complicates the interpretation of these results (Bartke et al., 2001; Bonkowski et al., 2006).

Sirtuins, especially SIRT1 and SIRT3, have been also implicated in the control of life span during DR, although this is currently under debate (Baur, 2010; Burnett et al., 2011). SIRT1 could mediate epigenetic effects during DR, like changes in DNA methylation which could contribute to the longevity response by modifying the expression of nuclear genes (Madrigano et al., 2012; Wakeling et al., 2009). On the other hand, SIRT3, sited at mitochondria, could influence on the regulation of ATP levels, the activity of complex I (Ahn et al., 2008), the modulation of mitochondrial fatty acid oxidation (Hirschey et al., 2010) and mitochondrial ROS production (Koyama et al., 2011). Moreover, it has been found that DR decreases 8-oxodG levels in DNA and prevents age-related hearing loss in wild-type mice but not in SIRT3 $-/-$ deficient mice. Therefore, SIRT3 would be necessary to obtain such beneficial DR-induced effects, which have been attributed to the capacity of this sirtuin to activate mitochondrial isocitric dehydrogenase 2, leading to increased NADPH levels and to a higher GSH/GSSG ratio (Someya et al., 2010).

Other mechanisms possibly involved in the beneficial effect of DR on lifespan are the lowering of mtROS (reviewed in Gredilla and Barja, 2005) and the induction of mitochondrial biogenesis (Anderson and Prolla, 2009; Lopez-Lluch et al., 2006; Nisoli et al., 2005). On the other hand, in *Drosophila melanogaster* it has been reported that DR influences physiology and aging through the trans-sulfuration pathway (Kabil et al., 2011), a highly conserved mechanism directing methionine and its nearest product metabolites to sulfur-containing compounds like cystathionine, GSH, and perhaps important for the MetR beneficial effects, cysteine (Elshorbagy et al., 2011; reviewed in Perrone et al., 2012a). That pathway, under the control of the enzyme cystathionine β -synthase, which is up-regulated in DR in *Drosophila*, is required for the increase in longevity induced by DR in these flies (Kabil et al., 2011).

In any case, among others, proteins like: GH, insulin, IGF-1, as well as sirtuins and mTOR could participate in *pre-nuclear* signaling mechanisms, which could modulate transcription factors like FOXO (Fontana et al., 2010), while the effectors that finally might affect longevity could be in part those modified by the corresponding nuclear

responses. Mitochondrial biogenesis and mtROS production could fall within these possible final effectors.

3.2. Role of mtROS generation and mtDNA oxidative damage

DR experiments reinforce the conclusions obtained in comparative studies since both kinds of investigations strongly suggest that a causal relationship between mtROS production and aging rate exists. The same oxidative stress-related parameter that is lower in long-lived species than in short-lived ones (mtROS) also decreases during DR in rodents (see Gredilla and Barja, 2005 for review). Long-term 40% DR (life-long DR started at 1 year of age) significantly decreases the rate of mtROS in rat tissues including liver, heart and brain (Gredilla and Barja, 2005; Gredilla et al., 2001a,b; Hagopian et al., 2004; Lopez-Torres et al., 2002; Sanz et al., 2005a) as well as in mice (Hagopian et al., 2011; Sohal et al., 1994) and in genetically manipulated mice with total absence of CuZnSOD (Jang et al., 2012). The DR-induced decrease in mtROS also occurs in all the three different mitochondrial fractions isolated by differential centrifugation in mouse liver (Hagopian et al., 2011). Besides, studies in yeast also demonstrate that DR improves efficiency and capacity of the mitochondrial electron transport chain, lowering mtROS (Choi et al., 2011). However, after short term DR (6–7 weeks or 4 months), the decrease in mtROS is observed or not depending on the tissue studied (Gredilla and Barja, 2005; Gredilla et al., 2002). It has been found that 6–7 weeks of DR is enough to decrease mtROS and oxidative damage to mtDNA and nDNA in the case of rat liver (Gredilla et al., 2001b), while other organs require longer times of DR to show the effect on mtROS and mtDNA (Gredilla et al., 2002). In contrast, neither the expression (Weindruch et al., 2001) nor the activity (Jang et al., 2012; Sohal et al., 1994) of the antioxidant enzymes SOD, catalase or GSH-peroxidase change in a consistent way in DR, or in long-lived genetic manipulated organisms (Page et al., 2010). It has been also found that the repair of 8-oxodG in mtDNA through the mitochondrial base excision repair (BER) pathway decreases in kidney and brain (not detected in the case of liver) in DR rats (Gredilla et al., 2010; Stuart et al., 2004).

Both complex I and complex III can generate ROS, but DR significantly decreases mtROS only at complex I (see Gredilla and Barja, 2005). Strikingly, the ROS generator responsible for the low rate of mtROS is situated at the same respiratory complex in the case of DR and in long-lived animal species: at complex I (Barja, 2004b; Gredilla et al., 2001a,b; Lopez-Torres et al., 2002; Sanz et al., 2005a). In contrast with mtROS, the rate of mitochondrial oxygen consumption does not change during DR (Gredilla et al., 2001a,b; Lopez-Torres et al., 2002) in agreement with the lack of variation of the basal metabolic rate of animals subjected to DR (McCarter et al., 1985; Yen et al., 2004). The mechanisms allowing the decrease in mtROS during DR include: 1) quantitative changes: a lower amount of the complex I protein that would produce less ROS; 2) qualitative changes: a decrease in the electronic reduction degree of the complex I generator, because the decrease in mtROS occurs when complex I is only partially reduced but disappears after fully reducing complex I (with pyruvate/malate plus rotenone) (Gredilla et al., 2001a,b; Lopez-Torres et al., 2002; Sanz et al., 2005a), and a decrease in the percentage of free radical leak in the respiratory chain directed to ROS production (%FRL). These changes occur in rat heart, liver and brain mitochondria from dietary restricted animals (Gredilla et al., 2001a,b; Lopez-Torres et al., 2002; Sanz et al., 2005a). Therefore, mitochondria from animals subjected to DR, similarly to those from long-lived species, are more efficient in avoiding ROS generation at the mitochondrial respiratory chain (Gredilla and Barja, 2005).

The decrease in mtROS during DR takes place together with significant decreases in oxidative damage to mtDNA alone, or in mtDNA and nDNA (estimated by measuring the level of 8-oxodG) depending on the organ studied (Gredilla et al., 2001a,b; Lopez-Torres et al., 2002; Sanz et al., 2005a), as well as with lowered oxidative, glycoxidative and

lipoxidative damage to mitochondrial proteins (Lambert et al., 2004; Pamplona et al., 2002b). The available studies suggest that lowering mtROS at complex I is a highly conserved evolutionary mechanism shared by both long-lived and dietary restricted animals that lowers steady-state oxidative damage to macromolecules, especially to mtDNA (Barja, 2004a; Barja and Herrero, 2000; Barja et al., 1994a,b; Gredilla and Barja, 2005), and then the accumulation rate of somatic mutations in mtDNA, and possibly the age-related increase in mtDNA fragment-related mutations in nDNA (Caro et al., 2010), and finally the aging rate (Fig. 1).

Much of the available evidence points to decreases in mitochondrial oxidative stress and insulin signaling as possible contributors to the increase in longevity during DR. Is mitochondrial oxidative stress under the control of insulin signaling? In a study performed in our laboratory with control and DR animals treated with 80%slow–20%fast insulin or GH it was found that the effects of these hormones are complex and can include both increases and decreases in mitochondrial oxidative stress (Sanz et al., 2005b). Animal models capable of dissociating the decrease in mitochondrial oxidative stress from the decreases in insulin-like signaling during DR have been obtained using the every other day feeding model in C57BL/6 mice. When these mice were maintained on this regimen, they showed increases in longevity (Goodrick et al., 1990) and improvements in neuronal resistance to injury, just like in DR, but their plasma IGF-1 levels did not decrease and were even somewhat increased (Anson et al., 2003). This dissociates the increase in longevity from the decrease in IGF-1 observed in DR. In another study from our laboratory it was found that restricting the diet using the every other day feeding method in C57BL/6 mice decreases, like classic DR, mtROS and oxidative damage in mtDNA (Caro et al., 2008a; Gredilla and Barja, 2005) which dissociates the decrease in mtROS generation from insulin/IGF-1 signaling. These studies suggest that the decrease in mtROS in DR would not be under the control of insulin-like signaling, although more studies are needed before firmly establishing this conclusion.

4. Protein and methionine restriction: the effect of a single amino acid

4.1. Effect on longevity extension

After many decades of highly relevant, long and expensive research on the effects of life-long DR in rodents, a rather general consensus was reached among the specialists: calorie intake per se would be exclusively responsible for the increase in lifespan induced by DR in rodents. However, now many studies question this classical consensus (Archer, 2003; Iwasaki et al., 1988; Lopez-Torres and Barja, 2008; Mair et al., 2005; Miller et al., 2005; Orentreich et al., 1993; Piper et al., 2011; Richie et al., 1994; Sun et al., 2009). The results of many investigations are consistent with the possibility that part of the life-extending effects of DR are due to the decreased intake of particular components of the diet, such as proteins, and more specifically the amino acid methionine (Caro et al., 2008b, 2009a,b; Grandison et al., 2009; Lee et al., 2008; Lopez-Torres and Barja, 2008; Mair et al., 2005; Miller et al., 2005; Orentreich et al., 1993; Pamplona and Barja, 2006; Richie et al., 1994; Sanchez-Roman et al., 2011, 2012; Sanz et al., 2004, 2006b; Simpson and Raubenheimer, 2009; Sun et al., 2009). Neither life-long isocaloric carbohydrate nor lipid restriction seems to increase rodent life span. Two available investigations of carbohydrate restriction or supplementation reported contradictory and minor changes in rat longevity (Khorakova et al., 1990; Ross, 1976), whereas it was found that the longevity of Fisher 344 rats does not change after life-long lipid restriction (Shimokawa et al., 1996).

In contrast, the large majority of the investigations on the effects of isocaloric protein restriction in rats and mice found increases in longevity. Ten out of eleven PR studies in rats or mice (16 out of 18

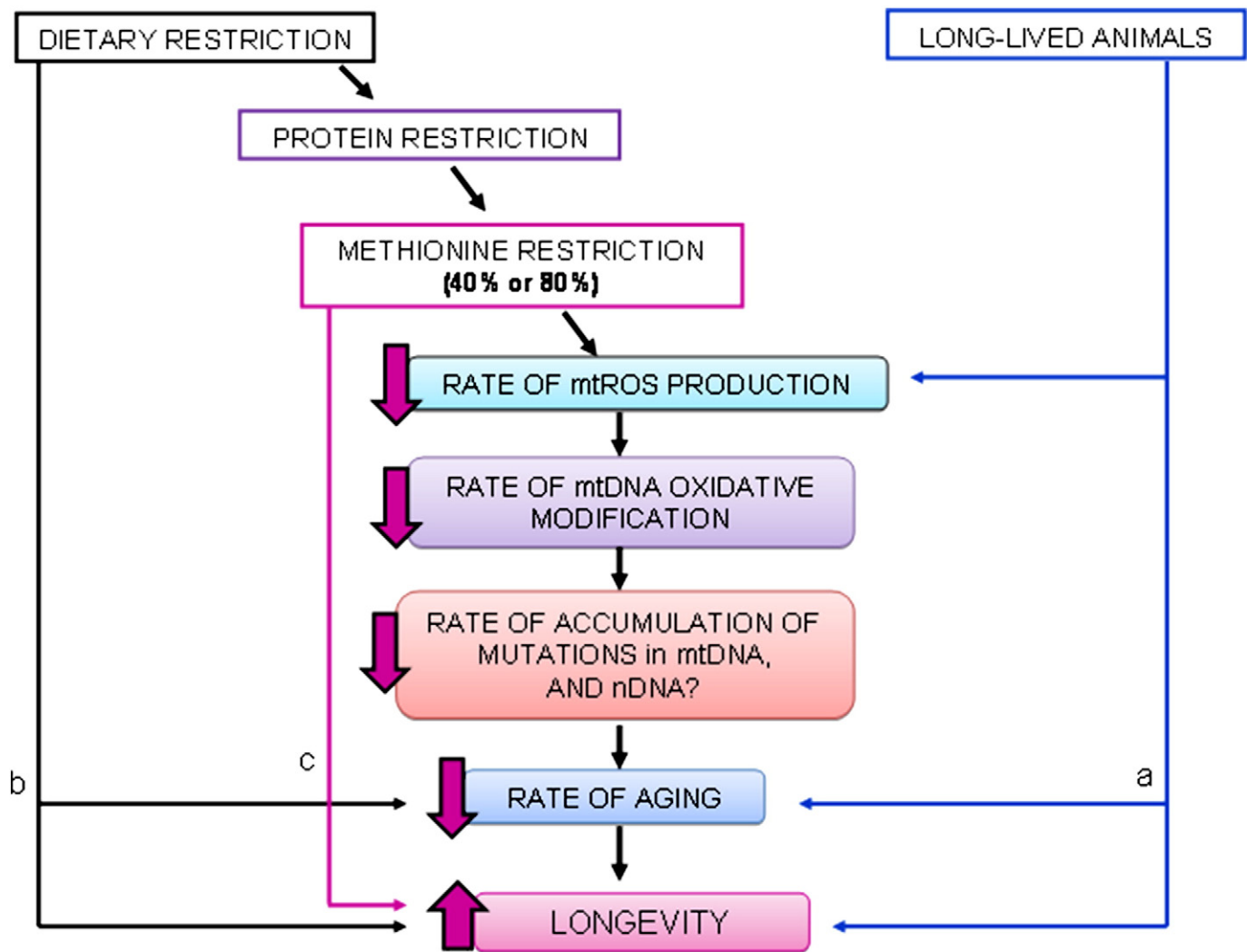


Fig. 1. Mitochondrial oxidative stress and longevity. The rate of mitochondrial ROS production (mtROS_p) and the ensuing oxidative damage to mtDNA are low in long-lived mammals and birds, as well as in dietary (DR), protein (PR) and methionine (MetR) restricted rodents. The lower the endogenous rate of mtROS_p and oxidative damage to mtDNA, the lower the progressive accumulation rate of (irreversible) somatic mutations in mtDNA would be, and maybe also in nDNA through the “insertion of mtDNA fragments inside nDNA” mechanism (Caro et al., 2010). This would contribute to slow down the aging rate which, together with many other necessary differences/changes^{a-c} (Barja, 2008), would increase (maximum) longevity. At least three different longevity gene clusters should exist. The cluster involved in modifying the longevity of different animal species during evolution must be the largest one, followed by that operating in DR, and the likely somewhat smaller one would work in MetR. The low mtROS_p and 8-oxodG in mtDNA from DR and PR animals seem to be induced by their lower level of methionine ingestion. Other unknown mechanisms (b) different from the MetR-mtROS_p-DNA/s mutation pathway should contribute to decrease aging rate in DR.

different life-long survival experiments) reported increases in longevity (reviewed in Pamplona and Barja, 2006, and Lopez-Torres and Barja, 2008), although the mean magnitude of this increase (19.6 %) was lower than that usually found in 40% DR (around 40% increase). Thus PR would be responsible for around half of the life-extension effect of DR.

Which is the amino acid responsible for the increase in longevity exerted by PR? It has been demonstrated that isocaloric 80% methionine restriction (MetR) increases longevity in F344 rats (Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994) and mice (Miller et al., 2005; Sun et al., 2009) to a similar extent than PR (around 18% mean increase) (Table 1). This occurs even when MetR is started as late as at 12 months of age in C6BF1 mice (Sun et al., 2009). Studies performed in *D. melanogaster* have also shown that casein restriction (Min and Tatar, 2006) and methionine restriction (Troen et al., 2007) extend longevity independently of the caloric intake. Moreover, other recent studies link essential amino acids, and again especially methionine, with the positive effect of DR on longevity in yeast (Petti et al., 2011) and *D. melanogaster* (Grandison et al., 2009; Kabil et al., 2011). Interestingly, PR performed in rats, results in profound changes in methionine and

serine metabolism (including lowering cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase activities) and increases in fatty acid oxidation (Kalhan et al., 2011).

In addition to extending lifespan, 80% MetR also decreases disease-associated markers and the incidence of age-related degenerative diseases. The beneficial effects of this intervention in rodents include decreases in serum glucose, insulin, IGF1, cholesterol, triglycerides and leptin (Table 2). Besides, MetR protects against age-related changes in immunity, slows cataract development (Miller et al., 2005), improves colon tight junction barrier function (Ramaligan et al., 2010) and improves metabolic flexibility and increases respiratory uncoupling (Hasek et al., 2010). MetR may be also an important strategy to inhibit tumor growth particularly in many cancers that exhibit the known phenomenon of “methionine dependence”. These include bladder, breast, colon, glioma, kidney, melanoma, prostate and other cancers in which tumor cells have a much greater reliance on methionine than normal cells do (Hoffman, 1985; Komninou et al., 2006). They need this amino acid for survival and proliferation and their growth seems seriously limited or inhibited in the absence of methionine (reviewed in Cavuto and Fenech, 2012). Adding homocysteine instead of

methionine in the culture medium can halt the growth of many cancer cells while allowing the continued growth of non-transformed cells (Cao et al., 2002).

Regarding the beneficial effects of MetR (80%) on adiposity, this intervention reduces total adipose tissue mass and lowers visceral fat by 70% (by more than 40% after correcting for the decrease in body mass; Malloy et al., 2006) in association with an improvement in insulin sensitivity (Malloy et al., 2006) (Table 2). In addition, MetR decreases leptin and increases adiponectin in rodents in agreement with the decrease in visceral adiposity and the size of white adipose tissue depots. These beneficial effects seem to be mediated by tissue-specific responses that favor increased mitochondrial function and biogenesis, fatty acid oxidation and total energy expenditure possibly mediated by β -adrenergic receptor signaling and changes in lipid homeostasis (Perrone et al., 2012a). In this line, a recent metabolomic and genomic MetR study found changes in the expression of a large number of genes and proteins that led the authors to conclude that MetR increases lipid metabolism in adipose tissue and muscle whereas it decreases lipid synthesis in the liver (Perrone et al., 2012b). Therefore, these changes in lipid metabolism seem to be involved in the strong decrease in adiposity and increased insulin sensitivity observed in isocaloric MetR.

MetR also leads to altered levels of sulfur-containing amino acids: serum levels of methionine, cysteine, cystathionine, and taurine decrease in MetR rats, whereas homocysteine levels (Elshorbagy et al., 2011) and GSH (Richie et al., 1994) increase. Interestingly, adding cysteine to the MetR diet reverses most of the studied beneficial changes on adiposity and insulin resistance (Elshorbagy et al., 2011) and increases the transcription of various genes associated with inflammation and carcinogenesis (Perrone et al., 2012b). Therefore, the beneficial changes of MetR diet have been attributed to the decrease of cysteine in serum (Elshorbagy et al., 2011) or liver (Perrone et al., 2012b) observed in animals subjected to MetR diet.

On the other hand, excessive intake of dietary methionine is toxic. This toxicity far exceeds that produced by any other amino acid (Harper et al., 1970), leading to damage in some vital organs and

increases in tissue oxidative stress (Gomez et al., 2009; Park et al., 2008) with similar negative effects to those observed in rats fed diets with a high protein content. Chronic and excessive methionine supplementation increases plasma hydroperoxides and LDL-cholesterol (Hidioglu et al., 2004), induces vascular (Troen et al., 2003) and kidney damage with tubular hypertrophy (Kumagai et al., 2002), raises iron accumulation and lipid peroxidation, and leads to liver dysfunction (Mori and Hirayama, 2000), besides other alterations in other organs. In addition, methionine supplementation strongly increases methionine and its two more nearly derived methionine cycle metabolites, S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosylhomocysteine (SAH), in rat liver and kidney (Gomez et al., 2009). Some of the harmful effects have been attributed to these methionine-related metabolites like SAM, SAH, or homocysteine, rather than to methionine itself, although in other cases a direct methionine toxic effect has been suggested (Harper et al., 1970; Troen et al., 2007). This last case fits well with our observation that direct addition of methionine to isolated mitochondria in vitro increases their rate of mtROS in liver and kidney although not in heart or brain rat mitochondria (Gomez et al., 2011).

Oxidation of methionine residues in proteins generates methionine sulfoxide depriving them of their function as methyl donors and may lead to loss of their biological activity (Ciorba et al., 1997). This modification can be repaired by methionine sulfoxide reductase in a thioredoxin-dependent reaction. In this context it is interesting that overexpression of methionine sulfoxide reductase increases longevity in *D. melanogaster* (Chung et al., 2010) and the opposite manipulation, knocking out the same enzyme, increases protein carbonyls and decreases longevity (Moskovitz et al., 2001). There is evidence that this enzyme plays an important role in protection against oxidative, cold, and heat stress and in the regulation of aging in *D. melanogaster* (Lim et al., 2012). Also in agreement with a methionine role in aging, it has been reported that long-lived Ames dwarf mice have an altered methionine metabolism showing a marked increase in the transsulfuration pathway compared to their wild-type siblings (Uthus and Brown-Borg, 2006). All the above results point to methionine as the single dietary factor responsible for part of the longevity extension effect of DR.

4.2. Role of mtROS generation and oxidative damage

What is the specific dietary component responsible for the decreases in mtROS production and oxidative damage to mtDNA during DR? In agreement with their lack of effect on longevity (Khorakova et al., 1990; Ross, 1976; Shimokawa et al., 1996), neither isocaloric 40% lipid restriction (Sanz et al., 2006c) nor isocaloric 40% carbohydrate restriction (Sanz et al., 2006d) changes mtROS or 8-oxodG in mtDNA. However, isocaloric 40% PR does decrease mtROS and oxidative damage to mtDNA in rat liver (Sanz et al., 2004) in a strikingly similar way, quantitatively and qualitatively (Sanz et al., 2004), to 40% DR. The effect of PR was studied in rat liver without changing the amount eaten per day of the other dietary components and it was found, like in 40% DR, that 40% PR decreases liver mtROS specifically at complex I, lowers %FRL and 8-oxodG in mtDNA (Sanz et al., 2004), and decreases the five specific markers of protein purely oxidative, glycooxidative and lipoxidative modification studied, as well as the complex I protein content in rat liver mitochondria and tissue (Ayala et al., 2007). Strikingly, the direction of change, the magnitude, mechanisms and site of action exerted by PR on mtROS and 8-oxodG in mtDNA are very similar to those found in 40% DR (Lopez-Torres and Barja, 2008). Taken together, those studies suggest that proteins are the dietary components responsible for the decreases in mtROS and oxidative damage to mitochondrial macromolecules that takes place in DR, and for part of the increase in longevity during DR.

It was logical to suspect that dietary methionine could be involved in those PR and DR effects since it was already known that MetR, independent of energy restriction, increases rat (maximum) longevity

Table 2

Beneficial effects of methionine restriction (MetR) in rats and mice.

Species	Parameter	Reference
Fisher 344 rat	↓ Fat pad	Orentreich et al. (1993)
	↓ Visceral adiposity	Malloy et al. (2006)
	↓ Adipocyte size in all WAT depots ^a	Perrone et al. (2008)
	↓ Serum insulin and glucose	Perrone et al. (2010)
Mice (CB6BF1)	↓ Serum insulin and glucose	Miller et al. (2005)
	↓ Serum IGF-1	Malloy et al. (2006), Perrone et al. (2010)
Fisher 344 rat	↓ Serum IGF-1	Miller et al., 2005
Mice (CB6BF1)	↓ Serum cholesterol	Malloy et al. (2006), Perrone et al. (2010)
	↓ Serum cholesterol	Miller et al. (2005)
Fisher 344 rat	↓ Serum triglycerides	Perrone et al. (2010)
Fisher 344 rat	↓ Serum leptin	Perrone et al. (2010)
Fisher 344 rat	↓ Serum thyroxine levels	Malloy et al. (2006), Perrone et al. (2010)
Mice (CB6BF1)	↓ Total T4 levels	Miller et al. (2005)
Mice (CB6BF1)	↓ Cataract development	Miller et al. (2005)
Mice (CB6BF1)	↓ Of the decrease in T cells with age	Miller et al. (2005)

CB6F1 = (BALB/c × C57BL/6) F1; ↓ = decrease.

^a Inguinal, epididymal, mesenteric and retroperitoneal. WAT = White adipose tissue.

Table 3

Changes in mitochondrial oxidative stress-related parameters in methionine restricted (MetR), amino acid restricted (except for methionine; RESTAAS) and methionine supplemented (MetS) rats.

Dietary manipulation	Organ	mtROSp	Content of respiratory complexes	FRL (%)	8-oxodG in mtDNA	Oxidat. protein modific. ^a	Reference
80% MetR ^b	Liver	↓at Cx I ↓at CxIII	↓Cxl/IV	↓at Cx I	↓	↓	Sanz et al. (2006b)
	Heart	↓at CxI	↓Cxl/IV	↓at CxI	↓	↓	
80% MetR ^b	Liver	↓at Cx I ↓at CxIII	↓Cxl/II/III/IV	↓at CxI	↓	↓	Caro et al. (2008b)
	Liver	↓at CxI ↓at CxIII	↓Cxl/II/III/IV	↓at CxI	↓	↓	Caro et al. (2008b)
40% MetR ^c	Liver	↓at Cx I ↓at CxIII	↓Cxl/II/III/IV	↓at CxI	↓	↓	Caro et al. (2009a)
	Brain	↓at Cx I	↓Cxl/II/III/IV	↓at Cx I	=	↓	Caro et al. (2009a)
40% MetR ^c	Kidney	↓at Cx I	↓Cx IV	↓Cx I	↓	↓	
	Heart	↓at Cx I	=	n.d.	↓	↓	Sanchez-Roman et al. (2011)
40% MetR ^c at old age	Liver	↓at Cx I	↑CxIV	↓	↓	↓	Sanchez-Roman et al. (2012)
40% RESTAAS ^d	Liver	=	=	=	=	↓	Caro et al. (2009b)
2.5% MetS ^e	Liver	↑at CxI	↓Cx IV	↑at CxI	↑	=	Gomez et al. (2009)
	Heart	=	=	=	=	=	

Cx = respiratory complex; mtROSp = rate of mitochondrial ROS production; %FRL = percent free radical leak at the respiratory chain; 8-oxodG (8-oxo-7,8-dihydro-2o-deoxyguanosine) by HPLC-EC.

^a Purely oxidative (the protein carbonyls glutamic and amino adipic semialdehydes), glycoxidative (Carboxyethyl-lysine; Carboxymethyl-lysine-CML), and lipoxidative (CML and MDA-lysine) protein modifications (GC-MS) in mitochondria (except for Gomez et al., 2009, in total tissue). = No change; ↑ increase; ↓ decrease; n.d. not determined. Semipurified diets (Biobink USA) based on AIN-76G or AIN-93G formulations were given during 6–7 weeks starting at 6–7 weeks of age except in Sanchez-Roman et al., 2012 (started at 24 months of age).

^b Control diet: 0.86% methionine; MetR diet: 0.17% methionine.

^c Control diet: 0.86% methionine; MetR diet: 0.52% methionine.

^d The RESTAAS diet contained 40% less of all the dietary amino acids, except for methionine that was present at same concentration in the two diets.

^e Control diet: 0.86% methionine; methionine supplemented diet: 2.5% methionine.

(Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994) while such effect had not been described for any of the other dietary amino acids. This is why in our laboratory we decided to study the effects of MetR on mtROSp and oxidative stress (Table 3). Isocaloric MetR (80% and 40%), applied to young rats during 7 weeks, lowers mtROSp (mainly at complex I), the % FRL, the complex I content, 8-oxodG in mtDNA, and specific markers of protein oxidative, glycoxidative and lipoxidative modification in rat heart (80% MetR; Sanz et al., 2006b; 40% Sanchez-Roman et al., 2011) or liver (40% and 80% MetR; Caro et al., 2008b) mitochondria, similarly to what occurs after 7 weeks of 40% MetR in rat kidney and brain mitochondria (Caro et al., 2009a; Naudi et al., 2007). In order to obtain these decreases it was enough to restrict methionine by 40%. 80% MetR led to a similar decrease in 8-oxodG than 40% MetR, while the decrease in mtROSp in 80% MetR was only somewhat more intense than in 40% MetR, being the decrease in mtROSp from control to 40% MetR more pronounced than that occurring between 40% MetR and 80% MetR.

Interestingly, in another experiment, when all the dietary amino acids except methionine were restricted (by 40%) during 7 weeks, neither the rate of mtROSp nor the level of 8-oxodG in mtDNA was modified. In addition, we have recently found that 40% MetR also decreases mtROSp, %FRL and 8-oxodG in mtDNA and reverses aging-related increases in protein modification when implemented at old age (during 7 weeks in 24 month old rats; Sanchez-Roman et al., 2012). All those results, taken together, indicate that the lowered ingestion of methionine during MetR (and PR and DR) is responsible for the decreases in mitochondrial ROSp and oxidative stress observed in MetR (and PR and DR), and possibly for all (during PR and MetR) or part (during DR) of the life-extension effect observed during these dietary manipulations. Moreover, the extraordinary capacity of a single dietary molecule to induce the decrease in mtROSp is still present in old rats.

Concerning the mechanisms responsible for the decrease in mtROS production during MetR (Fig. 2), there are various possibilities described previously in the DR section. A simple mechanism is based on a decrease in the content of the complex I protein in MetR that would directly lead to a decreased rate of mtROSp. This has been reported under 40% MetR in the majority of tissues studied (Table 3), also during DR and PR, as well as in long-lived birds (pigeons, canaries and parakeets) compared to the much short-lived mammals (rats and

mice) of similar body size (Lopez-Torres and Barja, 2008; Pamplona et al., 2005; St-Pierre et al., 2002). But this cannot be the whole explanation. MetR also induces qualitative changes in mitochondria since not only generate less ROS but they have a lower %FRL and a lower electronic reduction state of the complex I ROS generator (the decrease in mtROSp is observed, like in DR, with partial complex I reduction but not with full reduction). Thus, MetR mitochondria (from both young and old animals) are more efficient in avoiding mtROS generation. They leak less radicals per unit of electron flow in the respiratory chain, similarly to what has been found in long-lived compared to short-lived animals as well as in DR and PR rats compared to their controls (Barja, 2004a,b).

These quantitative and qualitative changes can be due to: a) direct interaction of methionine, or more likely, of a more chemically reactive methionine metabolite with the mitochondria or some critical complex I polypeptide/s; b) changes in cellular signaling molecules and the ensuing modification of specific gene expression; and c) decreases in the matrix NADH (which feeds electrons to complex I) thus lowering the state of electronic reduction of the complex I generator, due to decreases in the amounts of mitochondrial substrates.

Regarding mechanism "a": recent studies have shown that the direct addition of methionine to isolated functional mitochondria freshly obtained from rats increases their rates of mtROSp (Gomez et al., 2011). Therefore a rather direct and rapid effect of methionine (or a closely derived reactive metabolite) on complex I in vivo seems to occur. However, this action could be due to a chemically reactive methionine metabolite. This possibility is most relevant because in the methionine molecule, differing from homocysteine or cysteine, the potentially reactive sulfur is located inside the molecule and it is not available for direct covalent chemical reaction with protein thiols. Interestingly, it has been recently observed that the reaction of methionine with hydroxyl radicals generates methionine radical carbon-, nitrogen- and sulfur-centered radicals as intermediates in the formation of the methanethiol product, as detected by EPR spin trap techniques and GC-FID and GC-MS techniques (Spasojević et al., 2012). These radicals or methanethiol (CH₃SH) itself could react with complex I or some of its subunits leading to increases in mtROS generation. Since it is known that GSSG thiolization of isolated complex I increases its rate of ROS production (Taylor et al., 2003) a similar reaction of methanethiol, or cysteine (which also has a free thiol group available for direct reaction) with

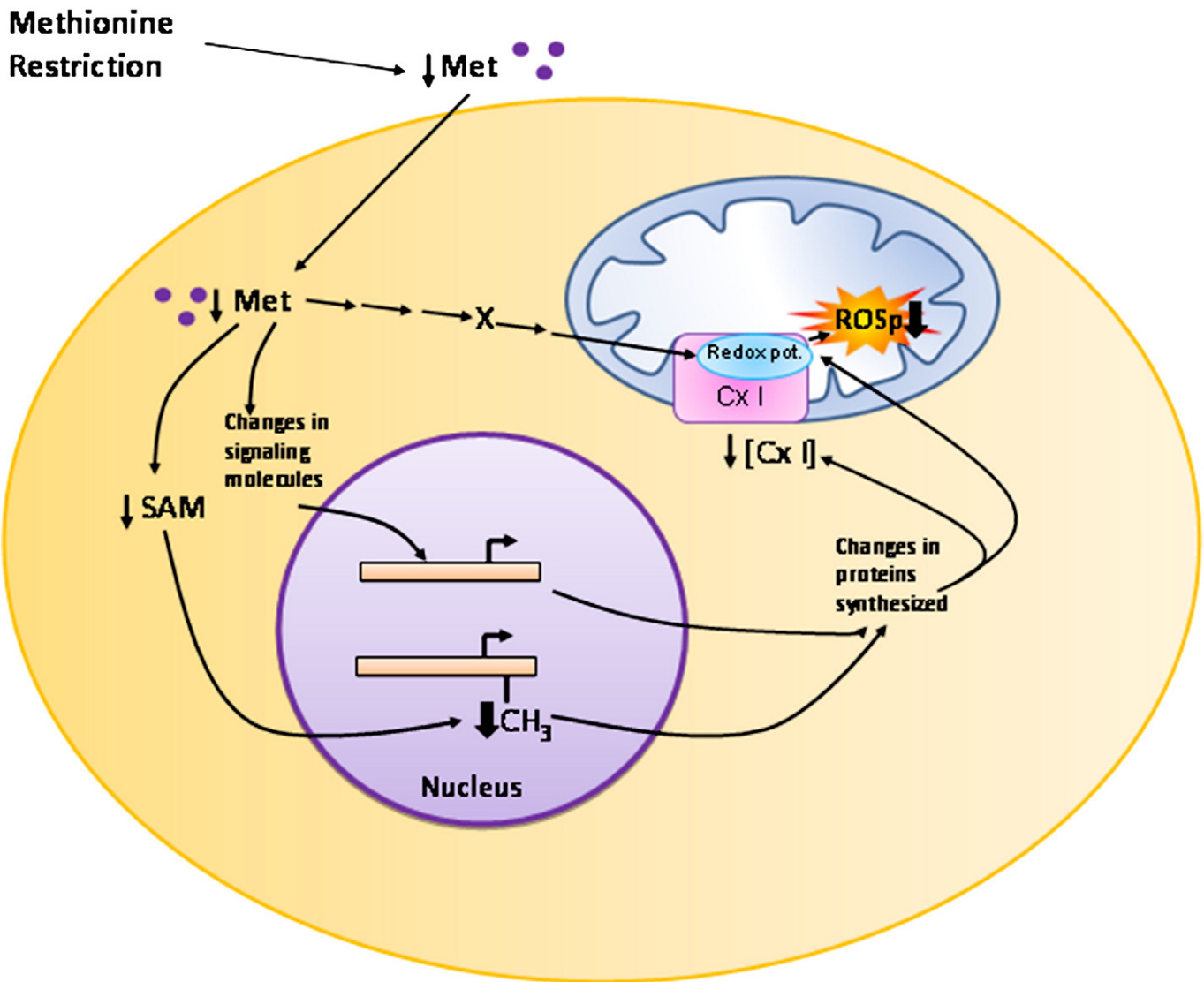


Fig. 2. How MetR can decrease mitochondrial ROS production. The scheme summarizes the possible pre- and post-nuclear acting mechanisms potentially responsible for the decrease in mtROS production induced by MetR. Dietary methionine restriction decreases tissue cytosolic methionine levels. This can: a) increase the midpoint redox potential of the complex I ROS generator (thus lowering mtROS_p and %FRL), possibly due to decreased thiolization or chemical interaction with some complex I subunit/s. These effects have been attributed to methionine metabolites rather than to methionine itself; b) modify cellular cytosolic signaling molecules which modulate specific gene expression; and c) decrease the S-adenosylmethionine (SAM) cytosolic concentration which would decrease nuclear DNA methylation and it could modify gene expression. The resulting post-nuclear mechanisms can: 1) decrease the amount of complex I per mitochondrial mass, which would tend to decrease mtROS_p; and 2) increase the midpoint redox potential of the complex I ROS generator (thus lowering mtROS_p and %FRL). There are multiple pre-nuclear signaling mechanisms involved in DR (and likely in MetR), but few post-nuclear final effector mechanisms have been described: the decrease in mtROS_p in MetR, PR and DR as well as the increase in mitochondrial biogenesis (better documented in DR). The simultaneous operation of these two post-nuclear changes will produce more mitochondria with a lower generation rate of mtROS and DNA damage. This could contribute to increase longevity in coordination with the many other necessary changes modulated by the DR and MetR longevity gene clusters. SAM = S-adenosyl-methionine; Redox pot. = midpoint redox potential of the complex I ROS generator.

complex I thiol groups could be involved in the decrease in mtROS_p in MetR. This dietary manipulation decreases hepatic methionine and cysteine (Perrone et al., 2012b) and likely methanethiol levels, which can decrease thiolization of complex I subunits and then their rates of mtROS_p. Alternatively, cysteine could also interact with the protein cysteines of some of the FeS clusters of the hydrophilic arm of complex I, leading to iron release or availability for reaction and then ROS generation. Lower cysteine levels in MetR could also decrease mtROS_p through this mechanism.

Concerning the changes in gene expression possibly involved in the MetR effects (mechanism “b”), a recent genomic MetR study found changes in the expression of a large number of genes and proteins involved in lipid metabolism (Perrone et al., 2012b). In addition, modifications of DNA methylation could be also involved (Passarino

et al., 2010; Robert et al., 2010). Methionine is an essential amino acid with many key roles in mammalian metabolism including protein synthesis and function, as well as protein and DNA methylation (Brosnan and Brosnan, 2006). Since ageing seems to be associated with site-specific changes in DNA methylation (Cedar and Bergman, 2012; Christensen et al., 2009; Heyn et al., 2012; Maegawa et al., 2010; Wakeling et al., 2009), MetR diets could extend longevity in rodents through various changes including modulation of DNA methylation patterns, specific changes in gene expression, and changes in translation rates, whose effects could include decreases in mtROS generation and oxidative damage (Fig. 2). In agreement with that, we have recently detected that MetR induces a small but statistically significant decrease in global genomic DNA methylation in rat liver of young immature rats (Sanchez-Roman et al., 2011), whereas when

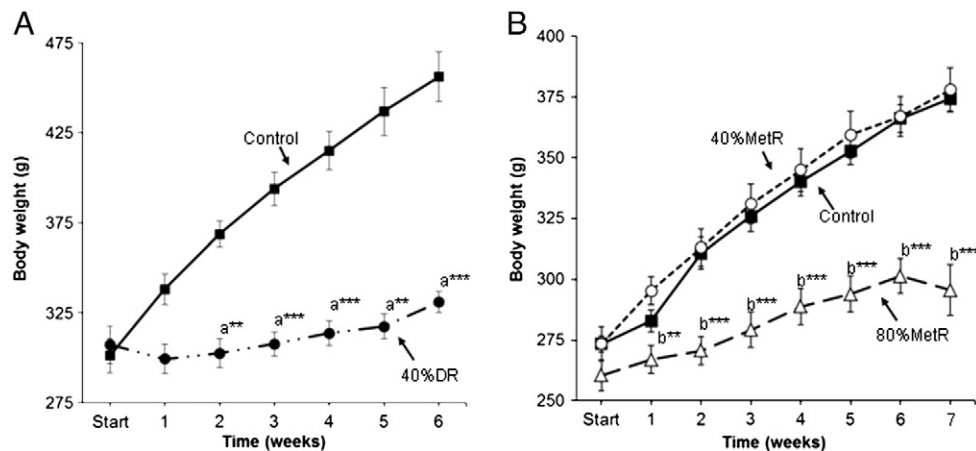


Fig. 3. Body weight and growth rate of male Wistar rats in 40% DR (A), 40% and 80% MetR (B), and their respective controls (A and B). Animals were fed semipurified diets (ICN Biolink, USA) based on the AIN-93G diet. Each point represents the mean \pm SEM from 10 different individuals. The experiments started with animals of 6–7 weeks of age. Significant differences: ^abetween 40% DR and their controls; ^bbetween 80% MetR and 40% MetR; ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$. No significant differences in body weights were found between control and 40% MetR at any time of experimentation. Data come from experiments in Gredilla et al. (2001a,b) (A) or Caro et al. (2008b) (B).

this manipulation was performed in old rats the decrease in this parameter did not reach statistical significance (Sanchez-Roman et al., 2012).

Concerning mechanism “c”: decreased NADH, it is more likely in DR than in MetR, due to the large number of metabolites than can potentially be decreased because of the lower caloric ingestion. In fact there is a published study in which it was shown that pyruvate, malate, and succinate, as well as NADH and the NADH/NAD⁺ ratio are decreased in the tissues of DR animals (Burch et al., 1970).

In summary, DR, PR and MetR are nutritional interventions that increase longevity in rodents, although the magnitude of the longevity extension of MetR and PR in rodents is around 50% that of DR. This lower but significant life extension effect in MetR than in DR would agree with the widely held notion that aging and longevity have more than one cause. Restriction of methionine intake can be responsible for part of the aging-delaying effects of DR by decreasing mtROS_p and oxidative damage to mtDNA and macromolecules, acting at least in this sense as a “DR-mimic”. All that suggests that methionine is the single dietary substance responsible for the beneficial changes of DR on mitochondrial oxidative stress. The remaining effects of DR on aging rate could be due to decreases in other dietary components or in the calories themselves through different additional mechanisms (Fig. 1, arrow marked as “?”). In any case, it is interesting that 40% MetR can decrease mitochondrial oxidative stress, because this dietary manipulation, (or PR), does not imply the strong behavioral and nutritional stress of caloric restriction and thus seems a much more feasible option for wide application to human populations. Most importantly, negative effects such as delays in puberty, and decreases in growth rate and final body size are shared by DR and 80% MetR but do not occur in 40% MetR (Fig. 3). Methionine restriction at the 40% level is potentially advantageous because it lowers mtROS_p and 8-oxodG in mtDNA to a similar extent than 80% MetR, while totally avoiding the decreases in body and organ weight, growth rate, maturation and likely final body size that takes place in 80% MetR and 40%DR (Fig. 3).

It is becoming clear that health benefits can be obtained using “prudent” diets largely based on the consumption of complex carbohydrates, emphasizing vegetables with proteins rich in essential amino acids but low in the sulphur-containing amino acids methionine and cysteine (like pulses), or almost totally lacking methionine and cysteine (like fruits and vegetables), and avoiding the presently excessive intake of animal proteins (as well as fats). The results already available about PR in humans seem to be positive for human health and of similar character than those found in DR after up to

6 years of intervention in human beings (Fontana et al., 2008). These studies suggest that DR and PR can protect from obesity, mortality, and degenerative diseases including at least cardiovascular ones, diabetes and cancer, and can increase the human healthspan. MetR, implemented at 40%, should be investigated in more depth concerning mechanisms, detailed effects, and times of application, as well as its possible effects on longevity.

5. Conclusions

1. Long-lived mammals have low rates of mitochondrial ROS production and oxidative damage in mtDNA.
2. Dietary restriction (DR) decreases the rate of mitochondrial ROS production at complex I and oxidative damage to mtDNA and proteins, and extends the maximum life span of most or all the animal species studied to date.
3. The respiratory complex related to aging, longevity, and mtROS generation, both concerning comparisons between mammalian and bird species with different longevity, as well as dietary restriction, is complex I, not complex III.
4. Both protein restriction (PR) and methionine restriction (MetR) similarly increase maximum longevity in rodents, although the magnitude of these increases seems to be around half that usually found in DR. Both interventions also decrease mitochondrial ROS production at complex I, the %FRL, and 8-oxodG in mtDNA to a similar extent, quantitatively and qualitatively, as DR.
5. Restriction of all the dietary amino acids except methionine does not modify mitochondrial ROS production, the %FRL, or oxidative damage to mtDNA.
6. Methionine is the single dietary nutrient responsible for the decrease in mitochondrial ROS production and oxidative stress, and possibly for part of the increase in longevity that takes place during DR (and PR).
7. MetR animals resemble DR animals in many traits including low levels of insulin and IGF-1, low adiposity, low rates of mitochondrial ROS generation and oxidative stress, and longer mean and maximum lifespan. However, DR seems to exert a stronger life extension effect than MetR.

Conflict of interests statement

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The results obtained at our laboratory described in this review have been supported by grant nos. BFU2008-0335 and BFU2011-23888 from the Ministry of Science and Innovation, and no. UCM/BIO-2648 GR74/07-CCG07 Madrid Community-UCM to G. Barja. I. Sanchez-Roman received a pre-doctoral FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education.

References

- Ahn, B.H., Kim, H.S., Song, S., Lee, I.H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C.X., Finkel, T., 2008. A role for the mitochondrial deacetylase SIRT3 in regulating energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14447–14452.
- Anderson, R., Prolla, T., 2009. PGC-1alpha in aging and anti-aging interventions. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1059–1066.
- Anson, R.M., Guo, Z., de Cabo, R., Iyuni, T., Rios, M., Hagepanos, A., Ingram, D.K., Lane, M.A., Mattson, M.P., 2003. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6216–6220.
- Archer, V.E., 2003. Does dietary sugar and fat influence longevity? *Med. Hypotheses* 60, 924–929.
- Ayala, V., Naudi, A., Sanz, A., Caro, P., Portero-Otin, M., Barja, G., Pamplona, R., 2007. Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62, 352–360.
- Barja, G., 2004a. Free radicals and aging. *Trends Neurosci.* 27, 595–600.
- Barja, G., 2004b. Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 79, 235–251.
- Barja, G., 2008. The gene cluster hypothesis of aging and longevity. *Biogerontology* 9, 57–66.
- Barja, G., 2010. *Longevity and evolution.* Nova Science Publishers, Inc, New York, USA, pp. 1–194.
- Barja, G., Herrero, A., 1998. 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.* 30, 235–243.
- Barja, G., Herrero, A., 2000. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.* 14, 312–318.
- Barja, G., Cadenas, S., Rojas, C., Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., 1994a. A decrease of free radical production near critical targets as a cause of maximum longevity in animals. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 108, 501–512.
- Barja, G., Cadenas, S., Rojas, C., Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., 1994b. Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Radic. Res.* 21, 317–327.
- Bartke, A., Wright, J.C., Mattison, J.A., Ingram, D.K., Miller, R.A., Roth, G.S., 2001. Extending the lifespan of long-lived mice. *Nature* 414, 412.
- Baur, J.A., 2010. Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. *Mech. Ageing Dev.* 131, 261–269.
- Bonkowski, M.S., Rocha, J.S., Masternak, M.M., Al Regaiey, K.A., Bartke, A., 2006. Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7901–7905.
- Boveris, A., Cadenas, E., 1975. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* 54, 311–314.
- Boveris, A., Cadenas, E., Stoppani, A.O.M., 1976. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 156, 435–444.
- Brand, M.D., 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45, 466–472.
- Brosnan, J.T., Brosnan, M.E., 2006. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J. Nutr.* 136, 1636S–1640S.
- Brown-Borg, H.M., Borg, K.E., Meliska, C.J., Bartke, A., 1996. Dwarf mice and the ageing process. *Nature* 384, 33.
- Burch, H.B., Lowry, O.H., Bradley, M.E., Max, P.F., 1970. Hepatic metabolites and cofactors in riboflavin deficiency and calorie restriction. *Am. J. Physiol.* 219, 409–415.
- Burnett, C., Valentini, S., Cabreiro, F., Goss, M., Somogyvári, M., Piper, M.D., Hoddinnott, M., Sutphin, G.L., Leko, V., McElwee, J.J., Vazquez-Manrique, R.P., Orfila, A.M., Ackerman, D., Au, C., Vinti, G., Riesen, M., Howard, K., Neri, C., Bedalov, A., Kaerberlein, M., Soti, C., Partridge, L., Gems, D., 2011. Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature* 477, 482–485.
- Cao, W.X., Ou, J.M., Fei, X.F., Zhu, Z.G., Yin, H.R., Yan, M., Lin, Y.Z., 2002. Methionine-dependence and combination chemotherapy on human gastric cancer cells in vitro. *World J. Gastroenterol.* 8, 230–232.
- Caro, P., Gómez, J., López-Torres, M., Sánchez, I., Naudi, A., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Barja, G., 2008a. Effect of every other day feeding on mitochondrial free radical production and oxidative stress in mouse liver. *Rejuvenation Res.* 11, 621–629.
- Caro, P., Gómez, J., López-Torres, M., Sánchez, I., Naudi, A., Jove, M., Pamplona, R., Barja, G., 2008b. Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 9, 183–196.
- Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., Naudi, A., Ayala, V., Lopez-Torres, M., Pamplona, R., Barja, G., 2009a. Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. *Rejuvenation Res.* 12, 421–434.
- Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., Garcia, R., López-Torres, M., Naudi, A., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Barja, G., 2009b. Effect of 40 % restriction of dietary amino acids – except methionine – on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology* 10, 579–592.
- Caro, P., Gómez, J., Arduini, A., González-Sánchez, M., González García, M., Borrás, C., Viña, J., Puertas, M.J., Sastre, J., Barja, G., 2010. Mitochondrial DNA sequences are present inside nuclear DNA in rat tissues and increase with age. *Mitochondrion* 10, 479–486.
- Cavuto, P., Fenech, M.F., 2012. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treat Rev.* 38, 726–736.
- Cedar, H., Bergman, Y., 2012. Programming of DNA methylation patterns. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 97–117.
- Choi, J.S., Choi, K.M., Lee, C.K., 2011. Caloric restriction improves efficiency and capacity of the mitochondrial electron transport chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 308–314.
- Christensen, B.C., Houseman, E.A., Marsit, C.J., Zheng, S., Wrensch, M.R., Wiemels, J.L., Nelson, H.H., Karagas, M.R., Padbury, J.F., Bueno, R., Sugarbaker, D.J., Yeh, R.-F., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T., 2009. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet.* 5, e1000602.
- Chung, H., Kim, A.K., Jung, S.A., Kim, S.W., Yu, K., Lee, J.H., 2010. The *Drosophila* homolog of methionine sulfoxide reductase A extends lifespan and increases nuclear localization of FOXO. *FEBS Lett.* 584, 3609–3614.
- Ciorba, M.A., Heinemann, S.H., Weissbach, H., Brot, N., Hoshi, T., 1997. Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9932–9937.
- Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Cruzen, C., Simmons, H.A., Kemnitz, J.W., Weindruch, R., 2009. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325, 201–204.
- Csiszar, A., Labinskyy, N., Perez, V., Recchia, F.A., Podlutzky, A., Mukhopadhyay, P., Losonczy, G., Pacher, P., Austad, S.N., Bartke, A., Ungvari, Z., 2008. Endothelial function and vascular oxidative stress in long-lived GH/IGF-deficient Ames dwarf mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H1882–H1894.
- De Guzman, J.M., Ku, G., Fahey, R., Youm, Y.H., Kass, I., Ingram, D.K., Dixit, V.D., Kheterpal, I., 2012. Chronic caloric restriction partially protects against age-related alteration in serum metabolome. *Age (Dordr).* <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-012-9430>.
- Dhabhi, J.M., Kim, H.J., Mote, P.L., Beaver, R.J., Spindler, S.R., 2004. Temporal linkage between the phenotypic and genomic responses to caloric restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5524–5529.
- Elshorbagy, A.K., Valdivia-Garcia, M., Mattocks, D.A., Plummer, J.D., Smith, A.D., Drevon, C.A., Refsum, H., Perrone, C.E., 2011. Cysteine supplementation reverses methionine restriction effects on rat adiposity: significance of stearoyl-coenzyme A desaturase. *J. Lipid Res.* 52, 104–112.
- Fontana, L., Klein, S., 2007. Aging, adiposity, and calorie restriction. *JAMA* 7, 986–994.
- Fontana, L., Weiss, E.P., Villareal, D.T., Klein, S., Holloszy, J.O., 2008. Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. *Ageing Cell* 7, 681–687.
- Fontana, L., Partridge, L., Longo, V.D., 2010. Extending healthy life span – from yeast to humans. *Science* 328, 321–326.
- Gems, D., Partridge, L., 2001. Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 287–292.
- Genova, M.L., Ventura, B., Giuliano, G., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti Castellani, G., Lenaz, G., 2001. The site of production of superoxide radical in mitochondrial complex I is not a bound semiquinone but presumable iron-sulphur cluster N2. *FEBS Lett.* 505, 364–368.
- Gomez, J., Caro, P., Sanchez, I., Naudi, A., Jove, M., Portero-Otin, M., Lopez-Torres, M., Pamplona, R., Barja, G., 2009. Effect of methionine dietary supplementation on mitochondrial oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver and heart. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 309–321.
- Gomez, J., Sanchez-Roman, I., Gomez, A., Sanchez, C., Suarez, H., Lopez-Torres, M., Barja, G., 2011. Methionine and homocysteine modulate the rate of ROS generation of isolated mitochondria in vitro. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 377–386.
- Goodrick, C.L., Ingram, D.K., Reynolds, M.A., Freeman, J.R., Cider, N., 1990. Effect of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. *Mech. Ageing Dev.* 55, 69–87.
- Grandison, R.C., Piper, M.D.W., Partridge, L., 2009. Amino acid imbalance explains extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature* 462, 1061–1064.
- Gredilla, R., Barja, G., 2005. Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146, 3713–3717.
- Gredilla, R., Sanz, A., Lopez-Torres, M., Barja, G., 2001a. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J.* 15, 1589–1591.
- Gredilla, R., Barja, G., Lopez-Torres, M., 2001b. Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33, 279–287.
- Gredilla, R., López-Torres, M., Barja, G., 2002. Effect of time of restriction on the decrease in mitochondrial H₂O₂ production and oxidative DNA damage in the heart of food restricted rats. *Microsc. Res. Tech.* 59, 273–277.
- Gredilla, R., Bohr, V.A., Stevnsner, T., 2010. Mitochondrial DNA repair and association with aging – an update. *Exp. Gerontol.* 45, 478–488.
- Hagopian, K., Harper, M.E., Ram, J.J., Humble, S.J., Weindruch, R., Ramsey, J.J., 2004. Long-term caloric restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E674–E684.
- Hagopian, K., Chen, Y., Simmons, D., Soo Hoo, R., Bentley, T., McDonald, R.B., Ramsey, J.J., 2011. Caloric restriction influences hydrogen peroxide generation in

- mitochondrial sub-populations from mouse liver. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 227–236.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Harman, D., 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* 20, 145–147.
- Harper, A.E., Benevenga, N.J., Wohlhueter, R.M., 1970. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol. Rev.* 50, 428–558.
- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., Pahor, M., Javors, M.A., Fernandez, E., Miller, R.A., 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392–395.
- Hasek, B.E., Stewart, L.K., Henagan, T.M., Boudreau, A., Lenard, N.R., Black, C., Shin, J., Huypends, P., Malloy, V.L., Plaisance, E.P., Krajcik, R.A., Orentreich, N., Gettys, T.W., 2010. Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R728–R739.
- Heilbronn, L.K., deJonge, L., Frisard, M.I., DeLany, J.P., Larson-Meyer, D.E., Rood, J., Nguyen, T., Martin, C.K., Volaufova, J., Most, M.M., Greenway, F.L., Smith, S.R., Deutsch, W.A., Williamson, D.A., Ravussin, E., 2006. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals – a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.* 295, 1539–1548.
- Herrero, A., Barja, G., 1997. Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech. Ageing Dev.* 98, 95–111.
- Herrero, A., Barja, G., 1998. H₂O₂ 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.* 103, 133–146.
- Herrero, A., Barja, G., 2000. Localization of the site of oxygen radical generation inside the Complex I of heart and non-synaptic brain mammalian mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 609–615.
- Heyn, H., Li, N., Ferreira, H.J., Moran, S., Pisano, D.G., Gómez, A., Diez, J., Sanchez-Mut, J.V., Setien, F., Carmona, F.J., Puca, A.A., Sayols, S., Pujana, M.A., S-Musach, J., Iglesias-Platas, I., Formiga, F., Fernandez, A.F., Fraga, M.F., Heath, S.C., Valencia, A., Gut, I.G., Wang, J., Esteller, M., 2012. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 10522–10527.
- Hidiroglou, N., Gilani, G.S., Long, L., Zhao, X., Madere, R., Cockell, K., Belonge, B., Ratnayake, W.M., Peace, R., 2004. The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil. *J. Nutr. Biochem.* 15, 730–740.
- Hirschey, M.D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D.B., Grueter, C.A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O.R., Stevens, R.D., Li, Y., Saha, A.K., Ruderman, N.B., Bain, J.R., Newgard, C.B., Jr, R.V., Farese, F.W., Alt, C.R., Kahn, E., Verdin, 2010. SIRT3 regulates mitochondrial fatty acid oxidation by reversible fatty-acid enzyme deacetylation. *Nature* 464, 121–125.
- Hoffman, R.M., 1985. Altered methionine metabolism and transmethylation in cancer. *Anticancer. Res.* 5, 1–30.
- Holoszy, J.O., Fontana, L., 2007. Caloric restriction in humans. *Exp. Gerontol.* 42, 709–712.
- Iwasaki, K., Gleiser, C.A., Masoro, E.J., McMahan, C.A., Seo, E.J., Yu, B.P., 1988. Influence of the restriction of individual dietary components on longevity and age-related disease of Fischer rats: the fat component and the mineral component. *J. Gerontol.* 43, B13–B21.
- Jang, Y.C., Liu, Y., Hayworth, C.R., Bhattacharya, A., Lustgarten, M.S., Muller, F.L., Chaudhuri, A., Qi, W., Li, Y., Huang, J.Y., Verdin, E., Richardson, A., Van Remmen, H., 2012. Dietary restriction attenuates age-associated muscle atrophy by lowering oxidative stress in mice even in complete absence of CuZnSOD. *Aging Cell* 11, 770–782.
- Kabil, H., Kabil, O., Banerjee, R., Harshman, L.G., Pletcher, S.D., 2011. Increased transulfuration mediates longevity and dietary restriction in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 316831–316836.
- Kalhan, S.C., Uppal, S.O., Moorman, J.L., Bennett, C., Gruca, L.L., Parimi, P.S., Dasarathy, S., Serre, D., Hanson, R.W., 2011. Metabolic and genomic response to dietary isocaloric protein restriction in the rat. *J. Biol. Chem.* 286, 5266–5277.
- Keaney, M., Gems, D., 2003. No increase in lifespan in *Caenorhabditis elegans* upon treatment with the superoxide dismutase mimetic EUK-8. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 277–282.
- Khorakova, M., Deil, Z., Khausman, D., Matsek, K., 1990. Effect of carbohydrate-enriched diet and subsequent food restriction on life prolongation in Fischer 344 male rats. *Fiziol. Zh.* 36, 16–21.
- Komninou, D., Leutzinger, Y., Reddy, B.S., Richie Jr., J.P., 2006. Methionine restriction inhibits colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer* 54, 202–208.
- Koyama, T., Kume, S., Koya, D., Araki, S., Isshiki, K., Chin-Kanasaki, M., Sugimoto, T., Haneda, M., Sugaya, T., Kashiwagi, A., Maegawa, H., Uzu, T., 2011. SIRT3 attenuates palmitate-induced ROS production and inflammation in proximal tubular cells. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1258–1267.
- Ku, H.H., Brunk, U.T., Sohal, R.S., 1993. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 621–627.
- Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E., Kunz, W.S., 2004. Characterization of superoxide producing sites in isolated brain mitochondria. *Biomed. Pharmacother.* 279, 4127–4135.
- Kumagai, H., Katoh, S., Hiroi, S., Kimura, M., Hishida, A., Ikegaya, N., 2002. Renal tubulointerstitial injury in weanling rats with hyperhomocysteinemia. *Kidney Int.* 62, 1219–1228.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N., Andreyev, A., 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation–reduction state. *Biochem. J.* 368, 545–553.
- Lambert, A.J., Brand, M.D., 2004. Inhibitors of the quinone binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* 279, 39414–39420.
- Lambert, A.J., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Merry, B.J., 2004. Effect of ageing and caloric restriction on specific markers of protein oxidative damage and membrane peroxidizability in rat liver mitochondria. *Mech. Ageing Dev.* 125, 529–538.
- Lambert, A.J., Boysen, H.M., Buckingham, J.A., Yang, T., Podlutzky, A., Austad, S.N., Kunz, T.H., Buffenstein, R., Brand, M.D., 2007. Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell* 6, 607–618.
- Lambert, A.J., Buckingham, J.A., Boysen, H.M., Brand, M.D., 2010. Low complex I content explains the low hydrogen peroxide production rate of heart mitochondria from the long-lived pigeon, *Columba livia*. *Aging Cell* 9, 78–91.
- Lee, Y.S., Choi, J.Y., Park, M.K., Choi, E.M., Kasai, H., Chung, M.H., 1996. Induction of oH8Gua glycosylase in rat kidneys by potassium bromate (KBrO₃), a renal carcinogen. *Mutat. Res.* 364, 227–233.
- Lee, K.P., Simpson, S.J., Clissold, F.J., Brooks, R., Ballard, J.W., Taylor, P.W., Soran, N., Raubenheimer, D., 2008. Lifespan and reproduction in *Drosophila*: new insights from nutritional geometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2498–2503.
- Lim, D.H., Han, J.Y., Kim, J.R., Lee, Y.S., Kim, H.Y., 2012. Methionine sulfoxide reductase B in the endoplasmic reticulum is critical for stress resistance and aging in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419, 20–26.
- Liu, B., Qian, S.B., 2011. Translational regulation in nutrigenomics. *Adv. Nutr.* 2, 511–519.
- Lopez-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhun, M., Jamieson, H., Hilmer, S., Cascajo, M.V., Allard, J., Ingram, D.K., Navas, P., de Cabo, R., 2006. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1768–1773.
- Lopez-Torres, M., Barja, G., 2008. Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction. Possible implications for humans. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 1337–1347.
- López-Torres, M., Pérez-Campo, R., Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G., 1993a. Maximum life span in vertebrates: correlation with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H₂O₂, and basal and maximum aerobic capacity. *Mech. Ageing Dev.* 70, 177–199.
- López-Torres, M., Pérez-Campo, R., Rojas, C., Cadenas, S., Barja de Quiroga, G., 1993b. Simultaneous induction of superoxide dismutase, glutathione reductase, GSH and ascorbate in liver and kidney correlates with survival throughout the life span. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 133–142.
- Lopez-Torres, M., Gredilla, R., Sanz, A., Barja, G., 2002. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 882–889.
- Madrigano, J., Baccarelli, A., Mittleman, M.A., Sparrow, D., Vokonas, P.S., Tarantini, L., Schwartz, J., 2012. Aging and epigenetics: longitudinal changes in gene-specific DNA methylation. *Epigenetics* 7, 63–70.
- Maegawa, S., Hinkal, G., Kim, H.S., Shen, L., Zhang, L., Zhang, J., Zhang, N., Liang, S., Donehower, L.A., Issa, J.-P.J., 2010. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res.* 20, 332–340.
- Mair, W., Dillin, A., 2008. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 727–754.
- Mair, W., Piper, M.D., Partridge, L., 2005. Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 3, e223.
- Malloy, V.L., Krajcik, R.A., Bailey, S.J., Hristopoulos, G., Plummer, J.D., Orentreich, N., 2006. Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell* 5, 305–314.
- Marnett, L.J., Plataras, J.P., 2001. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* 17, 214–221.
- Martin, B., Mattson, M.P., Maudsley, S., 2006. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res. Rev.* 5, 332–353.
- Mattison, J.A., Roth, G.S., Beasley, T.M., Tilmont, E.M., Handy, A.M., Herbert, R.L., Longo, D.L., Allison, D.B., Young, J.E., Bryant, M., Barnard, D., Ward, W.F., Qi, W., Ingram, D., 2012. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489, 318–321.
- Mattson, M.P., Chan, S.L., Duan, W., 2002. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behaviour. *Physiol. Rev.* 82, 637–672.
- McCarter, R., Masoro, E.J., Yu, B.P., 1985. Does food restriction retard aging by reducing metabolic rate? *Am. J. Physiol.* 248, E488–E490.
- McCay, C.M., Crowell, M.F., Maynard, L.A., 1935. The effect of retarded growth upon the length of life-span and upon the ultimate body size. *J. Nutr.* 10, 63–79.
- McKiernan, S.H., Colman, R.J., Aiken, E., Evans, T.D., Beasley, T.M., Aiken, J.M., Weindruch, R., Anderson, R.M., 2012. Cellular adaptation contributes to calorie restriction-induced preservation of skeletal muscle in aged rhesus monkeys. *Exp. Gerontol.* 47, 229–236.
- Medvedev, Z.A., 1990. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 65, 375–398.
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E., Wallace, D.C., Malfroy, B., Doctrow, S.R., Lithgow, G.J., 2000. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 289, 1567–1569.
- Meyer, T.E., Kovacs, S.J., Ehsani, A.A., Klein, S., Holloszy, J.O., Fontana, L., 2006. Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* 47, 398–402.
- Miller, R.A., Buehner, G., Chang, Y., Harper, J.M., Sigler, R., Smith-Wheelock, M., 2005. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 4, 119–125.

- Min, K.J., Tatar, M., 2006. Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 127, 643–646.
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming Jr., J., Johnson, J.E., 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* 15, 575–591.
- Mobbs, C.V., Bray, G.A., Atkinson, R.L., Bartke, A., Finch, C.E., Maratos-Flier, E., Crowley, J.N., Nelson, J.F., 2001. Neuroendocrine and pharmacological manipulations to assess how caloric restriction increases life span. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 56, 34–44.
- Mori, N., Hirayama, K., 2000. Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. *J. Nutr.* 130, 2349–2355.
- Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W.M., Requena, J., Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 2001. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12920–12925.
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., Remmen, H.V., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 477–503.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.
- Naudi, A., Caro, P., Jove, M., Gomez, J., Boada, J., Ayala, V., Portero-Otin, M., Barja, G., Pamplona, R., 2007. Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation Res.* 10, 473–484.
- Naudi, A., Jove, M., Ayala, V., Portero-Otin, M., Barja, G., Pamplona, R., 2011. Regulation of membrane unsaturation as antioxidant adaptive mechanisms in long-lived animal species. *Free Radic. Antioxid.* 1, 3–12.
- Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Falcone, S., Valerio, A., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S., Carruba, M.O., 2005. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of Enos. *Science* 310, 314–317.
- Omodel, D., Fontana, L., 2011. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic diseases. *FEBS Lett.* 585, 1537–1542.
- Orentreich, N., Mattias, J.R., DeFelice, A., Zimmerman, J.A., 1993. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J. Nutr.* 123, 269–274.
- Page, M.M., Stuart, J.A., 2011. Activities of DNA base excision repair enzymes in liver and brain correlate with body mass, but not with lifespan. *Age (Dordr)* 34, 1195–1209.
- Page, M.M., Robb, E.L., Salway, K.D., Stuart, J.A., 2010. Mitochondrial redox metabolism: aging, longevity and dietary effects. *Mech. Ageing Dev.* 131, 242–252.
- Pamplona, R., Barja, G., 2006. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 496–508.
- Pamplona, R., Barja, G., 2007. Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res. Rev.* 6, 189–210.
- Pamplona, R., Barja, G., 2011. An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology* 12, 409–435.
- Pamplona, R., Constantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am. J. Physiol.* 301, R843–R863.
- Pamplona, R., Prat, J., Cadenas, S., Rojas, C., Pérez-Campo, R., López-Torres, M., Barja, G., 1996. Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from longevous species: the pigeon and human case. *Mech. Ageing Dev.* 86, 53–66.
- Pamplona, R., Barja, G., Portero-Otin, M., 2002a. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 475–490.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Requena, J., Gredilla, R., Barja, G., 2002b. Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after four months of caloric restriction than in age-matched controls. *Mech. Ageing Dev.* 123, 1437–1446.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Sanz, A., Ayala, V., Vasileva, E., Barja, G., 2005. Protein and lipid oxidative damage and complex I content are lower in the brain of budgerigards and canaries than in mice. Relation to aging rate. *Age (Dordr)* 27, 267–280.
- Park, C.M., Cho, C.W., Rosenfeld, M.E., Song, Y.S., 2008. Methionine supplementation accelerates oxidative stress and nuclear factor kappaB activation in livers of C57BL/6 mice. *J. Med. Food* 11, 667–674.
- Passarino, G., Rose, G., Bellizzi, D., 2010. Mitochondrial function, mitochondrial DNA and ageing: a reappraisal. *Biogerontology* 11, 575–588.
- Patrushev, M., Kasymov, V., Patrusheva, V., Ushakova, T., Gogvadze, V., Gaziev, A., 2004. Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 3100–3103.
- Pérez-Campo, R., López-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G., 1994. Longevity and antioxidant enzymes, non-enzymatic antioxidants, and oxidative stress levels in the vertebrate lung: a comparative study. *J. Comp. Physiol.* 163, 682–689.
- Pérez-Campo, R., López-Torres, M., Cadenas, S., Rojas, C., Barja, G., 1998. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B* 168, 149–158.
- Perrone, C.E., Mattocks, D.A., Hristopoulos, G., Plummer, J.D., Krajcik, R.A., Orentreich, N., 2008. Methionine restriction effects on 11-HSD1 activity and lipogenic/lipolytic balance in F344 rat adipose tissue. *J. Lipid Res.* 49, 12–23.
- Perrone, C.E., Mattocks, D.A., Jarvis-Moray, M., Plummer, J.D., Orentreich, N., 2010. Methionine restriction effects on mitochondrial biogenesis and aerobic capacity in white adipose tissue, liver, and skeletal muscle of F344 rats. *Metabolism* 59, 1000–1011.
- Perrone, C.E., Mattocks, D.A.L., Plummer, J.D., Chittur, S.V., Mohney, R., Vignola, K., Orentreich, D.S., Orentreich, N., 2012b. Genomic and metabolic responses to methionine-restricted and methionine-restricted, cysteine-supplemented diets in Fischer 344 rat inguinal adipose tissue, liver and quadriceps muscle. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* 5, 132–157.
- Perrone, C.E., Malloy, V.L., Orentreich, D.S., Orentreich, N., 2012a. Metabolic adaptations to methionine restriction that benefit health and lifespan in rodents. *Exp. Gerontol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2012.07.005>.
- Petti, A.A., Crutchfield, C.A., Rabinowitz, J.D., Botstein, D., 2011. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E1089–E1098.
- Piper, M.D.W., Partridge, L., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 2011. Dietary restriction and aging: a unifying perspective. *Cell Metab.* 14, 154–160.
- Portero-Otin, M., Requena, J.R., Bellmunt, M.J., Ayala, V., Pamplona, R., 2004. Protein nonenzymatic modifications and proteasome activity in skeletal muscle from the short-lived rat and long-lived pigeon. *Exp. Gerontol.* 39, 1527–1535.
- Ramaligan, A., Wang, X., Gabello, M., Valenzano, M.C., Soler, A.P., Ko, A., Morin, P.J., Mullin, J.M., 2010. Dietary methionine restriction improves colon tight junction barrier function and alters claudin expression pattern. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 299, C1028–C1035.
- Richie Jr., J.P., Leutzinger, Y., Parthasarathy, S., Malloy, V., Orentreich, N., Zimmerman, J.A., 1994. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J.* 8, 1302–1307.
- Robert, L., Labat-Robert, J., Robert, A.M., 2010. Genetic, epigenetic and posttranslational mechanisms of aging. *Biogerontology* 11, 387–399.
- Ross, M.H., 1976. Nutrition and longevity in experimental animals. In: Winick, M. (Ed.), *Nutrition and Aging*. Wiley, New York, pp. 43–57.
- Salway, K.D., Page, M.M., Faure, P.A., Burness, G., Stuart, J.A., 2011. Enhanced protein repair and recycling are not correlated with longevity in 15 vertebrate endotherm species. *Age (Dordr)* 33, 33–47.
- Sanchez-Roman, I., Gomez, A., Gomez, J., Suarez, H., Sanchez, C., Naudi, A., Ayala, V., Portero-Otin, M., Lopez-Torres, M., Pamplona, R., Barja, G., 2011. Forty percent methionine restriction lowers DNA methylation, complex I ROS generation, and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins in rat heart. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 699–708.
- Sanchez-Roman, I., Gómez, A., Pérez, I., Sanchez, C., Suarez, H., Naudi, A., Jové, M., Lopez-Torres, M., Pamplona, R., Barja, G., 2012. Effects of aging and methionine restriction applied at old age on ROS generation and oxidative damage in rat liver mitochondria. *Biogerontology* 13, 399–411.
- Sanz, A., Bartke, A., Barja, G., 2002. Long-lived Ames dwarf mice: oxidative damage to mitochondrial DNA in heart and brain. *J. Am. Aging Assoc.* 25, 119–122.
- Sanz, A., Caro, P., Barja, G., 2004. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 545–552.
- Sanz, A., Caro, P., Ibanez, J., Gomez, J., Gredilla, R., Barja, G., 2005a. Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 83–90.
- Sanz, A., Gredilla, R., Pamplona, R., Portero-Otin, M., Vara, E., Tresguerras, J.A., Barja, G., 2005b. Effect of insulin and growth hormone on rat heart and liver oxidative stress in control and caloric restricted animals. *Biogerontology* 6, 15–26.
- Sanz, A., Pamplona, R., Barja, G., 2006a. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid. Redox Signal.* 8, 582–599.
- Sanz, A., Caro, P., Ayala, V., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Barja, G., 2006b. Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J.* 20, 1064–1073.
- Sanz, A., Caro, P., Sanchez, J.G., Barja, G., 2006c. Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067, 200–209.
- Sanz, A., Gomez, J., Caro, P., Barja, G., 2006d. Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J. Bioenerg. Biomembr.* 38, 327–333.
- Selman, C., Lingard, S., Choudhury, A.I., Batterham, R.L., Claret, M., Clements, M., Ramadani, F., Okkenhaug, K., Schuster, E., Blanc, E., Piper, M.D., Al-Qassab, H., Speakman, J.R., Carmignac, D., Robinson, I.C., Thornton, J.M., Gems, D., Partridge, L., Withers, D.J., 2008. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J.* 22, 807–818.
- Shimokawa, I., Higami, Y., Yu, B.P., Masoro, E.J., Ikeda, T., 1996. Influence of dietary components on occurrence of and mortality due to neoplasms in male F344 rats. *Ageing Clin. Exp. Res.* 8, 254–262.
- Simpson, S.J., Raubenheimer, D., 2009. Macronutrient balance and lifespan. *Ageing (Albany NY)* 1, 875–880.
- Sohal, R.S., Weindruch, R., 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59–63.
- Sohal, R.S., Svensson, I., Brunk, U.T., 1990. Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species. *Mech. Ageing Dev.* 53, 209–215.
- Sohal, R.S., Ku, H.H., Agarwal, S., Forster, M.J., Lal, H., 1994. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* 74, 121–133.
- Someya, S., Yu, W., Hallows, W.C., Xu, J., Vann, J.M., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Denu, J.M., Prolla, T.A., 2010. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 143, 802–812.
- Spasojević, I., Bogdanović Pristov, J., Vujić, L., Spasić, M., 2012. The reaction of methionine with hydroxyl radical: reactive intermediates and methanethiol production. *Amino Acids* 42, 2439–2445.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roeback, S.J., Brand, M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44784–44790.
- Strehler, B.L., 1962. Time, cells, and aging. Academic Press, New York, pp. 1–456.

- Stuart, J.A., Karahalil, B., Hogue, B.A., Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A., 2004. Mitochondrial and nuclear DNA base excision repair are affected differently by caloric restriction. *FASEB J.* 18, 595–597.
- Sun, L., Amir, A., Akha, S., Millar, R.A., Harper, J., 2009. Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 64A, 711–722.
- Suter, M., Richter, C., 1999. Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases. *Biochemistry* 38, 459–464.
- Taguchi, A., White, M.F., 2008. Insulin-like signalling, nutrient homeostasis, and life span. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 191–212.
- Taylor, E.R., Hurrell, F., Shannon, R.J., Lin, T.K., Hirst, J., Murphy, M.P., 2003. Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *J. Biol. Chem.* 278, 19603–19610.
- Treberg, J.R., Quinlan, C.L., Brand, M.D., 2011. Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-Q oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* 286, 27103–27110.
- Troen, A.M., Lutgens, E., Smith, D.E., Rosenberg, I.H., Selhub, J., 2003. The atherogenic effect of excess methionine intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15089–15094.
- Troen, A.M., French, E.E., Roberts, J.F., Selhub, J., Ordovas, J.M., Parnell, L.D., Lain, C.Q., 2007. Lifespan modification by glucose and methionine in *Drosophila melanogaster* fed a chemically defined diet. *Age (Dordr)* 29, 29–39.
- Uthus, E.O., Brown-Borg, H.M., 2006. Methionine flux to transsulfuration is enhanced in the long living Ames dwarf mouse. *Mech. Ageing Dev.* 127, 444–450.
- Wakeling, L.A., Ions, L.J., Ford, D., 2009. Could Sirt1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions? *Age (Dordr)* 31, 327–341.
- Weindruch, R., 2003. Caloric restriction, gene expression, and aging. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 17, S58–S59.
- Weindruch, R., Kayo, T., Lee, C.L., Prolla, T.A., 2001. Microfile profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *J. Nutr.* 131, 918S–923S.
- Willette, A.A., Bendlin, B.B., Colman, R.J., Kastman, E.K., Field, A.S., Alexander, A.L., Sridharan, A., Allison, D.B., Anderson, R., Voytko, M.L., Kemnitz, J.W., Weindruch, R.H., Johnson, S.C., 2012. Calorie restriction reduces the influence of glucoregulatory dysfunction on regional brain volume in aged rhesus monkeys. *Diabetes* 61, 1036–1042.
- Yen, K., Mastitis, J.W., Mobbs, C.V., 2004. Lifespan is not determined by metabolic rate: evidence from fishes and *C. elegans*. *Exp. Gerontol.* 39, 3947–3949.
- Yu, B.P., Masoro, E.J., Murata, I., Bertrand, H.A., Lynd, F.T., 1982. Life span study of SPF Fischer 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease. *J. Gerontol.* 37, 130–141.
- Yu, B.P., Masoro, E.J., McMahan, C.A., 1985. Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J. Gerontol.* 40, 657–670.

CAPÍTULO II

MODULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL MEDIANTE EL BLOQUEO DE LA SEÑALIZACIÓN BETA-ADRENÉRGICA

- ★ The β -blocker atenolol lowers the longevity-related degree of fatty acid unsaturation, decreases protein oxidative damage, and increases extracellular signal-regulated kinase signaling in the heart of C57BL/6 mice. *Rej Research*, Vol. 13 No.6, pp. 683-693 (2010)

The β -Blocker Atenolol Lowers the Longevity-Related Degree of Fatty Acid Unsaturation, Decreases Protein Oxidative Damage, and Increases Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in the Heart of C57BL/6 Mice

Ines Sanchez-Roman,¹ Jose Gomez,¹ Alba Naudi,² Victoria Ayala,² Manuel Portero-Otín,² Monica Lopez-Torres,¹ Reinald Pamplona,² and Gustavo Barja¹

Abstract

The interruption of the β -adrenergic receptor signaling at the level of adenylyl cyclase (AC) by specifically knocking out (KO) the AC5 gene activates the RAF/MEK/ extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway, delays bone and heart aging, and increases mean and maximum longevity in mice. However, the mechanisms involved in life extension in this animal model with increased longevity have not been clarified, although a decrease in oxidative stress has been proposed as mediator. Two traits link longevity and oxidative stress. Long-lived mammals and birds have a low rate of mitochondrial reactive oxygen species (mitROS) generation and a low degree of membrane fatty acid unsaturation, but these key factors have not been studied in AC5 KO mice. In the present investigation, male C57BL/6 mice were treated with the β -blocker atenolol in drinking water, and oxidative stress-related parameters were measured in the heart. Atenolol treatment did not change the rate of mitROS production and oxidative damage to mitDNA (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine [8-oxodG]), but strongly decreased the degree of fatty acid unsaturation and the peroxidizability index, mainly due to decreases in 22:6n-3 and 20:4n-6 and to increases in 18:1n-9, 16:1n-7 and 16:0 in the atenolol group. Protein oxidation and lipoxidation were lower in the atenolol group than in the controls. The mitochondrial complex I and IV content and the amount of p-ERK1/2 signaling proteins were significantly higher in the atenolol-treated than in the control animals. These results support the idea that the increased longevity of the AC5 KO mice can be due in part to an ERK signaling-mediated stress-resistance due to a decrease in fatty acid unsaturation, leading to lower lipid peroxidation and decreased lipoxidation-derived damage to cellular proteins.

Introduction

THE MODERN VERSION OF the mitochondrial free radical theory of aging, one of the most widely considered theories of aging, is currently supported by both experimental and comparative studies (reviewed in ref. 1). Interspecies comparisons have identified two main factors that can contribute to explain the slow aging rate of long-lived animals: A low rate of mitochondrial reactive oxygen species (mitROS) generation²⁻⁴ and a low degree of membrane fatty acid unsaturation.^{5,6} Dietary restriction, which extends longevity in many different kinds of animals like nematodes, insects, and mammals,⁷ including monkeys,⁸ uses the first of

these two mechanisms—it decreases the rate of mitROS generation in rodents⁹—whereas decreases, increases, or lack of changes in fatty acid unsaturation have been described during dietary restriction.

During the last decade many single-gene mutations have been identified in mice that extend life span. However, most of them are related to insulin/insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-like signaling pathways,¹⁰⁻¹² and it is not clear if the mechanisms responsible for longevity extension in these animal models work mainly through decreases in oxidative stress. More recently, extension of life span in 129/SvJ-C57BL/6 mice has been obtained through the interruption of β -adrenergic receptor signaling at the level of type 5 isoform

¹Department of Animal Physiology II, Faculty of Biological Sciences, Complutense University, Madrid, Spain.

²Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, University of Lleida-IRBLLEIDA, Lleida, Spain.

CAPÍTULO III

EFFECTOS SINÉRGICOS E INDEPENDIENTES DEL TRATAMIENTO CONJUNTO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA Y EL BLOQUEO DE LA SEÑALIZACIÓN BETA- ADRENÉRGICA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL

* Independent and synergic effects of atenolol and methionine restriction on rat heart mitochondria oxidative stress. Enviado a J Bioenerg Biomembr en Abril, 2013.

Independent and synergic effects of atenolol and methionine restriction on rat heart mitochondria oxidative stress

Ines Sanchez-Roman,¹ Alexia Gomez,¹ Alba Naudí ², Mariona Jove², Irene Pérez,¹ Carlota Sanchez,¹ Henar Suarez¹, J. Gómez¹, Mónica Lopez-Torres,¹ Reinald Pamplona² and Gustavo Barja¹

¹Department of Animal Physiology-II, Faculty of Biological Sciences, Complutense University of Madrid (UCM), Spain

²Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, University of Lleida-IRBLLEIDA, Lleida, Spain

Corresponding author: Prof. Dr. G. Barja. Departamento de Fisiología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, c/ Jose Antonio Novais 2, Madrid 28040, Spain. e-mail: gbarja@bio.ucm.es.

Abstract

A low rate of mitochondrial ROS production (mtROSp) and a low degree of fatty acid unsaturation are characteristic traits of long-lived animals and can be obtained in a single species by methionine restriction (MetR) or atenolol (AT) treatments. However, simultaneous application of both treatments has never been performed. In the present investigation it is shown that MetR lowers mtROSp and complex I content. Both the MetR and the AT treatments lower protein oxidative modification and oxidative damage to mtDNA and the fatty acid unsaturation degree in rat heart mitochondria. The decrease in fatty acid unsaturation seems to be due, at least in part, to decreases in desaturase and elongase activities or peroxisomal β -oxidation. Furthermore, the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) was stimulated by MetR and AT. The decrease in membrane fatty acid unsaturation and protein oxidation, and the changes in fatty acids and p-ERK showed synergic effects of both treatments. In addition, the increase in mtROSp induced by AT observed in the present investigation was totally avoided with the combined MetR+AT treatment. It is concluded that the simultaneous treatment with MetR plus atenolol is more beneficial than either single treatment alone to lower oxidative stress in rat heart mitochondria, analogously to what has been reported in long-lived animal species.

Key Words: methionine restriction, diet, mitochondria, reactive oxygen species, protein oxidation, membrane fatty acids, atenolol.

Abbreviations:

AASA = aminoadipic semialdehyde

AT = atenolol

CEL = carboxyethyl-lysine

CML = carboxymethyl-lysine

DBI = double bond index

DR = dietary restriction

p-ERK = phosphorylated extracellular-signal regulated kinase

GSA = glutamic semialdehyde

MetR = methionine restriction

mtROS = mitochondrial reactive oxygen species

mtDNA = mitochondrial DNA

8-oxodG = 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine

PI = peroxidizability index

SIRT3= Sirtuin 3

Introduction

The mitochondrial free radical theory of aging [1] is generally supported by results from many different kinds of investigations [2-3]. These include age-related changes, comparisons between animal species with different longevity, and the effects of global decreases in food ingestion (dietary restriction, DR) or restriction of particular dietary components like the amino acid methionine. Previous studies have identified two characteristics of long-lived animals linked to oxidative stress. Long-lived mammals and birds show a low rate of reactive oxygen species (ROS) generation at mitochondria [2], and have tissue cellular membranes with a low degree of fatty acid unsaturation [3,4]. Their low rates of mitochondrial ROS production (mtROSp) decreases the damage to key molecules like mtDNA, and the low fatty acid unsaturation diminishes the intensity of lipid peroxidation [3].

Among those two longevity-related factors, DR lowers mtROSp [5]. Various studies indicate that this can be reproduced with similar intensity by lowering a single dietary component, the amino acid methionine [3,6]. Interestingly, methionine restriction in the diet increases longevity in rats [7,8] and mice [9,10]. However, fatty acid unsaturation has been more difficult to modify, and most of the studies have been limited to comparisons between species with different longevity. Although feeding with specially designed diets rich in saturated fats can lower membrane fatty acid unsaturation in rat tissues [11], such manipulation leads to unhealthy lipid profiles in plasma. However, a recent investigation has shown that atenolol, a β -adrenergic receptor blocker, given in drinking water decreases membrane fatty acid unsaturation in mouse heart by an extent almost similar to the difference in unsaturation between mammals differing around an order of magnitude in longevity like mice and cow [12]. This is interesting, because it is known that knocked out rodents for the adenylyl cyclase type 5 gene, which interrupts β -adrenergic receptor signalling, show increased longevity [13].

Although decreases in oxidative stress have been observed after treating laboratory rodents with MetR or with atenolol, the combined effect of these two experimental treatments has never been studied. It is important to investigate such combined treatment due to various reasons. On the one hand, long-lived animal species simultaneously show both a low rate of mtROSp and a low degree of membrane fatty acid unsaturation. On the other hand, it is reasonable to expect the existence of synergic effects among those two longevity-related traits. A low rate of mtROS generation not only lowers mtDNA oxidative damage. It should also decrease initiation of membrane lipid peroxidation. This will be particularly important for mitochondrial membranes since they are abundant and situated near to or even just at the place where mtROS are produced (the inner mitochondrial membranes). Conversely, a low degree of fatty acid unsaturation not only protects cellular membranes against lipid peroxidation. It also lowers the generation of secondary radicals and toxic lipid peroxidation products which can deleteriously modify proteins and DNA [14],

thus possibly also contributing to decrease aging rate [3,15]. Thus, we hypothesize that the combined treatment with MetR plus atenolol can have additive or synergic effects on the lowering of mitochondrial oxidative stress.

In order to test that hypothesis, in the present investigation we have studied the effects of Control, atenolol (AT), MetR, or MetR+AT treatments in male Wistar rats. We measured mtROS generation, the percent free radical leak (%FRL), the rates of oxygen consumption in resting and phosphorylating conditions, oxidative damage to mtDNA, oxidative, glycoxidative and lipoxidative protein modification, the different fatty acids and unsaturation indexes, the amount of mitochondrial respiratory complexes (I to IV), the complex I-related apoptosis-inducing factor (AIF), and the mitochondrial sirtuins SIRT3 in heart mitochondria from these four animal groups. The amount of p-ERK (phosphorylated extracellular-signalling regulated kinase) was also measured in order to corroborate the activation of the Raf/MEK/ERK signalling pathway by the atenolol treatment.

Materials and Methods

Experimental design

Male Wistar rats of 6-7 weeks of age obtained from Charles River were divided in four experimental groups: Control, AT (atenolol), MetR (methionine restricted), and MetR+AT (methionine restricted and AT-treated). The rats were caged individually, and were maintained in a 12:12 (light-dark) cycle, 22°C ± 2°C, and 50% ± 10% relative humidity during the experimental period (7 weeks). Semipurified diets were specifically prepared after our request by MP biochemicals (Irvine, CA) and were imported to Spain by Leti (Barcelona, Spain). The animals in the AT and MetR+AT groups had free access to a solution of 0.1g/L of atenolol (Sigma, A7655) in drinking water. The animals in the Control and MetR groups had free access to the same aliquot of drinking water without atenolol. The mean water intake was not significantly different among groups. The animals in the Control and AT groups received the control diet, and those in the MetR and MetR+AT groups received the 40% MetR diet. The composition of the control diet (in g/100 g of diet) was: L-arginine 1.12, L-lysine 1.44, L-histidine 0.33, L-leucine 1.11, L-isoleucine 0.82, L-valine 0.82, L-threonine 0.82, L-tryptophan 0.18, L-methionine 0.86, L-glutamic acid 2.70, L-phenylalanine 1.16, L-glycine 2.33, Dextrine 5.0, Corn starch 31.82, sucrose 31.79, cellulose 5.0, choline bitartrate 0.20, MP vitamin diet fortification mixture 1.0, mineral mix (AIN) 3.50 and corn oil 8.0. The composition of the 40% MetR diet was similar to that of the control diet except that L-methionine was present at 0.516%, which corresponds to an amount of this amino acid 40% lower than in the control diet (0.86%). This 0.34% decrease in L-methionine in the 40% MetR diet was compensated by increasing all the rest of the dietary components in proportion to their presence in the diet. Since the decrease in L-methionine was very small, with this procedure the percent presence of all the rest of the dietary components was almost the same in the two experimental diets. After 7 weeks of experimental treatments the animals were sacrificed by decapitation. The heart was processed to isolate mitochondria, which were immediately used to measure mitochondrial respiration and H₂O₂ generation, and heart mitochondrial samples were stored at -80°C for the rest of the analyses.

Heart mitochondria isolation

Heart mitochondria were obtained from fresh tissue by the procedure of Mela and Seitz [16] with modifications. Hearts were chopped into small pieces and homogenized with a loose-fitting glass-glass pestle in 10 ml of isolation buffer (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) containing 5 mg of Subtilisine A and 25 mg of fatty acid-free albumin. After the samples stood for 1 min, 25 ml of additional isolation buffer containing 25 mg of albumin were added, and gentle homogenization was performed again with a tighter fitting pestle. The nuclei and cell debris were removed by centrifugation at 700 x g for 10 min. Supernatants were centrifuged at

8,000 x g for 10 min and the resulting supernatants were eliminated. The pellets were resuspended in 25 ml of isolation buffer and centrifuged at 8,000 x g for 10 min. Heart mitochondria were obtained by resuspending the pellets in 500 µl of isolation buffer. All the above procedures were performed at 4°C. Mitochondrial protein was measured by the Biuret method. The final mitochondrial suspensions were maintained at high concentration of mitochondrial protein over ice and were immediately used for oxygen consumption and H₂O₂ production measurements during the next two hours.

Mitochondrial ROS generation

The rate of heart mitochondrial ROS production (O₂⁻ + H₂O₂) was assayed by measuring the increase in fluorescence as a function of time (excitation at 312 nm, emission at 420 nm) due to oxidation of homovanillic acid by H₂O₂ in the presence of horseradish peroxidase, as previously described [17,18]. Reaction conditions were 0.25 mg of mitochondrial protein per ml, 6 U/ml of horseradish peroxidase, 0.1 mM homovanillic acid, 50 U/ml of superoxide dismutase, and 2.5 mM glutamate/2.5 mM malate, or 5 mM succinate in the incubation buffer (145 mM KCl, 30 mM Hepes, 5 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 0.1% albumin, pH 7.4) at 37°C, in a total volume of 1.5 ml. In some assays 2 µM rotenone or 2 µM antimycin A were also added. Duplicated samples were incubated for 15 min at 37° C. The reaction was stopped by transferring the samples to a cold bath and adding 0.5 ml of stop solution (2.0 M glycine, 2.2 M NaOH, 50 mM EDTA, pH 12), and the fluorescence was read in a LS50B Perkin-Elmer fluorometer. Known amounts of H₂O₂ generated in parallel by glucose oxidase with glucose as substrate were used as standards. Since the superoxide dismutase added in excess converts all O₂⁻ excreted by mitochondria (if any) to H₂O₂, the measurements represent the total rate of mitochondrial ROS production (O₂⁻ plus H₂O₂).

Mitochondrial oxygen consumption

The rate of oxygen consumption of heart mitochondria was measured at 37°C in a water-thermostatized incubation chamber with a computer-controlled Clark-type O₂ electrode (Oxygraph, Hansatech, UK) in 0.5 ml of incubation buffer (145 mM KCl, 30 mM Hepes, 5 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 0.1% albumin, pH 7.4). The substrates used were complex I-linked (2.5 mM glutamate/2.5 mM malate) or complex II-linked (5 mM succinate+rotenone). The assays were performed in the absence (State 4-resting) and in the presence (State 3-phosphorylating) of 500 µM ADP.

Free Radical Leak

The rates of H₂O₂ production and O₂ consumption of rat heart mitochondria were measured in parallel in the same samples under similar experimental conditions. This allowed the calculation of the percentage of electrons out of sequence, which reduce O₂ to ROS at the respiratory chain (the percent free radical leak, %FRL) instead of reaching cytochrome oxidase to reduce O₂ to water. Since two electrons are needed to reduce 1 mol of O₂ to H₂O₂ whereas four electrons are transferred in the reduction of 1 mol of O₂ to water, the FRL was calculated as the rate of H₂O₂ production divided by twice the rate of O₂ consumption, and the result was multiplied by 100 (%FRL).

Oxidative damage to mitochondrial DNA

The isolation of mtDNA was performed by the method of Latorre et al. [19] adapted to mammals [20]. The isolated mitochondrial DNA was digested to deoxynucleoside level by incubation at 50°C with 5 U of nuclease P1 (in 20 µl of 20 mM sodium acetate, 10 mM ZnCl₂, 15% glycerol, pH 4.8) for 30 min and 1 U of alkaline phosphatase (in 20 µL of 1 M Tris-HCl, pH 8.0) for 1 hr. All aqueous solutions used for mtDNA isolation, digestion and chromatographic separation were prepared in HPLC-grade water. Steady-state oxidative damage to mtDNA was estimated by measuring the level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) referred to that of the non-oxidized dG (deoxyguanosine) and the results were expressed as 8-oxodG/10⁵ dG. 8-oxodG and dG were analyzed by HPLC with on line electrochemical and ultraviolet detection respectively. The nucleoside mixture was injected into a reverse-phase Mediterranean Sea 18 column (5µm, 4.6 mm x 25 cm; Teknokroma, Barcelona, Spain), and was eluted with a mobile phase containing 6.5% acetonitrile and 50 mM phosphate buffer pH 5.0. The volume of sample injected in the column was 100 µl. A Gilson 305 pump with nanometric module 805 at 0.9 ml/min was used. 8-oxodG was detected with an ESA Coulochem II electrochemical coulometric detector (ESA, Inc. Bedford, MA) with a 5011A analytical cell run in the oxidative mode (350 mV/ 20 nA), and dG was detected with a Biorad model 1806 UV detector at 254 nm. For quantification, peak areas of dG standards and of three level calibration pure 8-oxodG standards (Sigma) were analyzed during each HPLC run. Comparison of areas of 8-oxodG standards injected with and without simultaneous injection of dG standards ensured that no oxidation of dG occurred during the chromatography.

Measurement of mitochondrial complexes I to IV, AIF, SIRT3 and ERK

The amounts of a) the mitochondrial respiratory chain complexes (I to IV), b) the complex I regulatory factors AIF and SIRT3, and c) ERK1/2 (ERK1/2 and phospho-ERK1/2) were estimated using western blot analyses. Samples were homogenized in a buffer containing 180 mM KCl, 5 mM MOPS, 2 mM EDTA, 1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid, 1 μ M butylated hydroxytoluene, protease inhibitor mix (80-6501-23, Amersham Biosciences) and phosphatase inhibitors (Na_3VO_4 1 mM, NaF 1mM). After a brief centrifugation (1000 rpm for 3 min at 4°C) to pellet cellular debris, proteins concentrations were measured in the supernatants using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay 500-0006). Proteins were separated by one-dimensional SDS-PAGE. Samples were mixed with sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 20% 2- β -mercaptoethanol and 0.02% bromophenol blue) and heated for 5 min at 95°C. Proteins (10 μ g for respiratory chain complexes and AIF, and 80 μ g for the others) were subjected to electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide minigels. For immunodetection, proteins were transferred using a Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio Rad) in a buffer containing 25 mM TRIS, 192 mM Glycine and 20% methanol, to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P Millipore, Bedford, MA). The membranes were immersed in blocking solution (0.2% I-Block Tropic A1300, 0.1% Tween in PBS) for 1 hour at room temperature. After blocking, the membrane was washed two times using 0.05% TBS-T buffer. Afterwards, the membrane was incubated in primary solution using specific antibodies for the 39kDa (NDUFA9) and 29kDa (NDUFS3) subunits of complex I (1:1000 in both cases, ref. A21344 and A21343, respectively, Molecular Probes), 70kDa subunit (Flavoprotein) of complex II (1:500, ref. A11142, Molecular Probes), 48kDa (CORE 2) and 29kDa (Rieske iron-sulfur protein) subunits of complex III (1:1000 in both cases, ref. A11143 and A21346, respectively, Molecular Probes), 57kDa (COXI subunit) of complex IV (1:500, ref. 459600, Invitrogen), anti-AIF (1:1000, ref. A7549, Sigma), anti-SIRT3 (1:500, ref. AB40006, Abcam), anti-phospho-ERK1/2 (1:500, ref. 4370, Cell Signaling Technology), and anti-ERK1/2 (1:500, ref. 4695, Cell Signaling Technology). An antibody to porin (1:1000, ref. Ab15895, Abcam) and to tubulin (1:5000, ref. Ab7291, Abcam) was also used in order to determine the proportion of protein levels referred to total mitochondrial and total mass, respectively. The primary antibody was incubated 1 hour at room temperature, except for SIRT3, phospho-ERK1/2 and ERK1/2 which were incubated 16 hours at 4°C. The membrane was washed three times in 0.05% TBS-T buffer and incubated 1 hour at room temperature with the appropriate secondary antibodies [ECL Anti-mouse IgG, horseradish Peroxidase linked whole antibody-NA93IV GE Healthcare (1:5000) and ImmunoPure Goat Anti-Rabbit IgG peroxidase conjugated-31460 Pierce Biotechnology (1:100000)]. After five washes with 0.05% TBS-T buffer, bands were visualized by using an enhanced chemiluminescence HRP substrate (Millipore, MA, USA). Signal quantification and recording was performed with a ChemiDoc equipment (Bio-Rad Laboratories, Inc., Barcelona, Spain).

Protein oxidation, glycooxidation and lipoxidation

Markers of protein oxidation – the protein carbonyls glutamic (GSA) and amino adipic (AASA) semialdehydes, glycooxidation (carboxyethyl-lysine [CEL] and carboxymethyl-lysine [CML]), and lipoxidation (CML, and malondialdehyde-lysine [MDAL]) - were determined as trifluoroacetic acid methyl esters (TFAME) derivatives in acid hydrolyzed delipidated and reduced mitochondrial protein samples by GC/MS [21] using a HP6890 Series II gas chromatograph (Agilent, Barcelona, Spain) with a MSD5973A Series detector and a 7683 Series automatic injector, a HP-5MS column (30-m x 0.25-mm x 0.25- μ m), and the described temperature program [21]. Quantification was performed by internal and external standardization using standard curves constructed from mixtures of deuterated and non-deuterated standards. Analyses were carried out by selected ion-monitoring GC/MS (SIM-GC/MS). The ions used were: lysine and [$^2\text{H}_8$]lysine, m/z 180 and 187, respectively; 5-hydroxy-2-aminovaleric acid and [$^2\text{H}_5$]5-hydroxy-2-aminovaleric acid (stable derivatives of GSA), m/z 280 and 285, respectively; 6-hydroxy-2-aminocaproic acid and [$^2\text{H}_4$]6-hydroxy-2-aminocaproic acid (stable derivatives of AASA), m/z 294 and 298, respectively; CML and [$^2\text{H}_4$]CML, m/z 392 and 396, respectively; CEL and [$^2\text{H}_4$]CEL, m/z 379 and 383, respectively; and MDAL and [$^2\text{H}_8$]MDAL, m/z 474 and 482, respectively. The amounts of product were expressed as μ moles of GSA, AASA, CML, CEL or MDAL per mol of lysine.

Fatty acid analyses and global fatty acid unsaturation indexes

Fatty acids from mitochondrial lipids were analyzed as methyl esters derivatives by gas chromatography (GC) as previously described [22]. Separation was performed by a DBWAX capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.20 μ m) in a GC System 7890A with a Series Injector 7683B and a FID detector (Agilent Technologies, Barcelona, Spain). Identification of fatty acid methyl esters was made by comparison with authentic standards (Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden). Results are expressed as mol%.

The following fatty acyl indices were also calculated: saturated fatty acids (SFA); unsaturated fatty acids (UFA); monounsaturated fatty acids (MUFA); polyunsaturated fatty acids (PUFA) from n-3 and n-6 series (PUFAn-3 and PUFAn-6); and average chain length (ACL)=[($\Sigma\%$ Total₁₄ x 14) + ($\Sigma\%$ Total₁₆ x 16) + ($\Sigma\%$ Total₁₈ x 18) + ($\Sigma\%$ Total₂₀ x 20) + ($\Sigma\%$ Total₂₂ x 22) + ($\Sigma\%$ Total₂₄ x 24)]/100. The density of double bonds in the membrane was calculated by the Double Bond Index, DBI = [(1 x Σ mol% monoenoic) + (2 x Σ mol% dienoic) + (3 x Σ mol% trienoic) + (4 x Σ mol% tetraenoic) + (5 x Σ mol% pentaenoic) + (6 x Σ mol% hexaenoic)]. Finally, the membrane susceptibility to peroxidation was calculated by the Peroxidizability Index, PI= [(0.025 x Σ mol% monoenoic) + (1 x Σ mol% dienoic) + (2 x Σ mol% trienoic) + (4 x Σ mol% tetraenoic) + (6 x Σ mol% pentaenoic) + (8 x Σ mol% hexaenoic)].

Elongase and desaturase activities were estimated from specific product/substrate ratios [23]: $\Delta^9(n-9) = 18:1n-9/18:0$; $\Delta^5(n-6) = 20:4n-6/20:3n-6$; $\Delta^6(n-3) = 24:6n-3/24:5n-3$; $\Delta^6(n-3) = 18:4n-3/18:3n-3$; ELOVL5(n-6) = 20:2n-6/18:2n-6; ELOVL2 & 5 = 22:4n-6/20:4n-6; ELOVL2 & 5 = 22:5n-3/20:5n-3, and ELOVL2(n-3)= 24:5n-3/22:5n-3. Finally, peroxisomal β -oxidation was estimated according to the ratio 22:6n-3/24:6n-3.

Statistical analyses

Values were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were analyzed by Two way ANOVA followed by Student's t tests for paired comparisons between experimental groups. The minimum level of statistical significance was set at $P < 0.05$ in all the analyses.

Results

The AT group showed significantly higher rates of mtROSp than the Control group in the presence of glutamate/malate, glutamate/malate+rotenone or succinate, but not with succinate+rotenone or succinate+rotenone+antimycin A (Table 1). The MetR and the MetR+AT groups showed decreased rates of mtROSp than the controls with glutamate/malate but not with the other substrates or inhibitors combinations.

The rates of oxygen consumption in states 4 and 3 and the respiratory control ratio of heart mitochondria are shown on Table 2. No significant differences were detected in any group either with glutamate/malate or with succinate+rotenone as substrates.

The %FRL with glutamate/malate was significantly lower in MetR and in MetR+AT than in the controls, while AT increased the %FRL (results not shown). No significant differences in %FRL were found with succinate.

Both AT and MetR significantly decreased the level of oxidative damage in mtDNA (Fig. 1). The combined treatment with MetR+AT also decreased the 8-oxodG values compared to the control group while it showed statistically similar levels than the AT and MetR groups.

Atenolol alone decreased complex I (39KDa subunit) and increased complexes II, III (29KDa) and IV (Table 3). MetR decreased complex I (39 and 29KDa) and increased complexes II and III (29KDa). MetR+AT showed lower amounts of complex I (39 and 29KDa) than the AT group. MetR+AT showed higher amounts of complex II and complex III (48 KDa) than the MetR or the AT groups. MetR+AT showed higher complex IV amount than the Control and the MetR groups.

The amounts of AIF and SIRT3 were lower in MetR and MetR+AT than in the Controls (Table 3). AT alone also decreased SIRT3 but not AIF.

Both AT and MetR decreased GSA, AASA, CML and MDAL compared to the Control group (Fig. 2). The MetR+AT group showed lower GSA than the MetR group, as well as lower AASA and CML than the AT group. MetR also decreased CEL compared to controls.

Both AT and MetR increased p-ERK and the increase was higher with both treatments combined (MetR+AT) (Fig. 3).

Concerning fatty acid composition, AT significantly increased 18:1n-9 and 20:5n-3, and significantly decreased 20:4n-6, 22:5n-6, 22:6n-3, and 24:5n-3 compared to Controls (Table 4). MetR increased 14:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:4n-3, 20:1n-9, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:5n-3, 22:0, 22:4n-6, 22:5n-3, and 24:0, and decreased 18:0, 18:2n-6, 20:4n-6, 22:5n-6, and 22:6n-3. MetR+AT produced the same changes than MetR alone except for a lack of change in 22:4n-6 and, in

addition, increased 16:0, 18:3n-3, 20:0 compared to Controls. All the fatty acid values showed differences between AT and MetR+AT except for 22:4n-6, 24:5n-3 and 24:6n-3. The decrease in 18:0, 18:2n-6, 20:4n-6, 22:5n-6, and 22:6n-3, and the increase in 18:1n-9, 20:0, 20:1n-9, and 20:3n-6 were stronger in MetR+AT than in MetR.

The DBI and the PI decreased in AT and in MetR compared to the Control group (Fig. 4). Both the DBI and the PI were lower in MetR+AT than in AT or in MetR. Quantitatively, the main fatty acid changes responsible for these decreases in global membrane unsaturation were the increases in 18:1n-9 and the decreases in 18:2n-6, 20:4n-6, 22:5n-6 and 22:6n-3. Those changes in global unsaturation occurred without changing SFA and UFA in AT or MetR, while MetR+AT caused only a minor decrease in SFA and a minor increase in UFA compared to Controls and AT.

Among the enzymes involved in fatty acid synthesis, AT decreased Delta5n-6, Elovl2-5n-3 (22:5/20:5) and Elovl2n-3 (24:5/22:5) and increased Delta6n-3 (24:6/24:5) compared to Controls (Table 4). Both MetR and MetR+AT increased Delta9n-9, Elovl5n-6, Elovl2-5n-6 (22:4/20:4), and Delta6n-3 (24:6/24:5), and decreased Delta5n-6, Elovl2-5n-3 (22:5/20:5), Elovl2n-3 (24:5/22:5), and peroxisomal β -oxidation. The decrease in Delta5n-6 was stronger in MetR+AT than in AT alone.

Discussion

It is known that long-lived mammals and birds simultaneously show a low rate of mtROSp and a low degree of membrane fatty acid unsaturation [2-4]. These beneficial characteristics can be experimentally obtained in a single rodent species by dietary, protein or methionine restriction, or by pharmacological treatment with atenolol. In the present investigation it is shown for the first time that the combined treatment with MetR plus atenolol synergically decreases membrane fatty acid unsaturation and protein oxidation more acutely than the single treatments with MetR or atenolol alone. In addition, the combined treatment avoids any increase that AT can have on mtROSp.

In the present investigation, MetR decreased the mtROSp of heart mitochondria at complex I since the decrease was observed with glutamate/malate as substrates but not with succinate+rotenone or with succinate+rotenone+antimycin A. In the last two conditions electrons flow from succinate exclusively to complex III, whereas they flow through both complexes I and III with glutamate/malate. This decrease in mtROSp is not due to a simple decrease in mitochondrial oxygen consumption, since this parameter did not change. It can be due in part to the decrease in the amount of complex I protein observed in the present investigation, which is in agreement with previous studies [22,24,25]. However, qualitative complex I changes must also be involved in the decrease in complex I mtROSp since it was observed with glutamate/malate but not with glutamate/malate+rotenone, indicating that the decrease in mtROSp only occurs when complex I is partially reduced. Therefore, MetR induced a decreased tendency of complex I to leak electrons univalently to oxygen. Such increased efficiency also agrees with the decrease in %FRL observed in this and previous investigations [22,24,25]. Contrarily to MetR, in the present study it was observed that AT increased complex I mtROSp, since the increase was observed with glutamate/malate or succinate alone, but not with succinate+rotenone. This increase could counteract the beneficial effects of AT treatment on other oxidative stress-related parameters. However, the AT-induced increase in mtROSp disappeared in the MetR+AT group, indicating that the tendency of MetR to lower mtROSp compensates for the tendency of AT to increase it. Therefore, the combined treatment with MetR+AT avoids deleterious increases in mtROSp that could tend to abolish other benefits of the AT treatment (see below).

Concerning the cause of the decrease in complex I protein content in MetR, AIF can be involved. AIF, in addition to apoptotic functions, is also required for mitochondrial oxidative phosphorylation [26]. AIF is a mitochondrial flavoprotein involved in the assembly/maintenance of complex I. Therefore, it has been considered a double edged sword having both life and death functions in cells [26]. Our results show that the amount of AIF was decreased both in the MetR and in the MetR+AT groups compared to Controls which is consistent with the decrease in the amount of complex I in these two groups. Simultaneous decreases in the amounts of AIF and

complex I in MetR have been previously observed in rat liver and brain [22,24]. Concerning changes in other mitochondrial complexes, synergic effects of the combined MetR+AT treatment were observed for complexes II and III. The increase in complex II amount in the MetR+AT group was higher than those observed with the single treatment with AT or MetR, and whereas complex III (48KDa) was not increased with AT or MetR alone, it was increased with MetR+AT.

Regarding signaling mechanisms possibly involved in the AT and MetR treatments, SIRT3 and p-ERK were measured. In mammals, seven sirtuins (SIRT1-7) have been described [27] and they are emerging as important proteins in aging, stress resistance and metabolic regulation. Three mammalian sirtuins, SIRT 3, 4 and 5 are located within the mitochondrial matrix. Among mitochondrial sirtuins, recent studies have highlighted a role for SIRT3 in DR, as well in management of mitochondrial ROS [28]. It has been found that DR decreases oxidative damage in mice tissues and prevents age-related hearing loss, but these changes do not occur in SIRT3-lacking mice [29]. Therefore, in the present study we measured the amount of SIRT3 in order to clarify if it could be involved in signaling of the MetR effects. Our results show that the amount of SIRT3 was decreased (instead of increased) in the three experimental groups, AT, MetR, and MetR+AT. Thus, SIRT3 does not seem to be involved in the decreases in mtROSp and oxidative stress observed in this investigation. This should not be regarded as contradictory with data from Someya et al. [29] because it is known that the increase in longevity brought about by both protein restriction and MetR is only around 50% of that observed in DR models [30]. Therefore, it is possible that SIRT3 is involved in signaling of the longevity extension effects of DR not controlled by MetR.

In order to check for the signaling of the atenolol effects, we measured p-ERK. Binding of hormones and neurotransmitters to β -adrenergic receptors activates adenylyl cyclase increasing cAMP and then PKA. PKA inhibits Raf-1 which, in turn, stimulates p-MEK and p-ERK. p-ERK enters the nucleus where it can modify gene expression through the action of many different molecules. Since adenylyl cyclase stimulates PKA, and PKA inhibits Raf-1, an increase in the Raf/MEK/ERK pathway is expected when adenylyl cyclase is lacking or β -adrenergic receptors are blocked (e.g. with atenolol). In agreement with this, an increase in p-MEK and p-ERK has been observed in tissues of long-lived adenylyl cyclase 5 knock out mice including the heart [13]. This led to propose that the increase in longevity observed in that model was due in part to final lowering of oxidative stress mediated by the increase in p-ERK. In our case we have also observed that the two groups treated with atenolol (AT and MetR+AT) have higher levels of p-ERK. This suggests that the decreases in fatty acid unsaturation and protein oxidative stress induced by atenolol in the present investigation (see below) can also be due to changes in gene expression activated by increases in ERK-dependent signaling. In skeletal muscle cells it has been also shown that protection against exogenous H_2O_2 by IGF-1 pretreatment is brought about

in part by the MAPK/ERK pathway, highlighting the relationship between this signaling pathway and oxidative stress lowering [31]. In our study, MetR also increased p-ERK, but the increase was again stronger in the MetR+AT than either single treatment alone, showing again the synergy between the two treatments. In the present investigation an increase in p-ERK in MetR is observed for the first time in whole animals *in vivo*, which agrees with a previous study showing increases in this signalling protein in primary cultures of rat hepatocytes subjected to MetR *in vitro* [32].

AT changed the levels of some membrane fatty acids and MetR modified most of them. The global result was that both AT and MetR decreased the unsaturation degree of the fatty acids present in the mitochondrial membranes, as reflected in the lower DBI and PI of both the AT and the MetR groups. Synergy was also observed for this parameter, since the DBI and PI indexes in MetR+AT animals were lower than with either single treatment alone (AT or MetR). The fatty acid changes mainly responsible for the decrease in global unsaturation were the increase in the poorly unsaturated 18:1n-9 and the decrease in the highly unsaturated 20:4n-6, 22:5n-6 and 22:6n-3. Strikingly, these (specially 20:4n-6 and 22:6n-3) are also among the main fatty acids that change from short-lived to long-lived mammalian or bird species [4,33]. The result was a decrease in the global fatty acid unsaturation degree without changing the total amount of saturated or unsaturated fatty acids in the AT or MetR groups, just like what happens when comparing animal species with different longevities [4,33]. Interestingly, all the variations observed for all the main fatty acids responsible for the decreases in global membrane unsaturation showed synergism between the two experimental treatments. Thus, the increase in 18:1n-9, and the decreases in 20:4n-6, 22:5n-6 and 22:6n-3 in the MetR+AT group were stronger than with any single treatment alone.

Concerning the mechanisms responsible for these fatty acid changes, various desaturase and elongase enzymes which synthesize strongly unsaturated fatty acids like 20:4n-6 and 22:6n-3 from their dietary precursors seem to be involved. These include Delta5n-6, Elovl2-5n-3 (22:5/20:5), and Elovl2 n-3 (24:5/22:5) which decrease in the AT, MetR, and MetR+AT groups, while the other desaturase and elongase enzymes quantified can not be responsible because they were not modified or increased by the treatments. In addition, the strong decrease in peroxisomal β -oxidation can be important in the case of the decrease in 22:6n-3 induced by MetR, since it is known that peroxisomal β -oxidation is involved in the last steps of synthesis of highly unsaturated fatty acids like 22:6n-3 in the omega-3 synthesis pathway [23]. On the other hand, the increase in Delta 9n-9 can be responsible for the increases in 18:1n-9 in the MetR and MetR+AT groups.

The decrease in desaturase and elongases in the n-3 and n-6 series is likely one of the changes emerging from variation in the expression of nuclear genes as a specific response to β -

adrenergic-Raf/MEK/ERK signaling. While in the case of DR it is well known that this pro-longevity manipulation modulates the expression of hundreds of genes, recent information is emerging indicating that the same occurs during the life-extending response to MetR. It has been shown that protein restriction modulates the expression of a large number of genes in rat liver [34] and the same has been recently also shown for MetR in rat liver [35]. In this last study MetR significantly upregulated 172 and downregulated 113 genes by more than 1.5 fold. Among them, TaqMan qPCR analysis detected an increase in Elov16 in adipose tissue and a decrease in Elov15 in liver. Therefore, it is likely that the changes in particular desaturases, elongases and peroxisomal β -oxidation detected in the present investigation were similarly induced by MetR through changes in specific nuclear gene expression, finally contributing to decrease the unsaturation degree of the mitochondrial membranes.

In our study, a lowering of oxidative damage took place in heart mitochondrial proteins. All the five protein modification markers measured showed decreases in MetR similarly to what has been observed in various rat organs during DR and MetR [30]. AT also decreased the levels of GSA, AASA, CML and MDAL. Decreases in GSA, AASA and MDAL have been previously observed in the heart of AT-treated mice [12]. Globally, in the present investigation a decrease in protein oxidation, lipoxidation and glycooxidation was detected with both treatments. Synergy was detected for GSA which was lower in the MetR+AT than in the AT or MetR groups. AASA and CML were also lower in the MetR+AT than in the AT group. The decrease in protein modification can be due in part to the reduced mtROS_p in the MetR groups. Concerning the decreased protein modifications observed in the AT group they can be secondarily due to the decrease in fatty acid unsaturation, which can also contribute to decrease protein damage in MetR together with the decrease in mtROS_p. The decrease in fatty acid unsaturation lowers the susceptibility to lipid peroxidation and thus decreases the generation of secondary radicals and lipid peroxidation products which can modify other macromolecules including proteins. At least in the case of the MetR groups, another factor that could be involved is an increased catabolism of modified proteins since this has been described together with decreases in protein oxidation in DR animals [36].

In addition to the decrease in protein oxidative damage, both treatments showed benefits concerning the level of oxidative damage in mtDNA since it was decreased both in the MetR and in the AT groups compared to Controls. The decrease in 8-oxodG in MetR is likely due, at least in part, to the decrease in the rate of mtROS_p in this experimental group. A coordinated decrease in these two parameters has been observed both in DR and in MetR models in previous investigations [30], whereas when no changes were observed in mtROS_p, 8-oxodG levels in mtDNA did not vary either. However, in the present investigation 8-oxodG was also decreased in the AT group. Such a decrease can not be due to changes in mtROS_p since this parameter did not change in the AT group. But in the AT animals the global degree of mitochondrial membrane fatty acid unsaturation

decreased as reflected in the lowered DBI and PI indexes. Such a decrease in fatty acid unsaturation lowers the susceptibility to lipid peroxidation and thus will lower the production of secondary radicals which can contribute to reduce 8-oxodG levels in the AT group. This is more likely taking into account that mtDNA is physically associated with the inner mitochondrial membrane [37,38]. This location makes mtDNA especially vulnerable to membrane lipid peroxidation-derived damage. In agreement with this, previous studies have shown that lowering membrane fatty acid unsaturation by dietary means lowers 8-oxodG in mtDNA but not in the nuclear DNA of the same tissues and animals [11]. On the other hand, at variance with protein oxidation, the decrease in oxidative stress obtained by lowering mtROSp and the DBI and PI were not synergic in the case of mtDNA oxidative damage since it was similar in MetR+AT compared to the MetR or AT groups.

In summary, in this investigation it is shown that the two oxidative stress-related characteristics typical of long-lived animals, a low rate of mtROS generation and a low fatty acid unsaturation degree, can be obtained experimentally in rat heart mitochondria with the combined application of methionine restriction and atenolol treatments. MetR and AT showed synergic effects concerning global fatty acid unsaturation, the main changes in particular fatty acids, amounts of complex II and III, p-ERK, and protein oxidative modification. In addition, MetR totally abolished the increase in mtROSp induced by AT. Future studies are needed to ascertain whether these beneficial effects are also observed in other organs, cellular fractions and animal species.

Acknowledgements

This investigation was supported by a grant from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2011-23888) to G. Barja, and grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2009-118/79BFI) and the Generalitat of Catalonia (2009SGR735) to R. Pamplona. I. Sanchez received a pre-doctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education (FPU) and A. Gomez received a fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation (FPI).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest

References

1. Harman, D. (1972). The biological clock: the mitochondria. *J Am Geriatr Soc* 20,145-147.
2. Barja, G. (2004). Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Reviews* 79,235-251.
3. Pamplona, R., Barja, G. (2011). An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology* 12, 409-435.
4. Pamplona, R., Barja, G., Portero-Otín, M. (2002). Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation. *Ann New York Acad Sci* 959, 475-490.
5. Gredilla, R., Barja, G. (2005). The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146, 3713-3717.
6. Pamplona, R., Barja, G. (2006). Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta* 1757, 496- 508.
7. Orentreich, N., Matias, J.R., DeFelice, A., Zimmerman, J.A. (1993). Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr* 123, 269-274.
8. Richie, J.P. Jr., Leutzinger, Y., Parthasarathy, S., Malloy, V., Orentreich, N., Zimmerman, J.A. (1994). Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J* 8,1302-1307.
9. Miller, R.A., Buehner, G., Chang, Y., Harper, J.M., Sigler, R., Smith-Wheelock, M. (2005). Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 4,119-125.
10. Sun, L., Amir, A., Akha, S., Millar, R.A., Harper, J. (2009). Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age. *J Gerontol* 64A, 711–722.

11. Pamplona, R., Portero-Otín, M., Sanz, A., Requena, J., Barja, G. (2004). Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exper Gerontol* 39,725-733.
12. Sanchez-Roman, I., Gomez, J., Naudi, A., Ayala, V., Portero-Otín, M., Lopez-Torres, M., Pamplona, R. Barja, G. (2010). The β -blocker atenolol lowers the longevity-related degree of fatty acid unsaturation, decreases protein oxidative damage and increases ERK signaling in the heart of C57BL/6 mice. *Rejuven Res* 13, 683-693.
13. Yan, L., Vatner, D.E., O'Connor, J.P., Ivessa, A., Ge, H., Chen, W., Hirotani, S., Ishikawa Y., Sadoshima, J., Vatner, S.F. (2007). Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell* 130, 247–258.
14. Pamplona, R. (2011). Advanced lipoxidation end-products. *Chem Biol Interact* 192, 14-20.
15. Barja, G. (2004). Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 27, 595-600.
16. Mela, L., Seitz, S. (1997). Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue. *Methods Enzymol* 55, 39-46.
17. Barja, G. (2002). The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 34, 227-233.
18. Sanz, A., Barja, G. (2006). Estimation of the rate of production of oxygen radicals by mitochondria. In: M. Conn (Ed.), *Handbook of Models for Human Aging*, Academic Press, New York, pp. 183-189.
19. Latorre, A., Moya, A., Ayala, A. (1986). Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *PNAS* 83, 8649-8653.
20. Asunción, J.G., Millan, A., Pla, R., Bruseghini, L., Esteras, A., Pallardo, F.V., Sastre, J., Viña, J. (1996). Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 10, 333-338.
21. Pamplona, R., Dalfó, E., Ayala, V., Bellmunt, M.J., Prat, J., Ferrer, I., Portero-Otín, M. (2005). Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem* 280, 21522-21530.

22. Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., Naudi, A., Ayala, V., López-Torres, M., Pamplona, R., Barja, G. (2009). Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. *Rejuven Res* 12, 421-434.
23. Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P.G., Jacobsson, A. (2010). The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 49, 186-199.
24. Caro, P., Gomez, J., Lopez-Torres, M., Sanchez, I., Naudi, A., Jove, M., Pamplona, R., Barja, G. (2008). Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 9,183-196.
25. Sanchez-Roman, I., Gomez, A., Gomez, J., Suarez, H., Sanchez, C., Naudi, A., Ayala, V., Portero-Otin, M., Lopez-Torres, M., Pamplona, R., Barja, G. (2011). Forty percent methionine restriction lowers DNA methylation, complex I ROS generation, and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins in rat heart. *J Bioenerg Biomembr* 43, 699-708.
26. Porter, A.G., Urbano, A.G. (2006). Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *Bioessays*, 28, 834-843.
27. Verdin, E., Hirschey, M.D., Finley, L.W.S., Haigis, M.C. (2010). Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signalling. *Trends Biochem Sci* 35, 669-675.
28. Bell, E.L., Guarente, L. (2011). The SirT3 divining rod points to oxidative stress. *Molecular Cell* 42, 561-568.
29. Someya, S., Yu, W., Hallows, W.C., Xu, J., Vann, J.M., Leeuwenburgh, C., Tanokura, M., Denu, J.M., Prolla, T.A. (2010). Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 143, 802-812.
30. Lopez-Torres, M., Barja, G. (2008). Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction Possible implications for humans. *Biochim Biophys Acta* 1780, 1337-1347.

31. Yang, S.Y., Hoy, M., Fuller, B., Sales, K.M., Seifalian, A.M., Winslet, M.C. (2010). Pretreatment with insulin-like growth factor I protects skeletal muscle cells against oxidative damage via PI3K/Akt and ERK1/2 MAPK pathways. *Lab Invest* 90, 391-401.
32. Tsai, C.W., Lin, A.H., Wang, T.S., Liu, K.L., Chen, H.W., Lii, C.K. (2010). Methionine restriction up-regulates the expression of the pi class of glutathione S-transferase partially via the extracellular signal-regulated kinase activator protein-1 signaling pathway initiated by glutathione depletion. *Mol Nutr Food Res* 54, 841-850.
33. Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R., Buttemer, W.A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev* 87, 1175-1213.
34. Kalhan, S.C., Uppal, S.O., Moorman, J.L., Bennett, C., Gruca, L.L., Parimi, P.S., Dasarathy, S., Serre, D., Hanson, R.W. (2011). Metabolic and genomic response to dietary isocaloric protein restriction in the rat. *J Biol Chem* 286, 5266-5277.
35. Perrone, C.E., Mattocks, D.A.L., Plummer, J.D., Chittur, S.V., Mohney, R., Vignola, K., Orentreich, D.S., Orentreich, N. (2012). Genomic and metabolic responses to methionine-restricted and methionine-restricted, cysteine-supplemented diets in Fischer 344 rat inguinal adipose tissue, liver and quadriceps muscle. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 5, 132-157.
36. Dhabi, J.M., Monte, P.L., Wingo, J., Rowley, B.C., Cao, S.X., Waldford, R.L., Spindler, S.R. (2001). Caloric restriction alters the feeding response of key metabolic enzyme genes. *Mech Ageing Dev* 122, 1033-1048.
37. Albring, M., Griffith, J., Attardi, G. (1977). Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication. *PNAS* 74, 1348-1352.
38. Holt, I.J., He, J., Mao, C., Boyd-Kirkup, J.D., Martinsson, P., Sembongi, H., Reyes, A., Spelbrnk, J.N. (2007). Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome. *Mitochondrion* 7, 311-321.

Table 1. Reactive oxygen species (ROS) production rates of rat heart mitochondria in Control, AT, MetR, and MetR+AT groups under different assay conditions.

	Control	AT	MetR	MetR+AT
Glu/mal	0.17±0.02	0.26±0.03 ^a	0.09±0.01 ^a	0.15±0.03 ^{b,c}
Glu/mal+rotenone	2.07±0.20	2.60±0.20 ^a	1.72±0.11	1.93±0.17
Succinate	2.89±0.27	3.66±0.32 ^a	2.27±0.37	2.84±0.41
Succinate+rotenone	0.55±0.08	0.72±0.08	0.52±0.04	0.60±0.10
Succinate+rotenone+AA	5.54±0.24	5.94±0.33	0.568±0.24	5.98±0.35

Values are means ± SEM (nmoles of H₂O₂/min · mg protein) from 6-8 different animals. Glu/mal = glutamate/malate. AA = Antimycin A. a= significantly different from Control group; b = significant difference between the AT and the MetR+AT groups; c = significant difference between the MetR and the MetR+AT groups.

Table 2. Oxygen consumption rates and respiratory control ratio of heart mitochondria in Control, AT, MetR, and MetR+AT rats.

	Control	AT	MetR	MetR+AT
Glu/mal (State 4)	43.0±4.3	42.7±4.6	41.4±4.8	38.5±4.4
Glu/mal (State 3)	182.3±18.4	170.3±19.1	136.5±11.5	183.9±17.5
Glu/mal (RCR)	4.3±0.6	4.1±0.4	3.6±0.4	4.9±0.4
Succinate+rotenone (State 4)	101.7±8.9	106.0±9.9	109.6±16.0	125.1±12.2
Succinate+rotenone (State 3)	252.3±15.6	256.5±30.8	262.0±22.5	272.1±28.5
Succinate+rotenone (RCR)	2.6±0.1	2.5±0.1	2.5±0.1	2.6±0.1

Values are means ± SEM (nmoles of O₂/ min · mg protein) from 7-8 different animals. State 4: oxygen consumption in the absence of ADP. State 3: oxygen consumption in the presence of 500µM ADP. Glu/mal = glutamate/malate. RCR: Respiratory control ratio.

Table 3. Amounts of respiratory complexes, AIF, and SIRT3, in Control, AT, MetR, and MetR+AT groups.

	Control	AT	MetR	MetR+AT
Complex I (39 KDa)	0.27±0.006	0.25±0.005 ^a	0.23±0.002 ^a	0.23±0.005 ^{a,b}
Complex I (29KDa)	0.33±0.029	0.26±0.005	0.21±0.032 ^a	0.18±0.005 ^{a,b}
Complex II	0.40±0.019	0.73±0.078 ^a	0.82±0.113 ^a	1.22±0.018 ^{a,b,c}
Complex III (48KDa)	0.15±0.010	0.19±0.007	0.21±0.008	0.31±0.034 ^{a,b,c}
Complex III (29KDa)	0.61±0.007	0.78±0.062 ^a	0.80±0.027 ^a	0.88±0.020 ^a
Complex IV	1.41±0.054	1.79±0.083 ^a	1.42±0.080	1.96±0.109 ^{a,c}
AIF	0.41±0.005	0.34±0.045	0.33±0.004 ^a	0.33±0.014 ^a
SIRT3	0.56±0.024	0.37±0.042 ^a	0.42±0.013 ^a	0.34±0.011 ^a

Values are means ± SEM from 3 different animals. Values are relative units from ratio densitometry ETC peptide or factor/densitometry porin. a= significantly different from Control group; b = significant difference between the AT and the MetR+AT groups; c = significant difference between the MetR and the MetR+AT groups.

Table 4. Fatty acids, desaturases and elongases of heart mitochondria in Control, AT, MetR, and MetR+AT rats.

	Control	AT	MetR	MetR + AT
14:0	0.34±0.05	0.56±0.05	0.98±0.05 ^a	1.11±0.12 ^{a,b}
16:0	12.31±0.37	12.11±0.25	13.08±0.28	13.47±0.31 ^{a,b}
16:1n-7	0.34±0.01	0.36±0.01	0.73±0.07 ^a	0.80±0.04 ^{a,b}
18:0	22.40±0.19	22.54±0.19	19.44±0.35 ^a	17.35±0.45 ^{a,b,c}
18:1n-9	8.05±0.17	10.83±0.45 ^a	14.51±0.43 ^a	20.98±1.13 ^{a,b,c}
18:2n-6	19.21±0.18	19.70±0.34	17.16±0.38 ^a	15.43±0.37 ^{a,b,c}
18:3n-3	0.46±0.04	0.39±0.04	0.65±0.07	0.68±0.08 ^{a,b}
18:4n-3	0.31±0.04	0.30±0.05	0.66±0.06 ^a	0.90±0.13 ^{a,b}
20:0	0.44±0.05	0.33±0.01	0.60±0.04	1.18±0.25 ^{a,b,c}
20:1n-9	0.34±0.02	0.34±0.04	0.56±0.03 ^a	0.81±0.10 ^{a,b,c}
20:2n-6	0.52±0.03	0.54±0.03	0.73±0.04 ^a	0.74±0.07 ^{a,b}
20:3n-6	0.48±0.02	0.56±0.03	1.46±0.16 ^a	2.28±0.29 ^{a,b,c}
20:4n-6	21.60±0.19	20.09±0.33 ^a	16.85±0.28 ^a	14.31±0.50 ^{a,b,c}
20:5n-3	0.12±0.01	0.24±0.02 ^a	0.47±0.02 ^a	0.53±0.08 ^{a,b}
22:0	0.16±0.01	0.20±0.02	0.65±0.08 ^a	0.75±0.06 ^{a,b}
22:4n-6	1.30±0.06	1.19±0.02	1.70±0.20 ^a	1.28±0.08 ^c
22:5n-6	4.72±0.27	3.58±0.09 ^a	2.99±0.27 ^a	1.98±0.20 ^{a,b,c}
22:5n-3	0.96±0.05	1.01±0.06	1.64±0.12 ^a	1.73±0.15 ^{a,b}
24:0	0.43±0.02	0.45±0.03	0.89±0.08 ^a	0.75±0.08 ^{a,b}
22:6n-3	5.24±0.17	4.49±0.16 ^a	4.02±0.18 ^a	2.68±0.22 ^{a,b,c}
24:5n-3	0.12±0.01	0.06±0.005 ^a	0.09±0.007	0.09±0.02
24:6n-3	0.03±0.005	0.03±0.002	0.05±0.004	0.06±0.01
ACL	18.73±0.02	18.62±0.01 ^a	18.60±0.03 ^a	18.46±0.02 ^{a,b,c}
SFA	36.11±0.25	36.23±0.37	35.66±0.41	34.63±0.51 ^{a,b}
UFA	63.88±0.25	63.76±0.37	64.33±0.41	65.36±0.51 ^{a,b}
MUFA	8.74±0.19	11.53±0.46 ^a	15.81±0.46 ^a	22.60±1.11 ^{a,b,c}
PUFA	55.13±0.44	52.23±0.64 ^a	48.51±0.71 ^a	42.76±0.89 ^{a,b,c}
PUFAn-3	7.27±0.16	6.55±0.23 ^a	7.61±0.19	6.70±0.25 ^c
PUFAn-6	47.86±0.42	45.67±0.64 ^a	40.90±0.69 ^a	36.05±0.74 ^{a,b,c}
Delta9 n-9	0.35±0.008	0.48±0.01	0.74±0.02 ^a	1.21±0.06 ^{a,b,c}
Elovl5 n-6	0.02±0.001	0.02±0.001	0.04±0.002 ^a	0.04±0.005 ^{a,b}
Elovl2-5 n-6 (22:4/20:4)	0.06±0.002	0.05±0.001	0.10±0.01 ^a	0.09±0.005 ^{a,b}
Delta5 n-6	44.80±2.00	36.95±2.89 ^a	12.30±1.39 ^a	7.57±1.50 ^{a,b}
Elovl2-5 n-3 (22:5/20:5)	7.96±0.36	4.51±0.63 ^a	3.50±0.35 ^a	3.85±0.67 ^a
Elovl2 n-3 (24:5/22:5)	0.13±0.02	0.05±0.002 ^a	0.05±0.005 ^a	0.06±0.01 ^a
Delta6n-3 (24:6/24:5)	0.33±0.05	0.65±0.03 ^a	0.66±0.05 ^a	0.67±0.06 ^a
Delta6 n-3 (18:4/18:3)	0.68±0.07	0.78±0.11	1.19±0.29	1.48±0.25 ^{a,b}
Peroxisomal β-oxidation	148.13±25.56	119.00±7.39	71.46±7.70 ^a	55.96±10.83 ^{a,b}

Values (moles %) are means ± SEM from 5-8 different animals. Abbreviations and calculations of fatty acid classes, desaturases and elongases are explained in the Materials and Methods section. a= significantly different from Control group; b = significant difference between the AT and the MetR+AT groups; c = significant difference between the MetR and the MetR+AT groups.

Figure Legends

Fig. 1. Oxidative damage to mtDNA in heart mitochondria from Control, AT, MetR and MetR+AT rats. Values (8-oxodG/ 10^5 dG) are means \pm SEM from 6-7 different animals. a= significantly different from Control group.

Fig. 2. Protein oxidation, glycoxidation and lipoxidation indicators in heart mitochondria from Control, AT, MetR and MetR+AT rats. Values are means \pm SEM from 7-8 different animals and are expressed as percentage of those in the controls for each protein modification marker. Control values: 4,950.75 \pm 149.31 (glutamic semialdehyde, GSA); 293.14 \pm 9.05 (AASA, amino adipic semialdehyde, AASA); 315.72 \pm 17.10 (carboxyethyl-lysine, CEL); 1,732.91 \pm 95.99 (carboxymethyl-lysine, CML); 372.20 \pm 37.59 (malondialdehyde-lysine, MDAL). Units: μ mol/mol lysine. a= significantly different from Control group; b = significant difference between the AT and the MetR+AT groups; c = significant difference between the MetR and the MetR+AT groups.

Fig. 3. Phosphorylated extracellular-signalling regulated kinase (p-ERK) in Control, AT, MetR and MetR+AT rats. Values are means \pm SEM from 3 different animals. p-ERK values were calculated as p-ERK1/2 divided by total (non-phosphorylated) ERK1/2. a= significantly different from Control group; b = significant difference between the AT and the MetR+AT groups; c = significant difference between the MetR and the MetR+AT groups.

Fig. 4. Global indexes of membrane fatty acid unsaturation in heart mitochondria from Control, AT, MetR and MetR+AT rats. DBI = double bond index; PI = peroxidizability index (for calculations see Materials and Methods). Values are means \pm SEM from 7-8 different animals. a= significantly different from Control group; b = significant difference between the AT and the MetR+AT groups; c = significant difference between the MetR and the MetR+AT groups.

Figure 1

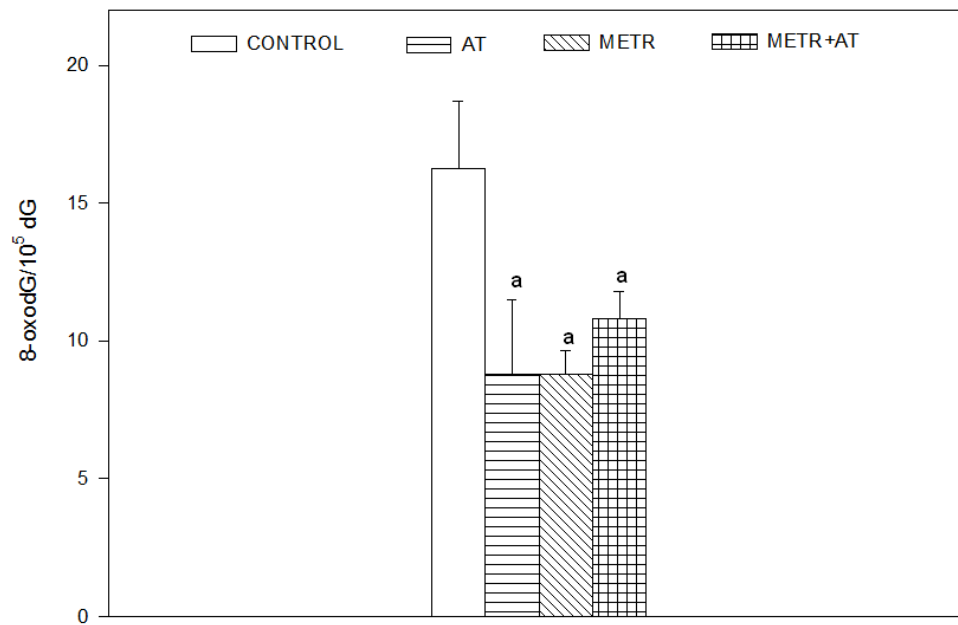


Figure 2

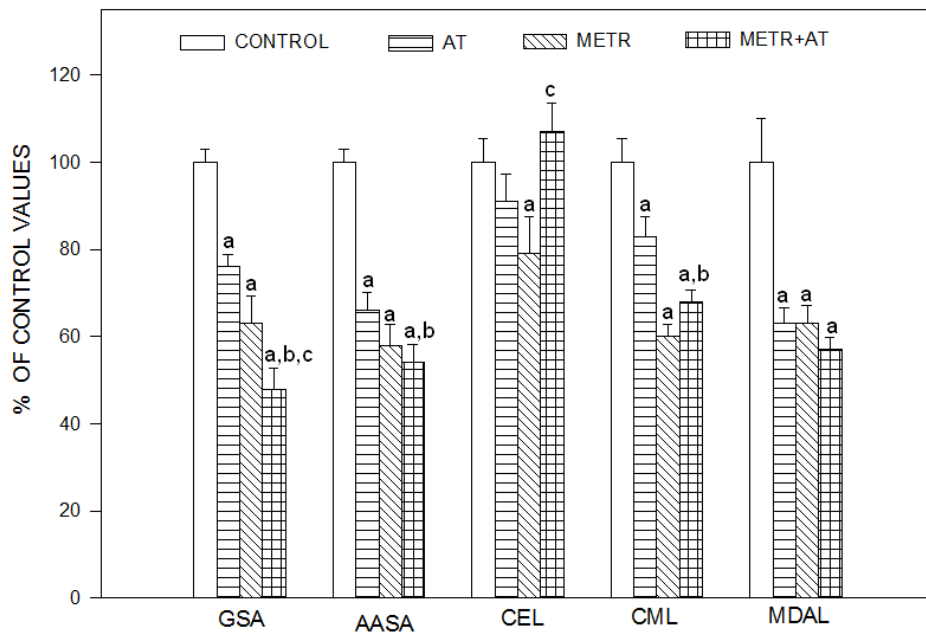


Figure 3

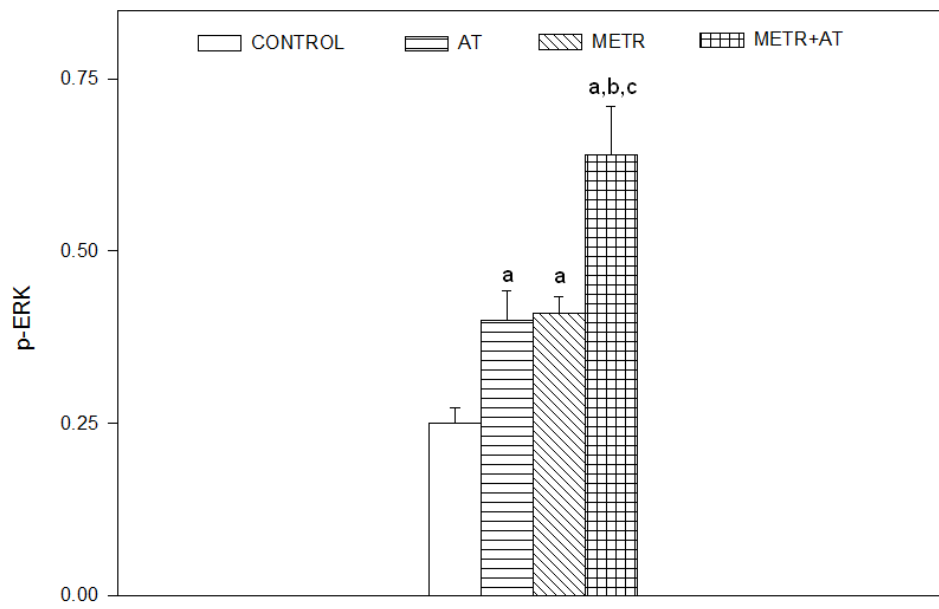
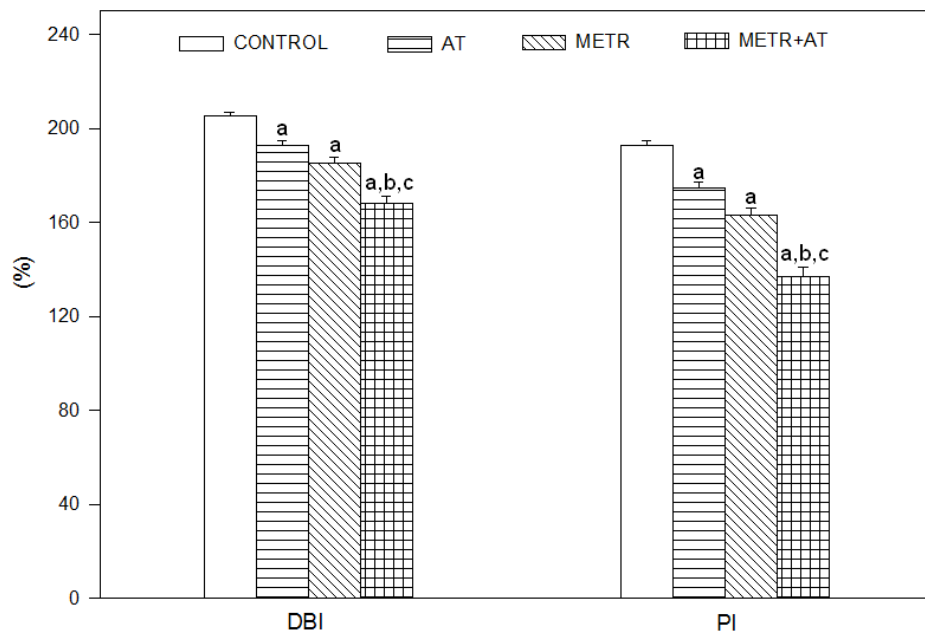


Figure 4



DISCUSIÓN

1. RESUMEN DE LOS RESULTADOS MÁS SIGNIFICATIVOS

Los resultados más significativos y conclusiones parciales de la presente tesis se exponen a continuación:

Capítulo I: Efecto de la restricción de metionina en la dieta sobre el estrés oxidativo mitocondrial

OBJETIVO 1: La restricción de metionina reduce la producción mitocondrial de radicales libres, el daño oxidativo y el grado de metilación del ADN genómico en el corazón de rata.

La restricción isocalórica de metionina al 40% a corto plazo (7 semanas) disminuyó la producción mitocondrial de ROS exclusivamente en el complejo I y redujo el daño oxidativo al ADN mitocondrial, con un descenso en ambos casos del 15%. Esta intervención también disminuyó los marcadores de lipoxidación, glicoxidación y oxidación proteica y el grado de metilación del ADN genómico en el corazón de rata Wistar. El tratamiento no produjo cambios significativos en el consumo de oxígeno mitocondrial, así como tampoco en la cantidad de los complejos respiratorios (I a IV), del factor inductor de apoptosis (AIF), de la enzima antioxidante MnSOD ni de la Sirtuina 5. Tampoco se vio modificado el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana. Los resultados indican que la metionina podría ser el factor dietético responsable de la disminución de la producción mitocondrial de ROS y del daño oxidativo y de parte del incremento de longevidad que se produce en la restricción de dieta y en la restricción de metionina al 80%.

OBJETIVO 2: La restricción de metionina es efectiva para disminuir el estrés oxidativo en el hígado de rata cuando se lleva a cabo en animales de edad avanzada, de forma similar a lo que ocurre en animales jóvenes.

La restricción isocalórica de metionina al 40% a corto plazo (7 semanas) implementada en animales de edad avanzada (24 meses) disminuyó la producción mitocondrial de ROS y la fuga de radicales libres en el complejo I al comparar tanto con animales viejos como con jóvenes control y redujo el daño oxidativo al ADN mitocondrial en comparación con los animales viejos control. Además, no se detectaron cambios en estos parámetros entre los animales jóvenes y viejos control.

La oxidación, lipoxidación y glicoxidación proteica se incrementaron con la edad y la restricción de metionina aplicada en animales viejos revirtió parcial (en el caso del marcador CEL) o totalmente (en los casos de los marcadores GSA, AASA y CML) estos aumentos. Los animales viejos control mostraron mayor cantidad de Sirtuina 1, y la restricción de metionina redujo sus niveles y los del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) e incrementó la cantidad del complejo IV. El resto de complejos respiratorios, factores antioxidantes (Nrf2 y MnSOD) y la proteína clave para la biogénesis mitocondrial, PGC1, no se vieron modificados ni por el envejecimiento ni por el tratamiento, al igual que sucedió con el grado de metilación del ADN. Nuestros resultados indican que las ratas viejas conservan la capacidad de disminuir el estrés oxidativo en respuesta a un periodo corto de restricción de metionina al 40%, de forma similar a lo que ocurre en animales jóvenes.

Capítulo II: Modulación del estrés oxidativo mitocondrial mediante el bloqueo de la señalización β -adrenérgica

OBJETIVO 3: El tratamiento con el β -bloqueante atenolol modula la composición lipídica y disminuye el daño oxidativo a proteínas mediante un incremento de la señalización p-ERK en corazón de ratón C57BL/6.

El bloqueo de la señalización β -adrenérgica mediante el tratamiento con el bloqueante β 1-adrenérgico, atenolol, no modificó la producción mitocondrial de ROS ni el daño oxidativo al ADN mitocondrial. En cambio, sí afectó al otro parámetro que relaciona longevidad y estrés oxidativo: el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana. El tratamiento con atenolol disminuyó el número de dobles enlaces (DBI) con un descenso del 30% y el índice de peroxidizabilidad (PI) en un 40%, lo que principalmente se debió a la disminución de los ácidos grasos altamente insaturados: 22:6n-3 y 20:4n-6 y al incremento de los saturados y monoinsaturados: 18:1n-9, 16:1n-7 y 16:0. La oxidación y lipoxidación proteica se vieron disminuidas por el tratamiento con atenolol, mientras que la glicoxidación proteica se incrementó en los ratones tratados con el fármaco. La cantidad de los complejos respiratorios I y IV, al igual que la cantidad de la proteína de señalización p-ERK fue mayor en los animales tratados con atenolol. Nuestros resultados sugieren que el incremento de longevidad

observado en los ratones AC5KO podría estar relacionado con la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana y el consiguiente menor daño lipoxidativo a las proteínas celulares, que podría estar inducido por un incremento en la señalización mediada por la proteína p-ERK, como ha sido descrito tras 2 semanas de tratamiento con atenolol.

Capítulo III: Efectos sinérgicos e independientes del tratamiento conjunto de la restricción de metionina en la dieta y el bloqueo de la señalización β -adrenérgica sobre el estrés oxidativo mitocondrial.

OBJETIVO 4: El tratamiento simultáneo con el β -bloqueante atenolol y la restricción de metionina en la dieta es más eficiente que cualquiera de los dos tratamientos por separado en disminuir el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana y la modificación proteica, así como en incrementar la proteína de señalización p-ERK.

La restricción isocalórica de metionina al 40% a corto plazo (7 semanas) disminuyó la producción mitocondrial de ROS y la cantidad del complejo I. Sin embargo, el tratamiento con atenolol incrementó la producción mitocondrial de radicales libres del complejo I, aunque este incremento fue revertido cuando ambos tratamientos se llevaron a cabo conjuntamente, al igual que sucedió con la fuga de radicales libres, que incluso fue menor en el tratamiento conjunto que en los animales control. Tanto la restricción de metionina como el tratamiento con atenolol implementados por separado, estimularon la fosforilación de la proteína de señalización ERK, disminuyeron el daño oxidativo al ADN mitocondrial y a las proteínas, así como el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, lo que pudo deberse, al menos en parte, a la disminución de las actividades desaturasa y elongasa o a la β -oxidación peroxisómica. Ambos tratamientos implementados de forma conjunta mostraron efectos sinérgicos sobre la disminución de la insaturación de los ácidos grasos de membrana, con una magnitud de descenso de un 20% en el caso del DBI y de un 30% en el del PI, y sobre la disminución de la oxidación proteica. Además, la proteína p-ERK (con un incremento de un 160%) también se vio aumentada de manera mucho más acusada cuando ambos tratamientos se llevaron a cabo simultáneamente.

Tabla D1: Cambios en los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en distintas intervenciones experimentales.

Intervención	Órgano	ROS	Cantidad complejos	%FRL	8-oxodG ADN mt	Marcadores daño proteico	Ref.
RMet 80%	Hígado	↓ CxI CxIII	↓ CxI, II, III y IV	↓ CxI	↓	↓	Sanz et al., 2006d
	Corazón	↓ CxI	↓ CxI y IV	↓ CxI	↓	↓	
RMet 40%	Hígado	↓ CxI CxIII	↓ CxI, II, III y IV	↓ CxI	↓	↓	Caro et al., 2008
	Cerebro	↓ CxI	↓ CxI, II, III y IV	↓ CxI	=	↓	Caro et al., 2009a
	Riñón	↓ CxI	↓ Cx IV	↓ CxI	↓	↓	
	Corazón	↓ CxI	=	n.d.	↓	↓	Objetivo 1
↓ CxI		↓ CxI ↑ CxII y III	↓ CxI	↓	↓	Objetivo 4	
RMet 40% a edades avanzadas	Hígado	↓ CxI	↑ Cx IV	↓ CxI	↓	↓	Objetivo 2
RESTAAS 40%	Hígado	=	=	=	=	↓	Caro et al., 2009b
SupMet 2,5%	Hígado	↑ CxI	↓ Cx IV	↑ CxI	↑	=	Gomez et al., 2009
RMet 40% + Atenolol	Corazón	=	↓ CxI ↑ CxII y III	↓ CxI	↓	↓	Objetivo 4

Las intervenciones que se exponen en la presente tesis se señalan en negrita. El resto de resultados proceden de trabajos previos con RMet al 80%; RMet al 40%, RESTAAS (restricción de aminoácidos excepto metionina) y SupMet (suplementación de metionina en la dieta). Ref: Referencias; Cx: Complejo Respiratorio; ROS: producción mitocondrial de ROS; = Sin cambios; ↑ incremento; ↓ disminución. Todas las intervenciones se realizaron en rata.

Tabla D2: Cambios en los parámetros relacionados con la composición lipídica y estrés oxidativo en distintas intervenciones experimentales.

Intervención	Órgano	DBI	PI	SFA	PUFA	18:2n-6 18:3n-3	20:4n-6 22:6n-3	MDAL	Ref.
RProt 40%	Hígado	↓	↓	=	↓	↑	↓	↓	Ayala et al., 2007
RMet 80%	Hígado	↓	↓	↑	↓	=	↓	↓	Sanz et al., 2006d
	Corazón	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↓	
RMet 40%	Hígado	=	=	=	=	=	↓20:4n-6	↓	Caro et al., 2008
	Cerebro	=	=	=	=	=	=	↓	Caro et al., 2009b
	Riñón	=	=	=	=	=	=	↓	
	Corazón	{	=	=	=	=	=	=	↓
		↓	↓	=	↓	↑18:3n-3	↓	↓	Objetivo 4
Atenolol*	Corazón	↓	↓	=	↓	=	↓	↓	Objetivo 3
Atenolol	Corazón	↓	↓	=	=	=	↓	↓	Objetivo 4
RMet 40% + Atenolol	Corazón	↓	↓	↓	↓	↑18:3n-3	↓	↓	Objetivo 4

Las intervenciones que se exponen en la presente tesis se señalan en negrita. El resto de resultados proceden de trabajos previos con RProt (restricción de proteínas); RMet al 80% y RMet al 40%. Ref.: Referencia; DBI: Índice de dobles enlaces; PI: Índice de peroxidizabilidad; SFA: Ácidos grasos saturados; PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados; MDAL: Malondialdehído lisina; = Sin cambios; ↑ incremento; ↓ disminución. *= Este experimento se llevó a cabo con ratones C57BL/6. El resto se realizó en rata.

2. EFECTO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA A CORTO PLAZO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL EN EL CORAZÓN DE RATA

La manipulación experimental mejor conocida que disminuye la velocidad de envejecimiento en múltiples organismos es la restricción de dieta (RD) (McCay et al., 1935). Aunque los mecanismos a través de los cuales ejerce sus efectos no están claros, si se ha demostrado que la RD disminuye la generación mitocondrial de ROS en el complejo I y el estrés oxidativo mitocondrial en múltiples tejidos en roedores (Gredilla y Barja, 2005). Con el fin de determinar el componente de la dieta causante de esta disminución, diversos trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que la restricción de proteínas (RP) también disminuye la producción mitocondrial de ROS en el complejo I y el daño oxidativo mitocondrial en el hígado de rata (Sanz et al., 2004; Ayala et al., 2007), al igual que incrementa la longevidad máxima en roedores, pero en menor magnitud que la RD (Ross, 1961; Barrows et al., 1975; Leto et al., 1976; Goodrick, 1978). En cambio, ni la restricción de lípidos (Sanz et al., 2006b) ni la de hidratos de carbono (Sanz et al., 2006c) modifica estos parámetros y ambas intervenciones carecen de efecto sobre la longevidad en roedores (Ross, 1976; Khorakova et al., 1990; Shimokawa et al., 1996)

Con el objeto de intentar encontrar el componente proteico responsable de la disminución en el estrés oxidativo mitocondrial durante la RD y la RP, en nuestro laboratorio nos centramos en el aminoácido metionina debido a que numerosos indicios apuntan a este aminoácido como agente clave en el envejecimiento: 1) Diversos estudios confirman que la restricción de metionina isocalórica incrementa la longevidad de rata y ratón (Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994; Miller et al., 2005; Sun et al., 2009), de forma similar a como lo hace la RP (Ross, 1961; Barrows et al., 1975; Leto et al., 1976; Goodrick, 1978), aunque en ambos casos con menor efecto que la RD; 2) La ingesta excesiva de metionina en la dieta es tóxica y esta toxicidad es mucho mayor que la producida por cualquier otro aminoácido (Harper et al., 1970) provocando daño en órganos vitales (como el aparato cardiovascular) e incrementos en el estrés oxidativo de numerosos tejidos (Mori y Hirayama, 2000; Hidiroglou et al., 2004; Park et al., 2008; Gomez et al., 2009); 3) La sobreexpresión de la enzima metionina sulfoxido reductasa (enzima que reduce la metionina sulfóxido a metionina

en una reacción dependiente de tiorredoxina) incrementa la longevidad en *D. melanogaster* (Ruan et al., 2002; Chung et al., 2010) y la manipulación contraria incrementa el daño oxidativo a proteínas y disminuye la longevidad (Moskovitz et al., 2001). Además, existen evidencias que apoyan el papel de esta enzima como agente protector contra el estrés oxidativo y regulador del envejecimiento en la mosca de la fruta (Lim et al., 2012); 4) Se ha demostrado que los ratones longevos *Ames dwarf* tienen el metabolismo de la metionina alterado y muestran un incremento en la vía de transulfuración de este aminoácido (Uthus y Brown-Borg, 2006). Además, recientemente ha sido descrito como el tratamiento con metformina incrementa la longevidad en *C. elegans* a través de la alteración de enzimas implicadas en el metabolismo de la metionina (Cabreiro et al., 2013); 5) Aunque existe cierta controversia, parece que el contenido en metionina de las proteínas correlaciona inversamente con la longevidad máxima en los mamíferos (Ruiz et al., 2005), lo que tiene sentido puesto que se trata de uno de los aminoácidos más sensibles al ataque por ROS (Moskovitz et al., 2001).

Por otro lado, además de sus efectos sobre la longevidad, la restricción de metionina al 80% también disminuye la incidencia de enfermedades degenerativas y conlleva numerosos efectos beneficiosos, algunos similares a los observados en animales sometidos a restricción de dieta, como: la disminución de los niveles séricos de IGF-1, insulina, glucosa, triglicéridos y hormona del crecimiento (Perrone et al., 2012a), el retraso de la aparición de alteraciones en el sistema inmune y el desarrollo de cataratas (Miller et al., 2005) y la reducción del tejido adiposo (Malloy et al., 2006). Además también ha sido descrito su posible papel como inhibidor del crecimiento de tumores en casos de cánceres que exhiben cierta dependencia de metionina (Hoffman, 1985, Komninou et al., 2006). Además, las similitudes con la restricción de dieta también incluyen los efectos sobre el estrés oxidativo. Un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio con restricción de metionina demostró, por primera vez, que la restricción de este aminoácido al 80% a corto plazo disminuía la generación de radicales libres en el complejo I y el daño oxidativo mitocondrial en el corazón (Sanz et al., 2006d). Sin embargo, frente a los cambios beneficiosos que ejerce esta intervención nutricional, también se observaron efectos negativos como la

disminución de la tasa de crecimiento y el tamaño corporal final (Caro et al., 2008), cambios también descritos en la restricción de dieta (Gredilla et al., 2001a,b).

Con el fin de evitar estos efectos negativos conservando los beneficiosos, en la presente tesis se ha estudiado el efecto de un menor nivel de restricción de metionina y se ha demostrado que **la restricción de metionina al 40% a corto plazo disminuye la generación de radicales libres en el complejo I y el estrés oxidativo mitocondrial en el corazón**, al igual que la restricción de metionina al 80%, pero sin efectos negativos sobre el crecimiento y el tamaño corporal. Aunque el envejecimiento produce un deterioro funcional y estructural de forma progresiva en múltiples órganos, tiene en particular efectos muy marcados en el sistema cardiovascular (Fontana et al., 2012). El corazón, al ser un tejido postmitótico, manifiesta mejor los efectos perjudiciales del paso del tiempo y esto lo convierte en un órgano clave en estudios de envejecimiento. Por tanto, cualquier intervención capaz de retrasar dicho proceso de envejecimiento también protegerá frente a desórdenes cardiovasculares, una de las mayores causas de mortalidad en el mundo desarrollado.

La reducción de la producción mitocondrial de radicales libres en corazón tras la restricción de metionina al 40% se produjo **exclusivamente en el complejo I** con una magnitud del 15%, menor que el descenso observado en el estudio llevado a cabo con restricción de metionina al 80%, por lo que puede existir un efecto dosis-dependiente del grado de reducción de este aminoácido en la dieta sobre la producción mitocondrial de ROS. Llama la atención que la restricción de dieta no induce cambios en la producción mitocondrial de radicales libres en este órgano tras un periodo corto de tratamiento, 7 semanas, que es el que ha sido llevado a cabo en nuestro estudio, siendo necesaria una restricción de dieta de 1 año para observar efectos sobre la producción mitocondrial de radicales libres en el corazón (Gredilla et al., 2002). Queda claro por tanto que el efecto de la restricción de metionina sobre la producción de radicales libres es más acusado que el de la restricción de dieta, que necesita más tiempo para ejercer efectos sobre este parámetro. Además, aumentar el porcentaje de restricción de este aminoácido en la dieta también ejerce un efecto más intenso sobre la producción mitocondrial de ROS. De forma similar a lo que ha sido descrito en nuestro trabajo, la restricción de metionina al 40% en otros órganos vitales como

riñón, cerebro e hígado también induce la disminución de la producción de radicales libres en el complejo I (Tabla D1). En el caso de la suplementación de metionina en la dieta (2,5% final en dieta) esta intervención incrementó la producción de radicales libres en el complejo I en las mitocondrias hepáticas de rata. Sin embargo, dicha manipulación no modificó la producción mitocondrial de ROS en corazón de rata (Gomez et al., 2009). Por lo tanto, parece que el tejido hepático muestra mayor sensibilidad a los efectos de la suplementación de metionina en la dieta, que podrían ser considerados órgano-específicos, de forma diferente a lo que ha sido descrito en restricción de metionina al 40%, que disminuye la producción mitocondrial de radicales libres en todos los órganos estudiados hasta la fecha: riñón, cerebro, hígado y corazón (Tabla D1). En cualquier caso, el incremento de la producción de radicales libres en las mitocondrias hepáticas como resultado de la suplementación de metionina en la dieta podría constituir un mecanismo posible para explicar la hepatotoxicidad descrita en los animales sometidos a esta intervención. Respecto al papel que podrían jugar los aminoácidos (sin tener en cuenta la metionina) sobre el estrés oxidativo, existe un trabajo que demuestra que el tratamiento con una dieta en la que todos los aminoácidos fueron restringidos al 40% excepto la metionina, durante 7 semanas, no modificó la producción mitocondrial de ROS en el hígado de rata (Caro et al., 2009b). Por lo tanto, de acuerdo con nuestros datos y con los trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, **la disminución de la producción de radicales libres por el complejo I podría estar mediada únicamente por la reducción de la ingesta de una sola molécula, el aminoácido metionina.**

Como se comentó en la introducción, el consumo de oxígeno mitocondrial puede modificar la producción mitocondrial de ROS a través de alteraciones en el flujo electrónico y en la presión parcial de oxígeno. A pesar de que en nuestro estudio la restricción de metionina incrementó el consumo de oxígeno, lo hizo sólo en el estado fosforilante (con ADP) y con el sustrato del complejo II, succinato, por lo que esto no explica la disminución de la producción de radicales libres observada en nuestro estudio, dado que esta se produjo sólo con el sustrato del complejo I, piruvato, el inhibidor rotenona y sin ADP. Variaciones en el consumo de oxígeno se han detectado también en el corazón pero con el sustrato del complejo I en el trabajo con restricción

de metionina al 80% (Sanz et al., 2006d). Sin embargo, en ese caso, las dietas utilizadas fueron ligeramente diferentes a las utilizadas en la presente tesis, siendo la disminución de metionina compensada con el incremento de ácido glutámico, lo que los autores propusieron como responsable del incremento del consumo de oxígeno detectado en ese estudio. En nuestro trabajo y en otros previos con restricción de metionina al 40% no se observa efecto alguno sobre el consumo de oxígeno con el sustrato del complejo I, por lo que la modulación de la producción mitocondrial de radicales libres debe estar respondiendo a otros factores, explicación que será abordada con detalle en el apartado 6.

De acuerdo con la disminución de la producción mitocondrial de radicales libres que se observa en nuestro trabajo y con una magnitud de descenso similar, **la restricción de metionina al 40% redujo el daño oxidativo al ADN mitocondrial** (estimado como los niveles de 8-oxodG) en un 16% en el corazón de rata, lo que sucedió también durante la restricción de metionina al 80% en corazón pero con un descenso mayor, del 36% (Sanz et al., 2006d). La reducción del daño oxidativo al ADN bajo la restricción de metionina al 80% también ha sido descrita en un trabajo reciente llevado a cabo por Maddineni y colaboradores, en el que se obtiene la disminución de los niveles del marcador 8-hidroxidesoxiguanosina en plasma desde el primer mes de tratamiento (Maddineni et al., 2013). De forma similar a lo que había sido observado respecto a la generación de radicales libres, la restricción de dieta no indujo el descenso del daño oxidativo al ADN mitocondrial cuando el tratamiento se produjo a corto (6 semanas) o medio plazo (4 meses) siendo necesario un periodo de 1 año de restricción de dieta para detectar efectos sobre los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial (Gredilla et al., 2002). Por lo tanto, el efecto que ejerce la restricción de metionina sobre la producción de ROS y el consiguiente daño oxidativo al ADN mitocondrial en corazón es más efectivo que el de la restricción de dieta, lo que encaja bastante bien con la idea de que la metionina podría ser la responsable de la reducción de la producción de daño y la acumulación de éste. Los resultados obtenidos muestran que la restricción de metionina al 40% es suficiente para disminuir el daño oxidativo al ADN mitocondrial, aunque la magnitud del descenso es menor que lo obtenido con la restricción de este aminoácido al 80% (Sanz et al., 2006d). Estudios llevados a cabo en

otros órganos con restricción de metionina al 40% también han demostrado que esta intervención disminuye el daño oxidativo al ADN mitocondrial en riñón e hígado pero no en cerebro (Caro et al., 2008; Caro et al., 2009a). Dado que los radicales libres pueden producir roturas en la cadena de ADN además de oxidar las bases, la restricción de metionina podría contribuir a extender la longevidad mediante la disminución de mutaciones y de generación de fragmentos de ADN mitocondrial y, por lo tanto, de su menor acumulación en el ADN nuclear según el mecanismo de inserción de fragmentos de ADN mitocondrial en el ADN nuclear (Richter, 1988; Caro et al., 2010).

Respecto al daño a proteínas y de forma similar a lo observado sobre el daño al ADN mitocondrial, la restricción de metionina al 40% condujo a descensos significativos en los niveles de todos los marcadores de oxidación proteica analizados: GSA y AASA (marcadores de oxidación), CEL y CML (de glicoxidación) y MDAL (de lipoxidación) en corazón de rata. El mayor descenso (58%) fue observado en el caso del marcador de daño lipoxidativo: MDAL, mientras que los otros marcadores de modificación proteica disminuyeron entre un 19% y un 35%, lo que podría estar indicando el papel destacado de este marcador, MDAL bajo esta intervención nutricional. El descenso en estos marcadores coincide con la disminución de la producción mitocondrial de radicales libres y ha sido previamente descrito también en trabajos de restricción de metionina al 80% (Sanz et al., 2006d; Ayala et al., 2007) y de restricción de dieta en corazón a medio plazo (Pamplona et al., 2002a,b). De forma similar, un trabajo reciente ha descrito la disminución en plasma de los marcadores 8-isoprostano (de peroxidación lipídica) y GSH unido a proteína (como marcador de oxidación proteica) tras la restricción de metionina al 80% durante 6 meses con resultados detectables desde el primer mes (Maddineni et al., 2013). Por lo tanto, **nuestros resultados junto con los obtenidos en otros trabajos refuerzan la idea de que la metionina es la responsable del descenso en el daño oxidativo asociado a la restricción de dieta.**

Debido a que el marcador que sufrió el mayor descenso tras la intervención nutricional, el MDAL, es dependiente de la peroxidación lipídica y esta a su vez lo es del número de dobles enlaces por ácido graso, en nuestro trabajo también se analizó la

composición total de los ácidos grasos de las mitocondrias cardíacas. La restricción de metionina al 40% no modificó el número total de dobles enlaces (DBI) ni el índice de peroxidizabilidad (PI), tan solo indujo cambios leves en tres ácidos grasos, el aumento del ácido graso 16:1n-7 y descensos de los ácidos grasos 18:0 y 22:5n-3. Estos cambios fueron casi insignificantes y no tuvieron consecuencias en los índices de insaturación global. Por lo tanto, la menor producción mitocondrial de ROS parece disminuir directamente los procesos de oxidación, glicoxidación y sobre todo, lipoxidación proteica. Sin embargo, respecto a la insaturación de los ácidos grasos de membrana si existe diferencia respecto al trabajo previo de restricción de metionina al 80% en corazón (Sanz et al., 2006d), que sí fue capaz de disminuir el índice de dobles enlaces y de peroxidizabilidad, al igual que ocurrió tras la restricción proteica en hígado (Sanz et al., 2004). Sin embargo y de acuerdo con nuestros resultados, otros trabajos con restricción de metionina al 40% en riñón y cerebro (Caro et al., 2009a) e incluso trabajos con restricción de dieta a corto y medio plazo no modifican el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana (Pamplona et al., 2002b), por lo que parece que estas intervenciones nutricionales no ejercerían efectos claros sobre la composición de los ácidos grasos de membrana. Por lo tanto, de los dos parámetros relacionados con el estrés oxidativo que son característicos de las especies longevas, **la baja producción mitocondrial de ROS parece ser el factor implicado en el efecto de extensión de longevidad observado en la restricción de metionina.**

Se ha demostrado que las variaciones de metionina en la dieta conllevan alteraciones de los niveles de los aminoácidos sulfurados y de los metabolitos de la metionina: así, la restricción de metionina al 80% disminuye los niveles séricos de metionina, cisteína, cistationina y taurina, mientras que los niveles de homocisteína (Elshorbagy et al., 2010) y GSH plasmática (Richie et al., 1994) se incrementan y, por otro lado, la suplementación de metionina en la dieta incrementa la metionina y sus dos metabolitos más cercanos: SAM y SAH en hígado y corazón y, concretamente en el corazón induce un aumento en el potencial de metilación (medido como la relación SAM/SAH) (Gomez et al., 2009). Por todo esto, pensamos que nuestra intervención nutricional podría repercutir sobre la metilación del ADN a través del efecto potencial de estos metabolitos (especialmente SAM) sobre este proceso de modificación

epigenética. Así, nuestra hipótesis se vio confirmada dado que en nuestro trabajo se demostró por primera vez que **existe una relación entre la restricción de metionina y la metilación del ADN, induciendo esta intervención una disminución en el porcentaje de metilación global del ADN** genómico en corazón. Este efecto podría explicarse porque la metionina de la dieta es esencial para la síntesis de SAM, que proporciona grupos metilos al ADN y al disminuir su cantidad como respuesta a la restricción de metionina, podría verse alterada la metilación del ADN. Dado que estos procesos de modificación epigenética son mecanismos importantes de modulación de la expresión génica, la restricción de metionina podría estar regulando la expresión de ciertos genes a través de cambios en este proceso. Respecto a si esta modificación se ve afectada por el envejecimiento, en general el contenido total de metilcitosina en el genoma disminuye con la edad (Richardson, 2003; Heyn et al., 2012), aunque también se ha descrito el efecto contrario en un estudio longitudinal llevado a cabo con humanos (Bjornsson et al., 2008). En cuanto al papel que la restricción de dieta podría mediar sobre este parámetro, los trabajos que existen apoyan la premisa de que esta intervención si podría afectar a los procesos epigenéticos, en particular la metilación del ADN. Por ejemplo, y de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, la restricción de dieta en ratones indujo la hipometilación global del ADN en el hígado (Miyamura et al., 1993), poniendo de manifiesto otra vez la similitud de ambas intervenciones nutricionales. Sin embargo, la mayoría de estudios con restricción de dieta y metilación del ADN han sido enfocados hacia el análisis del estado de la metilación de genes concretos, dado que serían los cambios de metilación en sitios específicos del ADN los responsables del envejecimiento o enfermedades relacionadas (Issa et al., 1994; Kwabi-Addo et al., 2007). Por ejemplo, en ratones la restricción de dieta suprimió los cambios producidos con la edad en la metilación del oncogén *c-myc* (Miyamura et al., 1993) y en ratas restringidas se demostró que se inducía la hipermetilación del oncogén *c-Ha-ras* en células pancreáticas (Hass et al., 1993). Así mismo, en trabajos con humanos también se demostró como la metilación del ADN en dos *loci* específicos de células mononucleares de sangre periférica se veía incrementada tras restricción de dieta (Milagro et al., 2011). En cualquier caso, parece que la restricción de dieta y de metionina ejercerían efectos sobre la metilación del ADN, que podrían modular la expresión de ciertos genes, aunque son necesarios más

estudios con el fin de esclarecer que genes se ven modulados, bajo qué mecanismos y qué consecuencias tiene.

Aunque actualmente en debate (Baur et al., 2010; Burnett et al., 2011), las sirtuinas han sido implicadas en el control de la longevidad durante la RD o directamente en modelos de invertebrados. Cabe destacar las funciones de tres sirtuinas mitocondriales SIRT3, SIRT4 y SIRT5, que se encargan de la regulación de la actividad de enzimas mitocondriales y de la respuesta metabólica a periodos de ayuno o restricción de dieta (Chalkiadaki y Guarente, 2012). Particularmente, la proteína SIRT5 se activa como respuesta a la restricción de dieta e induce la activación de la enzima CPS1 (Carbamoil fosfato sintasa 1) que estimula el ciclo de la urea para eliminar amoniaco, un producto tóxico del catabolismo de los aminoácidos, con el fin de prevenir efectos tóxicos en condiciones de limitación de nutrientes (Nakagawa y Guarente, 2009). Sin embargo nuestros resultados muestran que la cantidad de esta proteína, la SIRT5, no fue modificada por esta intervención nutricional, por lo que parece que la reducción de metionina no es capaz por sí sola de activar esta proteína y a su vez, sus efectos no están mediados por ella.

En resumen, de acuerdo con nuestros datos y conforme a resultados previos con restricción de metionina, **la reducción en la ingesta de este aminoácido podría ser la responsable de la disminución del estrés oxidativo y de parte del incremento de longevidad observado en la restricción de dieta.** Dado que el consumo de proteínas (y, por tanto, metionina) por parte de las poblaciones occidentales es muy superior al necesario, disminuirlo a los niveles recomendados podría suponer la posibilidad de conseguir reducir el estrés oxidativo e incrementar la longevidad en humanos mediante una manipulación que evitaría los efectos indeseables de la RD. Por otro lado, el efecto restante de la RD sobre la longevidad podría ser debido a la disminución de otros componentes dietéticos o a las calorías por sí mismas a través de mecanismos adicionales que podrían implicar por ejemplo la activación de las sirtuinas.

3. RESTRICCIÓN DE METIONINA Y ENVEJECIMIENTO: EFECTO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA A CORTO PLAZO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL EN EL HÍGADO DE ANIMALES VIEJOS

El hígado es un órgano especialmente útil en estudios con intervenciones nutricionales dado que tiene un papel central en la regulación de la homeostasis de la glucosa y de los lípidos. Respecto a la restricción de metionina, además de extender la longevidad en roedores y producir diferentes efectos beneficiosos, esta intervención ejerce también una serie de efectos específicos en el hígado que conducen a la disminución de la síntesis de triglicéridos, al aumento de la sensibilidad a insulina y a la mejora de la homeostasis de la glucosa mediante la regulación de la expresión de diversos genes (revisado en Perrone et al., 2012a). Además, en relación al estrés oxidativo, diversos estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que la restricción de metionina tanto al 40% como al 80% en el hígado de ratas jóvenes y con un tratamiento a corto plazo disminuye la producción mitocondrial de radicales libres en el complejo I y el estrés oxidativo mitocondrial (Sanz et al., 2006d; Caro et al., 2008), siendo la reducción en la producción de radicales libres algo mayor con la restricción de metionina al 80%, tal y como ha sido discutido en el apartado anterior en el caso del corazón. A su vez, estos efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo son similares a los obtenidos previamente en nuestro grupo en estudios con restricción de dieta a corto plazo en hígado y también en estudios de restricción proteica (Gredilla et al., 2001a; Sanz et al., 2004). Por otro lado, como se comentó en el apartado anterior, la suplementación de metionina en la dieta (2,5% total en dieta) ejerce el efecto contrario al que produce la restricción de metionina sobre el estrés oxidativo. Es decir, induce el incremento de la generación de radicales libres en el complejo I y el daño oxidativo en mitocondrias hepáticas, lo que avala una vez más el papel de este aminoácido sobre la modulación del estrés oxidativo mitocondrial (Gomez et al., 2009).

Los efectos positivos de la restricción de metionina sobre el estrés oxidativo y la longevidad han sido estudiados en diversos trabajos, pero hasta hace poco se desconocía si existía alguna edad a la que esta intervención nutricional dejaba de ser efectiva. La duda se resolvió con el trabajo que Sun y colaboradores llevaron a cabo en

el año 2009 en el que se demostró que la restricción de metionina al 65% iniciada a edades avanzadas (12 meses) era capaz de incrementar la longevidad en ratones (Sun et al., 2009), aunque en menor medida que cuando se inicia a edades más tempranas como ha sido descrito en otros trabajos (Orentreich et al., 1993; Richie et al., 1994; Miller et al., 2005). El hecho de que exista un mayor efecto sobre la longevidad cuanto mayor es el tiempo de restricción coincidiría con la hipótesis de que la reducción de la generación de radicales libres puede ser el mecanismo a través del cual esta intervención incrementa la longevidad. Esto se explicaría dado que cuanto menor es el tiempo de restricción, menor es el periodo de tiempo en el que la producción mitocondrial de ROS se encuentra reducida y mayor es el daño que puede estar generándose.

Acerca de lo que ocurre respecto al estrés oxidativo a edades avanzadas bajo esta manipulación, nuestro trabajo demuestra que **a los 24 meses de edad las ratas Wistar conservan la capacidad de reducir la producción de radicales libres y el estrés oxidativo mitocondrial en respuesta a la restricción de metionina al 40%**, de forma similar a lo que ha sido demostrado en ratas jóvenes (Caro et al., 2008; Caro et al., 2009a; Sanchez-Roman y Barja, 2013). Esta capacidad para responder a la restricción de metionina disminuyendo el estrés oxidativo podría contribuir a explicar los efectos positivos sobre la longevidad de la restricción de metionina iniciada en animales viejos descrita por Sun y colaboradores (Sun et al., 2009).

De acuerdo con nuestros datos, la producción mitocondrial de radicales libres en el complejo I, con glutamato como sustrato, disminuyó en los animales viejos restringidos en metionina en torno al 50% con respecto tanto a los animales viejos control como a los jóvenes control, aunque sin diferencias significativas entre estos dos últimos grupos experimentales. **Estos descensos se produjeron a través de la disminución de la fuga de radicales libres en el complejo I**, lo que quiere decir que las mitocondrias de los animales viejos sometidos a restricción de metionina fueron más eficaces que las mitocondrias de los animales viejos y jóvenes controles en evitar la producción de radicales libres. Esta situación es similar a la descrita previamente en restricción de dieta en animales viejos tanto en hígado (Lopez-Torres et al., 2002) como en cerebro (Sanz et al., 2005a) pero con tratamientos más largos. Nuestros

resultados se suman así a numerosos trabajos que han descrito, como nosotros, la ausencia de cambios con la edad en la producción mitocondrial de radicales libres en hígado (Lopez-Torres et al., 2002), corazón (Gredilla et al., 2001a; Mansouri et al., 2006), músculo esquelético (Drew et al., 2003) y cerebro (Sanz et al., 2005a; LeBel y Bondy, 1991). Aunque existen trabajos que han descrito lo contrario, un aumento en la producción de radicales libres con la edad, estos se han referido a la producción de radicales libres por parte del complejo III (que como se explicó en la introducción no parece ser el generador de ROS determinante en procesos de envejecimiento) (Moghaddas et al., 2003), a la producción de radicales libres por parte de una fracción mitocondrial específica del tejido cardíaco, las mitocondrias subsarcolémicas (Judge et al., 2005) o utilizando ratones de edad superior (27 meses) (Mansouri et al., 2006) a la utilizada en este trabajo (24 meses). Por ello, la ausencia de cambios con la edad en la producción mitocondrial de radicales libres en el complejo I coincide con la mayoría de trabajos y encaja con la idea de que las causas del envejecimiento han de darse con la misma intensidad a todas las edades, pues el envejecimiento no se acelera sistemáticamente con la edad. Según una de las reglas de Strehler, el envejecimiento es progresivo. Lo que aumentaría con la edad serían las consecuencias finales del daño, no su producción.

La disminución en la producción mitocondrial de radicales libres en nuestro estudio no se produjo como resultado de incrementos en el consumo de oxígeno dado que este parámetro descendió en los animales viejos sometidos a restricción de metionina con succinato y rotenona en estado 4 y no se vio modificado con el sustrato glutamato, que es el que produjo diferencias en la producción de ROS. Por otro lado, los animales viejos alimentados con dieta control mostraron un menor consumo mitocondrial de oxígeno frente a los animales jóvenes con ambos sustratos. Debido a que estos descensos sólo fueron observados en estado 4 (sin ADP) pero no en el estado fosforilante, no implicarían una pérdida de la capacidad bioenergética durante el envejecimiento.

De acuerdo con la disminución de la generación y fuga de radicales libres, **la restricción de metionina iniciada a edades avanzadas redujo el daño oxidativo al ADN mitocondrial** en un 24% en los animales restringidos respecto a los animales

viejos alimentados con dieta control. Aunque no hubo diferencias significativas entre los animales jóvenes y viejos control, el nivel del marcador 8-oxodG se redujo en los animales viejos restringidos a niveles inferiores a los detectados en los animales jóvenes, lo que indica que la restricción de metionina no sólo corrigió los efectos de la edad, sino que desarrolló un mayor efecto. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en restricción de dieta a edades avanzadas en cerebro (Sanz et al., 2005a) y en hígado (Lopez-Torres et al., 2002) y refuerzan, una vez más, la idea de que la restricción dietética ejerce sus efectos sobre el estrés oxidativo a través de la reducción en la ingesta de metionina, incluso en tratamientos iniciados a edades avanzadas.

La correspondencia entre nuestros datos de producción mitocondrial de ROS y de daño oxidativo mitocondrial tanto como resultado del tratamiento como en función de la edad consolidan la teoría de que existe una relación directa entre la producción de ROS en el complejo I y el daño que sufre el ADN mitocondrial (Gredilla y Barja, 2005). La ausencia de cambios con la edad en el daño oxidativo al ADN mitocondrial, estimado como el nivel del marcador 8-oxodG, está de acuerdo con un estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio en cerebro (Sanz et al., 2005a) pero difiere de los resultados obtenidos en otros trabajos en hígado con ratas (Hudson et al., 1998; Lopez-Torres et al., 2002) que han demostrado un incremento del marcador 8-oxodG con la edad, aunque cabe destacar que en uno de los trabajos la edad de los animales adultos (11 meses) fue superior a la utilizada en nuestro estudio (6 meses) (Lopez-Torres et al., 2002), pudiendo esto explicar las diferencias obtenidas. Por otro lado, el aumento del daño oxidativo al ADN mitocondrial con la edad ha sido descrito en numerosos trabajos en relación a la detección de deleciones, duplicaciones y mutaciones puntuales. Así, parece que las deleciones múltiples en el ADN mitocondrial se acumularían en músculo esquelético, cerebro y corazón de roedores y humanos con el envejecimiento (revisado en Lee y Wei, 2012). Estos resultados, junto con otros trabajos que han descrito la escasa proporción de mutaciones puntuales en el ADN mitocondrial en humanos (Munscher et al., 1993), a excepción de los denominados “puntos calientes” (Michikawa et al., 1999), destacan que las deleciones en el ADN mitocondrial parecen ser abundantes e importantes en relación al fenómeno del

envejecimiento. Por ello y como se comentó en la introducción, una hipótesis alternativa que reconciliaría los resultados contradictorios descritos respecto a los cambios del daño oxidativo en función de la edad (Greaves y Turnbull, 2009) es la propuesta por Richter en 1988 (Richter, 1988). Esta hipótesis propone que los fragmentos de ADN mitocondrial, generados por el daño de los radicales libres, “escaparían” de la mitocondria y se acumularían en el ADN nuclear con el tiempo, induciendo así el proceso del envejecimiento. De acuerdo con ello, se ha descrito un aumento de la presencia de estos fragmentos de ADN mitocondrial en el ADN nuclear durante el envejecimiento tanto en *S.cerevisiae* (Cheng y Ivessa, 2010) como en ratas (Caro et al., 2010). La ausencia de cambios con la edad en el daño oxidativo al ADN mitocondrial encajaría con esta hipótesis, así como con la ausencia de cambios con la edad en la producción mitocondrial de radicales libres. Sería interesante, por tanto, el estudio de la presencia de estos fragmentos con la edad en diferentes tejidos y especies.

Por otro lado, dado que la presencia del marcador 8-oxodG en el ADN mitocondrial refleja el balance entre el daño oxidativo y la reparación (en el caso del ADN mitocondrial por la vía BER, actividad reparadora por escisión de base), la ausencia de cambios con la edad en el daño oxidativo al ADN mitocondrial observado en nuestro estudio, podría explicarse en base a un incremento de esta actividad reparadora, que podría estar corrigiendo la acumulación del daño con la edad. Además, las diferencias entre los resultados obtenidos en distintos órganos podrían deberse a que la capacidad reparadora de BER ha sido descrita como órgano-específica, demostrando la mayoría de las investigaciones con roedores en tejido hepático y cardíaco incrementos o ausencia de cambios con la edad en la actividad de varias de las enzimas encargadas de esta vía de reparación (revisado en Gredilla et al., 2012), por lo que la ausencia de cambios con la edad en el daño oxidativo al ADN mitocondrial observado en nuestro estudio podría explicarse por un aumento en la vía de reparación BER en las mitocondrias hepáticas. En cualquier caso, nuestros resultados avalan la hipótesis de **que los animales viejos son capaces de responder a la restricción de metionina disminuyendo el daño oxidativo al ADN mitocondrial**

posiblemente debido a la menor producción de radicales libres tras un tratamiento a corto plazo.

Además, en nuestro trabajo, el menor daño oxidativo al ADN mitocondrial inducido por la restricción de metionina se vio acompañado por el descenso generalizado de los marcadores de modificación proteica. **Todos los marcadores medidos incrementaron sus niveles con la edad y la restricción de metionina a edades avanzadas fue capaz de revertir parcial** (en el caso de CEL) o **totalmente** (en los casos de: GSA, AASA y CML) **estos incrementos**. Por lo tanto, la oxidación, lipoxidación y glicoxidación proteica fue menor en los animales viejos restringidos en metionina que en los animales viejos control, de forma similar a lo que ha sido descrito previamente en animales jóvenes tanto en hígado (Caro et al., 2008) como en otros órganos (Caro et al., 2009a) y también con respecto a otro marcador de modificación proteica descrito recientemente, el marcador CMC (S-Carboximetil-cisteína), que disminuye su cantidad tras la restricción de dieta y de metionina a corto plazo en mitocondrias hepáticas (Naudi et al., 2013). Una cuestión lógica es preguntarse a qué se debe el incremento con la edad de los niveles de los marcadores de modificación proteica y su reversión mediante la restricción de metionina. Aparte del papel de la producción mitocondrial de ROS como responsable de los cambios en la modificación proteica, otra explicación se basa en que el envejecimiento se ha asociado con una reducción de la actividad del proteasoma (Kastle y Grune, 2011), lo que explicaría el incremento de los marcadores de modificación proteica con la edad. A su vez, también ha sido descrito que la restricción de dieta incrementa el catabolismo de las proteínas dañadas (Dhahbi et al., 2001), por lo que podríamos esperar que un mecanismo similar, de aumento de procesos catabólicos de proteínas modificadas, podría estar operando bajo la restricción de metionina, sin embargo esto aún se desconoce. Otra hipótesis, propuesta por el Dr. Hipkiss recientemente, está basada en que la restricción de metionina podría conducir a una disminución en el producto deletéreo metilglioxal por la menor utilización de aminoácidos y la reducción en la síntesis proteica, lo que conduciría directamente a una menor proteotoxicidad (Hipkiss, 2012). Sin embargo, no hay ningún dato experimental que avale esta hipótesis.

A pesar de que la inducción de la biogénesis mitocondrial se ha propuesto como otro posible mecanismo implicado en los efectos beneficiosos de la restricción dietética (Martin-Montalvo y Cabo, 2012; Nisoli et al., 2005), en nuestro trabajo la restricción de metionina no modificó los niveles de PGC1, que es la proteína clave que regula estos procesos (Lopez-Lluch et al., 2008) e incluso en el caso del factor de transcripción mitocondrial A, la restricción de metionina disminuyó sus niveles con respecto a los animales viejos. Por ello, **la reducción del estrés oxidativo en nuestro trabajo no parece tener relación con la biogénesis mitocondrial**. Sin embargo, otros estudios con restricción de metionina, en este caso al 80%, sí han demostrado un incremento de la biogénesis mitocondrial en cerebro, descrito por un aumento de la cantidad de la proteína clave en este proceso, PGC1 (Naudi et al., 2007) y en tejido adiposo, hígado y músculo esquelético (Perrone et al., 2010), órganos en los que se ha descrito un incremento en la expresión génica de Ppargc1a y otros genes implicados en la regulación de este proceso, de forma más acusada en tejido adiposo. Así, los efectos de la restricción de metionina sobre la biogénesis mitocondrial podrían ser diferentes dependiendo del tejido a estudiar, de la edad a la que se inicia el tratamiento y también del grado de restricción de este aminoácido.

Por otra parte, otros factores que han sido relacionados con la RD son las sirtuinas. En concreto, diversos autores han propuesto que la restricción de dieta podría ejercer efectos sobre los patrones de metilación del ADN destinados a revertir los cambios que son inducidos por la edad y podrían estar mediados por la Sirtuina 1, dado que se ha demostrado que esta proteína ejerce efectos sobre la metilación del ADN y sobre la expresión de genes que responden a la RD (Wakeling et al., 2009; Ions et al., 2012). Como se explicó en el apartado anterior, la restricción de metionina al 40% disminuyó el grado de metilación global del ADN genómico en corazón. Sin embargo, cuando esta intervención se inició **a edades avanzadas y con el hígado como órgano de estudio, no se detectaron cambios en el grado de metilación del ADN genómico** ni como consecuencia del tratamiento ni de la edad, aunque sí se apreció un descenso no significativo en los animales viejos. La falta de efecto del tratamiento podría ser debida a que la metilación del ADN es susceptible a cambiar durante el envejecimiento de forma compleja (Fraga et al., 2005) y quizá es más difícil de modular mediante

intervenciones nutricionales cuando ya los patrones de metilación están fijados de forma estable. En cuanto al posible papel de la SIRT1, la edad incrementó la cantidad de esta proteína pero la restricción de metionina revirtió este incremento e incluso disminuyó su nivel por debajo del detectado en animales jóvenes (aunque sin diferencias significativas respecto a estos). A pesar de que estos resultados puedan parecer poco lógicos, están en línea con estudios previos que muestran un incremento de esta proteína con la edad en diferentes tejidos de roedores (Koltai et al., 2010; Braidy et al., 2011). Lo que sí parece disminuir con la edad es la actividad de la proteína SIRT1, sugiriendo que la elevada cantidad de esta proteína se debería a la mayor presencia de moléculas inactivas de SIRT1 en los animales viejos, lo que podría deberse al mayor daño oxidativo inducido por la edad, que estaría alterando esta proteína. La restricción de metionina al reducir el daño oxidativo podría disminuir el número de moléculas inactivas de SIRT1 y no sería necesario el mecanismo compensatorio de incrementar su cantidad.

En resumen, nuestros resultados demuestran que las **ratas viejas son capaces de responder a la restricción de metionina disminuyendo la producción mitocondrial de radicales libres y de forma consecuente el estrés oxidativo mitocondrial, de forma similar a lo descrito en animales jóvenes, así como en restricción de dieta a edades avanzadas**. Además, la restricción de metionina no indujo cambios en la biogénesis mitocondrial y redujo la cantidad de SIRT1, lo que nos hace proponer que estos mecanismos podrían estar influyendo en el mayor incremento de longevidad que ejerce la restricción de dieta y que no es explicado por la restricción de metionina.

4. MODULACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL MEDIANTE EL BLOQUEO DE LA SEÑALIZACIÓN β -ADRENÉRGICA

Los ratones mutantes para la adenilato ciclasa tipo 5 (AC5), *AC5 knockout*, que presentan la señalización β -adrenérgica interrumpida, disfrutan de mayor longevidad media (30%) y máxima (12%) y están protegidos frente a la pérdida de densidad ósea y al desarrollo de cardiomiopatías que se producen durante el envejecimiento (Yan et al., 2007). El bloqueo de la señalización β -adrenérgica se puede imitar fácilmente mediante el uso de fármacos ampliamente utilizados por la población humana (β -

bloqueantes) lo que nos puede ayudar a aclarar los mecanismos a través de los cuales este modelo animal incrementa la longevidad. En nuestro estudio, el fármaco usado para inducir el bloqueo β -adrenérgico es el atenolol debido a que este fármaco presenta fuerte cardioselectividad y la isoforma mayoritaria en el corazón es la AC5 (Gottle et al., 2009). Además, se trata de un fármaco barato, fácilmente disponible, no tiene efectos secundarios importantes y se ha usado durante décadas para controlar la hipertensión y otras patologías cardiovasculares, aumentando la esperanza de vida de pacientes con fallo cardíaco, e incluso mostrando efectos anti-ateroscleróticos (Mangano et al., 1996; Gottlieb, 1998; Milne y Hong, 2004).

Yan y colaboradores propusieron como uno de los mecanismos responsables del incremento de longevidad en el modelo AC5KO la estimulación de la vía de señalización Raf/MEK/ERK y como consecuencia el incremento de la resistencia al estrés oxidativo y de la enzima antioxidante MnSOD (Yan et al., 2007) que, según un trabajo reciente llevado a cabo por los mismos autores, estaría regulada a nivel transcripcional por la vía de señalización SIRT1/FoxO3a (Lai et al., 2013). Esto está de acuerdo con diversos estudios previos que han demostrado que la activación crónica de los receptores β 1-adrenérgicos incrementa la producción mitocondrial y celular de ROS, disminuye la cantidad de la enzima MnSOD y media procesos de apoptosis (Singh et al., 2001; Srivastava et al., 2007; Biary y Akar, 2010). Por lo tanto, parece que la estimulación de la vía de señalización β -AR, que se incrementa con el envejecimiento, podría tener un papel fundamental en el desarrollo de cardiomiopatías a través de la regulación del estrés oxidativo (Lakatta, 1993; Swynghedauw et al., 1995). Por todas estas razones, pensamos que el bloqueo β -1AR podría ejercer efectos sobre el estrés oxidativo y mediar los mecanismos que incrementan la longevidad en los ratones AC5KO. Sin embargo, **nuestro tratamiento de dos semanas no indujo diferencias sobre la producción mitocondrial de radicales libres** con ninguno de los sustratos o inhibidores empleados en el corazón de ratón, lo que contrasta con lo que sucede en los modelos dietéticos que incrementan la longevidad: RC, RP y RMet (Gredilla y Barja, 2005; Sanz et al., 2004; Sanz et al., 2006d). Por lo tanto, el bloqueo de la señalización β -adrenérgica podría incrementar la longevidad en los ratones AC5KO mediante otro mecanismo (la disminución de la insaturación de los ácidos grasos de membrana)

diferente al que opera en la restricción de metionina, basado en la disminución de la producción mitocondrial de radicales libres. Respecto a la restricción de dieta, los ratones mutantes AC5KO exhiben ciertas características similares a los roedores sujetos a RD, como menor peso corporal, menor tejido adiposo y menores niveles de glucosa en sangre. Un trabajo reciente llevado a cabo por Yan y colaboradores ha revelado que existe cierta similitud en la expresión génica entre los ratones AC5KO y los sometidos a RD, sobre todo en la regulación del metabolismo lipídico en el hígado, la función muscular, la percepción sensorial en el cerebro y la expresión de la proteína SIRT 1 (Yan et al., 2012), lo que encaja con estudios llevados a cabo en levaduras mutantes para la PKA (Proteína Kinasa A), que han sido sugeridos como modelos genéticos de RD (Lin et al., 2002). Esto podría indicar que parte del efecto de la restricción de dieta sobre la longevidad compartiría mecanismos con el bloqueo β -adrenérgico. Sin embargo nuestro trabajo descarta que uno de estos mecanismos pueda ser la disminución de los radicales libres de origen mitocondrial. En cualquier caso, parece que la restricción de metionina y el bloqueo β -adrenérgico actuarían mediante mecanismos diferentes sobre la longevidad, mientras que la restricción de dieta podría incluir mecanismos desarrollados por ambos tratamientos.

A su vez, tampoco se detectaron diferencias en cuanto al consumo de oxígeno mitocondrial. De acuerdo con la ausencia de cambios en la producción mitocondrial de ROS, encontramos que el tratamiento con **atenolol no modificó los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial**. Como se ha comentado previamente, el nivel de este marcador de daño oxidativo es muy sensible a los cambios en la producción de ROS mitocondrial, y ambos parámetros son susceptibles a variar en el mismo sentido y en magnitud similar en roedores (Gredilla y Barja, 2005). Así, tanto la producción mitocondrial de ROS como los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial son menores en las especies longevas comparados con las especies de vida corta y en los animales restringidos en proteínas o en metionina comparados con los animales controles. Nuestro tratamiento con atenolol no mostró diferencias en la producción mitocondrial de ROS y de forma correspondiente tampoco en los niveles de 8-oxodG (Pamplona y Barja 2007), lo que marca otra vez una diferencia **entre el bloqueo β -adrenérgico y los modelos de restricción dietética, proteica y de metionina**.

Respecto a otros trabajos con β -bloqueantes y estrés oxidativo, la mayoría se han llevado a cabo con modelos de roedores que desarrollan cardiomiopatías. En ellos, los efectos más marcados sobre el estrés oxidativo se han descrito con otros β -bloqueantes, como el carvedilol y el propranolol mientras que en el tratamiento con atenolol no se han descrito efectos sobre el estrés oxidativo (Rehsia y Dhalla, 2010). Un trabajo con ratas sin patologías fue llevado a cabo por Funovic y colaboradores en 2008 relacionando el efecto de dos β -bloqueantes, atenolol y metoprolol, sobre el estrés nitroxidativo a diferentes edades en ratas, demostrándose que el estrés nitroxidativo fue disminuido por el tratamiento con metoprolol pero no por el tratamiento con atenolol (Funovic et al., 2008). Por lo tanto, parece que de acuerdo con nuestros resultados y otros trabajos con diferentes β -bloqueantes, el atenolol no ejerce efectos claros sobre la producción mitocondrial de radicales libres y el consiguiente daño oxidativo al ADN mitocondrial, poniendo de manifiesto que otros factores deben estar implicados en el incremento de longevidad observado en los ratones con la señalización β -adrenérgica interrumpida.

En relación a los ratones AC5KO, Yan y colaboradores llevaron a cabo medidas de resistencia al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno o radiación ultravioleta en fibroblastos aislados de estos ratones, encontrando una mayor resistencia al daño y un incremento de la enzima antioxidante MnSOD. Los autores propusieron que esta mayor resistencia al estrés oxidativo estaría mediada por la enzima antioxidante MnSOD y podría estar implicada en el incremento de longevidad observado en estos ratones. Sin embargo, como se ha descrito en la introducción, aunque los antioxidantes pueden estar implicados en la protección frente a enfermedades, no controlan la tasa de envejecimiento debido a una serie de hechos bien descritos: 1) las especies longevas tienen menor cantidad de enzimas antioxidantes que las especies de vida corta (Perez-Campo et al., 1998) ;2) el incremento de los antioxidantes mediante suplementación en la dieta o sobreexpresión génica no cambia la longevidad máxima (Barja, 2004a) ; 3) los ratones *Knockout* para enzimas antioxidantes no ven modificada su longevidad máxima (revisado en Sanz et al., 2006a). Además, de acuerdo con nuestros resultados, la mayor resistencia al estrés oxidativo en los ratones con la señalización β -adrenérgica

interrumpida, no se debería a una menor producción de radicales libres. Por ello, nos planteamos que el otro factor relacionado con el estrés oxidativo en especies longevas, el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, podría estar implicado en los ratones con la señalización β -adrenérgica bloqueada.

Por otro lado, aunque nuestro tratamiento no modificó la producción mitocondrial de radicales libres si produjo efectos sobre la cantidad de los complejos respiratorios, de tal forma que el **tratamiento con atenolol incrementó la cantidad de las dos subunidades estudiadas del complejo I y la subunidad utilizada como estimador del complejo IV**. Esto es interesante dado que la cantidad de los complejos respiratorios afecta la capacidad de producción de energía de la mitocondria. Así, el incremento en los niveles de los complejos I y IV tras el tratamiento con atenolol podría contribuir a incrementar la capacidad de producción de ATP por la mitocondria, lo que podría ser un factor positivo para la extensión de longevidad, de acuerdo con otros estudios de restricción de dieta que demostraron que bajo esta intervención también se produce la modulación de la maquinaria mitocondrial con un incremento de la biogénesis y respiración mitocondrial (Nisoli et al., 2005; Lin et al., 2002). Por otro lado, el aumento de la cantidad del complejo I no se debió a variaciones en la proteína AIF, que ha sido implicada en el ensamblaje y mantenimiento de este complejo respiratorio (Porter y Urbano, 2006), por lo que son necesarios más trabajos para elucidar si existe un efecto modulador de la biogénesis mitocondrial y si es el caso, qué proteínas implicadas en este proceso están involucradas en el tratamiento con atenolol. Además, la proteína AIF destaca por su papel como agente inductor de la apoptosis (Sevrioukova, 2011). El hecho de que en nuestro trabajo no se hayan encontrado variaciones en esta proteína también podría destacar que la reducción en la apoptosis que ha sido descrita en los ratones AC5KO podría ser debida a procesos independientes a esta proteína (Yan et al., 2007).

Además de la menor producción mitocondrial de ROS, como se detalló en la introducción, las especies longevas presentan un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de sus membranas celulares en comparación con las especies de vida corta (Pamplona y Barja, 2007). Esto significa que su baja tasa de envejecimiento podría ser debida a dos tipos diferentes de mecanismos relacionados con el estrés

oxidativo. De estos, se ha demostrado que las intervenciones nutricionales que incrementan la longevidad: RD, RP y RMet, parecen hacerlo a través de la regulación del primer factor, la producción mitocondrial de radicales libres. En nuestro trabajo con el tratamiento con atenolol, este factor no parece estar implicado, por lo que nos centramos en el segundo, la composición lipídica de membrana. De acuerdo con nuestros resultados, **el tratamiento con atenolol disminuyó de forma notable el número total de dobles enlaces (DBI) en un 30% así como el índice de peroxidizabilidad (PI) en un 40% en el corazón de ratones C57BL/6**. Respecto a estos parámetros, se ha demostrado que disminuyen a la vez que la longevidad se incrementa cuando diferentes especies de mamíferos son comparadas y esto ocurre en diferentes tejidos incluyendo el corazón (revisado en Pamplona et al., 2002c; Hulbert et al., 2007). Un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana es característico de aves (Pamplona et al., 1996; Buttemer et al., 2008) y de animales extraordinariamente longevos: la rata topo del desierto (*naked mole rat*) (Mitchell et al., 2007), el monotrema equidna (Hulbert et al., 2008) y la abeja reina (Haddad et al., 2007). Es interesante que en nuestro caso tan sólo 2 semanas de tratamiento con atenolol lograron disminuir el DBI en un 30%, una magnitud comparable a la disminución que se observa cuando se compara el DBI del corazón de caballo (cuya longevidad es de 46 años) con el DBI del corazón de ratón (longevidad de 3 años y medio).

La importancia de la composición lipídica de las membranas radica en que entre las macromoléculas celulares, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) exhiben la mayor sensibilidad al daño inducido por radicales libres y esta sensibilidad se incrementa exponencialmente en función del número de dobles enlaces por molécula de ácido graso (Bielski et al., 1983). La disminución en la insaturación de los ácidos grasos en el corazón de los animales tratados con atenolol fue debida a cambios en varios ácidos grasos, pero las variaciones observadas más importantes cuantitativamente fueron, la disminución de los ácidos grasos altamente insaturados, ácido docosahexaenoico 22:6n-3 (que muestra los cambios más fuertes) y ácido araquidónico 20:4n-6, así como el incremento de los ácidos grasos mucho menos insaturados: 16:0; 18:1n-9 y 16:1n-7. De forma similar, la Biología Comparada muestra

que desde las especies longevas a las que viven menos existe una redistribución sistemática entre distintos tipos de ácidos grasos desde los altamente insaturados, docosahexaenoico (22:6n-3) y araquidónico (20:4n-6) en las especies que viven menos, a los menos insaturados, como el ácido linoleico (18:2n-6) y linolénico (18:3n-3) en las especies longevas (Pamplona et al., 2002c). Cabe mencionar que tanto en el tratamiento con atenolol como en las especies longevas, **el principal ácido graso responsable de la disminución en el DBI y el PI fue el altamente insaturado 22:6n-3, que en nuestro estudio sufrió una disminución del 45%** en los animales tratados con el fármaco respecto a los animales control (Hulbert et al., 2007). La cuestión acerca de los mecanismos responsables de la modulación de la composición lipídica será abordada en el apartado 7.

De nuevo estos datos ofrecen diferencias con respecto a las intervenciones nutricionales de restricción de dieta y de metionina. Nuestro tratamiento con atenolol no modificó la producción mitocondrial de ROS, pero sí **disminuyó de forma muy acusada el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, un parámetro complicado de modular mediante tratamientos dietéticos**. Así, las intervenciones nutricionales que han sido capaces de modificar estos parámetros, como el incremento en la dieta de ácidos grasos saturados, provocó efectos no saludables como el incremento del colesterol en plasma (Maresca y Cossins, 1993) mientras que la deficiencia de PUFAs esenciales en la dieta produjo fuertes incrementos compensatorios del ácido graso 20:3n-9, el marcador diagnóstico de deficiencia de ácidos grasos esenciales (Hoch, 1992). Por ello, resulta muy interesante que un tratamiento tan corto con un fármaco sin efectos secundarios importantes logre cambiar estos parámetros de forma tan intensa y de forma similar a lo que ha sido descrito en especies longevas. Así, parece que el incremento de longevidad observado en los ratones con la vía β -adrenérgica interrumpida podría deberse en parte a un menor estrés oxidativo generado por esta composición lipídica más resistente a la modificación por el daño oxidativo, que a su vez, generaría menos daño a los componentes celulares.

La disminución en los índices de insaturación global, DBI y PI confiere a la membrana mayor resistencia a la peroxidación lipídica y menor daño lipoxidativo a macromoléculas celulares. De acuerdo con esto, **el tratamiento con atenolol no solo**

disminuyó el marcador de lipoxidación proteica, MDAL, sino que también redujo el nivel de los dos marcadores de oxidación proteica, GSA y AASA. Además, el marcador MDAL también ha sido estudiado en trabajos de Biología Comparada, obteniéndose una correlación negativa entre sus niveles y la longevidad de diferentes especies (Ruiz et al., 2005, Hulbert et al., 2007). Es importante tener en cuenta que los productos de peroxidación lipídica son especies reactivas muy poderosas y, por tanto, este proceso no puede ser percibido solo como un proceso de daño a lípidos, sino también como una fuente de daño a otras macromoléculas celulares incluidas las proteínas. Además, los procesos de peroxidación lipídica no solo generan productos como el MDAL o el 4-hidroxinonenal sino que también producen radicales libres secundarios (Hulbert et al., 2007). La disminución en la insaturación de los ácidos grasos de membrana en el grupo tratado con atenolol podría reducir la formación de estos radicales libres derivados de lípidos y así disminuir los niveles de proteínas oxidadas (GSA y AASA).

En contraste con los marcadores de oxidación y lipoxidación, la glicoxidación proteica, estimada como los niveles de CEL y CML, se vio incrementada en el corazón de los ratones tratados con atenolol. Sin embargo, esta diferencia observada entre ambos tipos de marcadores ha sido descrita previamente en otros trabajos. Así, estudios en los que por manipulación dietética se incrementó el grado de insaturación de ácidos grasos de membrana, tuvo como efecto el aumento del marcador MDAL mientras que los niveles de CEL y CML no se vieron afectados en el hígado de rata (Pamplona et al., 2004) y en el caso del corazón sólo se apreció un débil aumento de CML (Herrero et al., 2001). Por lo tanto, nuestros resultados concuerdan con lo descrito anteriormente y con la relación entre la insaturación de membrana, el marcador MDAL y los marcadores de glicoxidación CEL y CML. Cabe destacar que mientras que los niveles de MDAL correlacionan negativamente con la longevidad en el corazón de mamíferos, no se ha encontrado correlación entre la longevidad y los niveles de CML y CEL en el corazón (Ruiz et al., 2005). La razón por la que los marcadores de glicoxidación se vieron incrementados en este trabajo se desconoce, pero, aunque la formación de estos marcadores puede implicar reacciones químicas con fragmentos oxidados del esqueleto de carbohidratos como la glucosa, también pueden formarse a partir de intermediarios glicolíticos. Por ello, una posible

explicación del aumento de estos marcadores sería que el tratamiento con atenolol podría estar incrementando los intermediarios glicolíticos y estos a su vez, los marcadores CEL y CML.

Acercas de los mecanismos de señalización que pueden estar actuando en este tratamiento, se ha demostrado que el bloqueo β -adrenérgico induciría la estimulación de la vía de señalización Raf/MEK/ERK. De forma similar, en nuestro caso hemos encontrado que los animales tratados con **atenolol mostraron mayores niveles de la proteína de señalización p-ERK, lo que sugiere que la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana podría ser debida a cambios en la expresión génica inducidos por esta proteína.** La cascada de señalización Raf/MEK/ERK transmite señales desde los receptores de membrana hasta factores de transcripción que regulan la expresión génica de procesos implicados en apoptosis, supervivencia y resistencia frente al estrés oxidativo (Figura D1) (McCubrey et al., 2007). En relación a este último mecanismo y de acuerdo con la hipótesis propuesta por Yan y colaboradores, un estudio reciente llevado a cabo en células de músculo esquelético demostró que la protección frente al daño inducido por agentes exógenos se producía mediante esta vía de señalización y en concreto, mediante la estimulación de la proteína p-ERK (Yang et al., 2010). Por lo tanto parece que esta proteína podría estar induciendo resistencia al daño oxidativo mediante la enzima MnSOD, o mediante la disminución de la insaturación de los ácidos grasos de membrana, pero no estaría ejerciendo efecto sobre la producción de radicales libres, según lo que demuestran nuestros resultados.

Así, proponemos que al menos en el bloqueo β -adrenérgico inducido por el tratamiento con atenolol, la estimulación de la proteína p-ERK podría estar modulando la composición lipídica mediante la menor presencia de los ácidos grasos altamente insaturados y con el resultado de un menor grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana. Una proteína clave que podría estar regulando la composición lipídica de las membranas mediante la regulación de la expresión génica de las enzimas encargadas de la síntesis de los ácidos grasos, es el factor de transcripción SREBP-1c (*Sterol regulatory element binding protein 1-c*) (Nakamura y Nara, 2002). Debido a que este factor de transcripción ha sido descrito como posible sustrato de fosforilación

por la proteína p-ERK (Kotzka et al., 2012), el bloqueo β -adrenérgico inducido mediante el tratamiento con atenolol podría estar modulando la composición lipídica a través de cambios en la expresión génica inducidos por el factor de transcripción SREBP-1c, que se encontraría regulado por la proteína p-ERK (Figura D1).

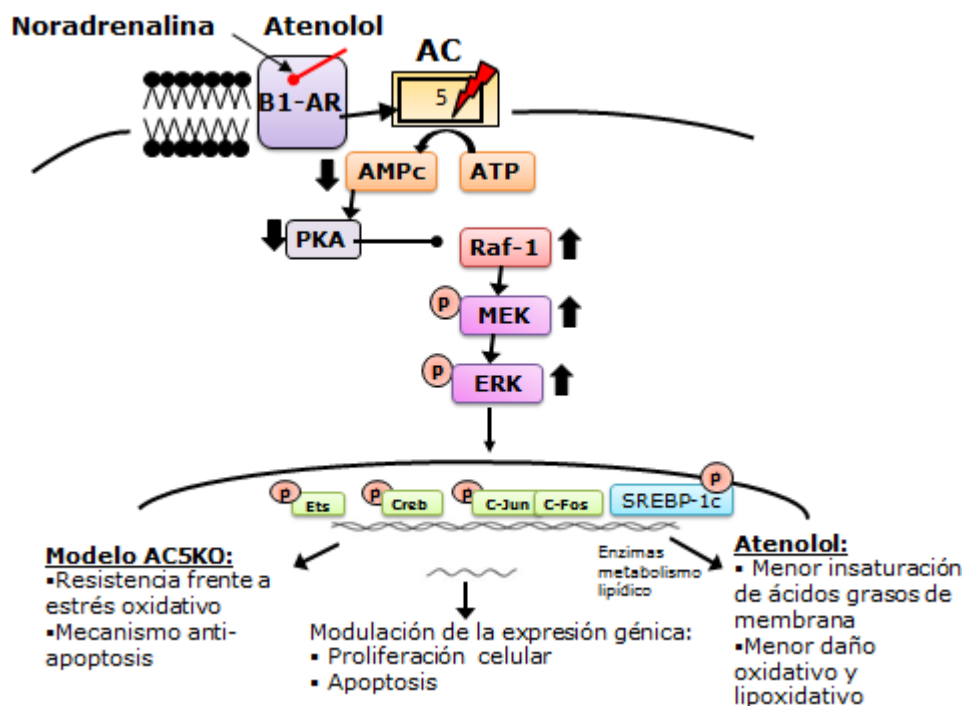


Figura D1. Mecanismos y efectos ejercidos por el bloqueo de la señalización β -adrenérgica en el modelo AC5KO y el tratamiento con atenolol. La ausencia de la AC tipo 5 así como el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos disminuye la PKA, que resulta en la pérdida de inhibición sobre la vía Raf/MEK/ERK. p-ERK puede entrar al núcleo, donde mediante la acción de distintos factores de transcripción puede regular la expresión génica de proteínas implicadas en distintos procesos de proliferación celular y apoptosis. En el caso del modelo AC5KO, el bloqueo β -adrenérgico produjo mayor resistencia frente al estrés oxidativo y menor apoptosis. En nuestro tratamiento con atenolol se produjo una fuerte disminución de la insaturación de los ácidos grasos de membrana y menor daño oxidativo y lipoxidativo a proteínas. En ambos casos se propone que estos efectos podrían estar mediados por los cambios en la expresión génica ejercidos por la estimulación de p-ERK. Concretamente, en nuestro estudio con atenolol proponemos que la proteína de señalización p-ERK podría estar regulando el factor de transcripción SREBP-1, que sería el encargado de modificar la expresión génica de distintas enzimas implicadas en la síntesis de los ácidos grasos de membrana.

En resumen, nuestros datos demuestran que el bloqueo de la señalización β -adrenérgica mediante el tratamiento con atenolol disminuyó el otro factor relacionado con el estrés oxidativo en especies longevas, el grado de insaturación de ácidos grasos de membrana, posiblemente a partir de la estimulación de la proteína p-ERK y disminuyendo así el daño oxidativo y lipoxidativo a proteínas. Este modelo ofrece un

mecanismo que podría contribuir a explicar la mayor longevidad observada en ratones AC5KO y que difiere de un mecanismo que “utilizan” las manipulaciones dietéticas: restricción de dieta, de proteínas y de metionina, basadas en disminuir la producción mitocondrial de radicales libres.

5. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CONJUNTO DE LA RESTRICCIÓN DE METIONINA EN LA DIETA Y EL BLOQUEO BETA-ADRENÉRGICO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL

Como ha sido detallado en la Introducción, las especies longevas muestran simultáneamente una baja generación mitocondrial de ROS y un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana cuando se comparan con las especies de vida corta (Pamplona y Barja, 2011). Como se expuso en los capítulos anteriores, estos efectos beneficiosos pueden ser experimentalmente obtenidos mediante la restricción de metionina, que reduce la producción mitocondrial de ROS o mediante el tratamiento farmacológico con atenolol, que disminuye el otro factor, la insaturación de los ácidos grasos de membrana (Figura D2). **En esta tesis hemos estudiado por primera vez el efecto conjunto de ambos tratamientos**, con el fin de disminuir simultáneamente los dos únicos factores que correlacionan con la longevidad máxima en distintas especies y estudiar si sus efectos sobre el estrés oxidativo pudiesen ser aditivos o incluso sinérgicos.

La restricción de metionina al 40% durante 7 semanas disminuyó la producción mitocondrial de ROS y la fuga de radicales libres en el complejo I del corazón de rata, lo que está de acuerdo con el resto de trabajos llevados a cabo con esta intervención en otros órganos (Sanz et al., 2006d; Caro et al., 2008; Caro et al., 2009a) (Tabla D1). Sin embargo, de forma opuesta al efecto de este protocolo dietético, el tratamiento con atenolol durante 7 semanas incrementó la producción mitocondrial de ROS en el complejo I, dado que este aumento fue observado con glutamato y succinato como sustratos (pero no con succinato + rotenona). Estos resultados difieren de lo que se demostró en el trabajo anterior con atenolol a corto plazo (Objetivo 3), en el que el tratamiento de 2 semanas con este fármaco no modificó la producción mitocondrial de

ROS, lo que podría deberse a que en este caso la duración del tratamiento fue mucho mayor, siete semanas. Inicialmente, podríamos pensar que este incremento contrarrestaría los posibles efectos beneficiosos del atenolol sobre otros parámetros relacionados con el estrés oxidativo (el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana) como ha sido descrito anteriormente con el tratamiento con atenolol a corto plazo (Objetivo 3). Sin embargo, **la mayor producción mitocondrial de ROS inducida por el atenolol desapareció con el tratamiento combinado del fármaco y de la restricción de metionina**, indicando que cuando se llevaron a cabo ambos tratamientos de forma conjunta, el efecto que ejerció la restricción de metionina sobre la producción mitocondrial de ROS compensó la tendencia del atenolol a incrementarlo. Por lo tanto, el tratamiento combinado de ambas intervenciones evita el efecto negativo sobre la producción mitocondrial de ROS inducido por el atenolol.

Con respecto al segundo factor que correlaciona con la longevidad máxima en diferentes especies, el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, la disminución observada en el DBI y el PI tanto con atenolol como con restricción de metionina fue similar. Pero cuando ambos tratamientos fueron implementados conjuntamente, **la magnitud del descenso en ambos parámetros fue el doble de lo observado con ambos tratamientos por separado**, por lo que existió un efecto aditivo de ambas intervenciones, que podría estar indicando que la restricción de metionina y el bloqueo de la señalización β -adrenérgica podrían ejercer efectos sobre la composición lipídica mediante vías diferentes o potenciando el efecto sobre la misma. La magnitud de los descensos del DBI y del PI observados con atenolol suministrado durante 7 semanas fue mucho menor que los descritos en el caso del tratamiento con el fármaco durante dos semanas. Parece ser que, al igual que sucedió con la producción mitocondrial de radicales libres, los efectos del fármaco son diferentes en función de la duración del tratamiento. En este caso, tras siete semanas de tratamiento el descenso observado en los índices de insaturación global fue mucho menor que lo observado tras un tratamiento agudo, lo que podría deberse a que quizá en el tratamiento más corto podríamos detectar los cambios que se producen como respuesta inmediata mientras que con un tratamiento más largo podría existir un mecanismo de regulación más complejo.

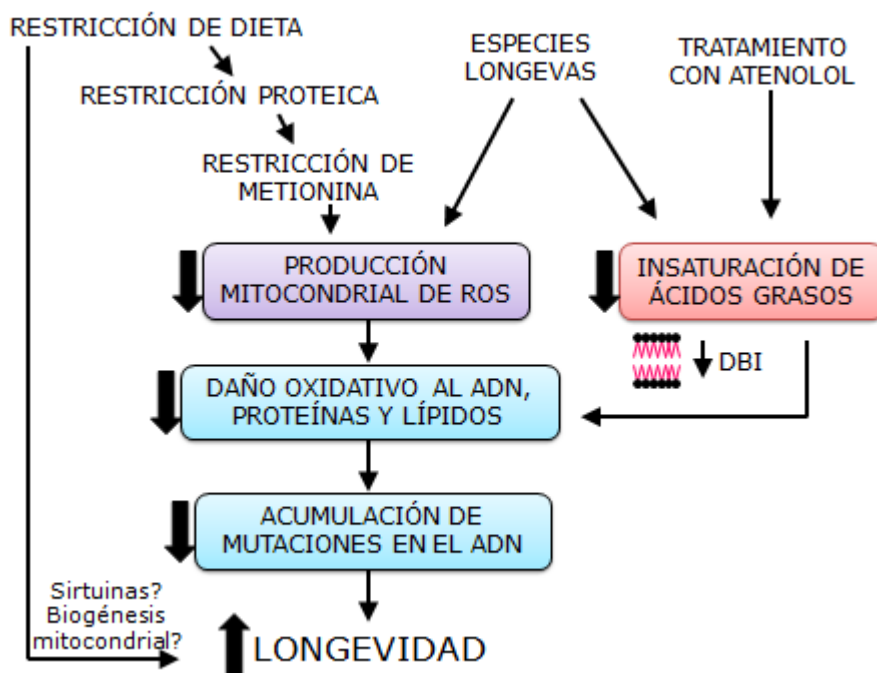


Figura D2. Estrés oxidativo mitocondrial y longevidad. La producción mitocondrial de ROS y la insaturación de los ácidos grasos de membrana son dos factores que correlacionan de forma inversa con la longevidad en las comparaciones entre especies con diferente longevidad. Parte del efecto de la restricción de dieta sobre la longevidad podría deberse a la restricción proteica y en concreto a la restricción de metionina, que actuarían a través de la disminución de la generación de radicales libres y el consiguiente menor daño oxidativo. La otra parte del efecto de la RD estaría mediada por otros mecanismos, como la señalización mediada por sirtuinas o la inducción de la biogénesis mitocondrial. Por otro lado, el bloqueo de la señalización beta-adrenérgica inducido por el tratamiento con el atenolol actuaría a través del otro factor, el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana.

Nuestros resultados también ofrecen diferencias respecto a trabajos anteriores con restricción de metionina (Tabla D2). Por un lado, los descensos en el DBI y el PI obtenidos en nuestro estudio con restricción de metionina al 40% en corazón de rata tuvieron una magnitud de descenso del 10%, de forma similar a lo descrito anteriormente en restricción proteica en hígado con un tratamiento similar a corto plazo (7 semanas) (Sanz et al., 2004). Sin embargo, los descensos obtenidos en nuestro trabajo son ligeramente superiores a los que han sido descritos en restricción de metionina al 80% en hígado y corazón, con una magnitud del 5% (Sanz et al, 2006d). Estas diferencias pueden ser debidas a que las dietas utilizadas en el estudio con restricción de metionina al 80% fueron ligeramente diferentes, conteniendo una

mayor concentración de ácido glutámico que las utilizadas en este caso. Por otro lado, también existen diferencias con respecto a la mayoría de trabajos llevados a cabo con restricción de metionina al 40% a corto plazo (7 semanas) en hígado (Caro et al., 2008), riñón y cerebro (Caro et al., 2009a) e incluso en corazón (objetivo 1) en los que no se detectaron cambios en el DBI y en el PI. En el caso de la restricción de metionina al 40% en hígado, la intervención indujo la disminución del ácido graso poliinsaturado 20:4n-6, pero no hubo diferencias en el resto de ácidos grasos (Caro et al., 2008). Respecto al corazón, según el trabajo llevado a cabo en el objetivo 1, la restricción de metionina al 40% solo indujo cambios mínimos en la presencia de tres ácidos grasos: disminuyó la cantidad del ácido graso altamente insaturado 22:5n-3 y la del ácido graso saturado 18:0 e incrementó la cantidad del ácido monoinsaturado 16:1n-7, sin modificar el DBI ni el PI. Estos resultados difieren a lo que se ha obtenido en este caso, en el que la restricción de metionina al 40% disminuyó el DBI y el PI con una magnitud del 10%. El tiempo del tratamiento en los dos casos fue el mismo y la única diferencia que puede explicar los resultados obtenidos es la composición de la dieta, que fue ligeramente diferente en ambos casos. La dieta utilizada en el objetivo 1 tenía una cantidad superior de ácido ascórbico en la mezcla vitamínica que la dieta utilizada en el objetivo 3, lo que podría afectar a la composición de los ácidos grasos de membrana. En cualquier caso, parece que la restricción de metionina puede ejercer efectos sobre la composición lipídica y son necesarios más estudios para aclarar si estos efectos dependen del órgano estudiado y del grado de restricción empleado en la dieta.

Respecto a los ácidos grasos responsables de los cambios observados en ambos tratamientos por separado, al igual que ocurre en las comparaciones entre especies longevas y de vida corta, el ácido araquidónico 20:4n-6 y el ácido docosahexaenoico 22:6n-3, redujeron su presencia en las membranas celulares. En el caso del tratamiento con atenolol, la magnitud de estos descensos fue del 15% en la cantidad del ácido 22:6n-3 y del 7% en la cantidad del ácido 20:4n-6. Respecto a la restricción de metionina al 40%, ambos ácidos grasos vieron disminuida su presencia con un descenso del 15%. Además, estas variaciones fueron más notables cuando los dos tratamientos experimentales se llevaron a cabo de forma conjunta, mostrando los animales tratados con restricción de metionina y atenolol una reducción del 34% en el

ácido araquidónico y del 50% en el ácido dosahexaenoico, similar a lo observado en el Objetivo 3. Por lo tanto parece que los efectos que tanto la restricción de metionina como el tratamiento con atenolol indujeron sobre los ácidos grasos mencionados hicieron disminuir el grado de insaturación de membrana de forma más acusada cuando ambas intervenciones se implementaron conjuntamente. Los mecanismos responsables de estos efectos serán discutidos en el apartado 7.

De forma similar a lo observado en los estudios de restricción de dieta, en otros trabajos de restricción de metionina (Lopez-Torres y Barja, 2008) y en los resultados del objetivo 3, con tratamiento con atenolol a corto plazo, los marcadores de oxidación proteica (GSA y AASA) disminuyeron sus niveles en corazón tanto en el grupo de animales restringidos en metionina al 40% como en los animales tratados con atenolol. Además, el descenso de estos dos marcadores se acentuó cuando ambas intervenciones se llevaron a cabo de forma conjunta. Respecto al marcador de lipoxidación, MDAL, su cantidad disminuyó de forma similar tanto en los animales restringidos con metionina, como en los tratados con atenolol y los sometidos a ambas intervenciones de forma simultánea, por lo que en este caso no detectamos un efecto aditivo de ambas manipulaciones. Por último, los marcadores de glicoxidación redujeron sus niveles en la intervención con restricción de metionina, lo que encaja con lo observado previamente en restricción de metionina al 40% en corazón (objetivo 1) y en otros órganos (Tabla D1). Sin embargo, los animales tratados con atenolol no modificaron los niveles del marcador CEL pero disminuyeron los del marcador CML. Previamente, según los resultados del objetivo 3, hemos discutido como el tratamiento con atenolol a corto plazo (2 semanas) incrementó los niveles de estos dos marcadores, lo que propusimos que podría deberse a un incremento de los intermediarios glicolíticos inducidos por el tratamiento. Estas diferencias, junto a las descritas anteriormente respecto a otros parámetros indican que el bloqueo β -adrenérgico mantenido durante más tiempo ejerce cambios diferentes a los efectos observados en un tratamiento más corto. Respecto al marcador CEL, el tratamiento de mayor duración podría estar atenuando los efectos, mientras que el marcador CML, que también puede ser considerado como marcador lipoxidativo podría estar respondiendo en función a los cambios en la peroxidación lipídica. En el caso del

tratamiento conjunto de RMet y atenolol, el marcador CEL incrementó sus niveles respecto a los animales restringidos en metionina pero no respecto a los animales control, mientras que el marcador CML disminuyó de forma similar a lo observado en los animales restringidos en metionina.

Los descensos en los marcadores de modificación proteica observados en el caso de la restricción de metionina podrían deberse, como se comentó en el apartado 2 de la discusión, a la menor producción de radicales libres así como a un posible incremento del catabolismo de las proteínas modificadas (Dhahbi et al., 2001). Sin embargo, en el caso del tratamiento con atenolol, **los descensos observados no son el resultado de una menor producción de radicales libres, por lo que debieron producirse por la disminución de la insaturación de los ácidos grasos de membrana**, que reduciría la susceptibilidad a la peroxidación lipídica y así la generación de radicales secundarios y productos de peroxidación lipídica que pueden modificar otras macromoléculas como por ejemplo las proteínas.

A pesar de los resultados obtenidos en la producción de radicales libres, **el tratamiento con atenolol disminuyó el daño oxidativo al ADN** mitocondrial, lo que, al igual que sucede con los marcadores de oxidación proteica, puede ser consecuencia del menor grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana reflejado en el menor DBI y PI tras el tratamiento. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que han demostrado como la disminución de la insaturación de los ácidos grasos de membrana conseguida mediante protocolos dietéticos disminuye también los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial (Pamplona et al., 2004). Esto encaja con el hecho de que el ADN mitocondrial al estar físicamente asociado con la membrana mitocondrial interna (Albring et al., 1977; Holt et al., 2007) puede ser muy susceptible a los procesos de peroxidación lipídica, acusando de manera notable los cambios que se producen en la composición de las membranas, como es el caso. De nuevo, en este aspecto, existe diferencia con respecto al tratamiento con atenolol a corto plazo, dado que en ese estudio no se observaron cambios en el daño oxidativo al ADN mitocondrial. Por lo tanto podría ser necesario un mayor tiempo de tratamiento para detectar estas diferencias. Por otro lado y de acuerdo con estudios previos, la restricción de metionina disminuyó el daño oxidativo al ADN mitocondrial, lo que

podría ser debido en este caso a la menor producción de radicales libres, como ha sido demostrado tanto en RD como en RMet al 80% (Lopez-Torres y Barja, 2008). El empleo de los dos tratamientos de forma conjunta también disminuyó el marcador 8-oxodG, con un descenso similar al obtenido en ambos tratamientos por separado.

Aunque existen estudios recientes que avalan el papel de la proteína SIRT3 como mediadora de los efectos beneficiosos de la restricción de dieta (Bell y Guarente, 2011; Someya et al., 2010), en nuestro trabajo la cantidad de esta proteína se vio disminuida como consecuencia de los dos tratamientos implementados por separado y también cuando se aplicaron de forma conjunta. Respecto a los trabajos con restricción de metionina, estudios de la presente tesis han mostrado que no existe activación de otras sirtuinas, como la SIRT1 (Objetivo 2) y la SIRT5 (Objetivo 1), de forma similar a lo demostrado en este caso, en el que los niveles de la SIRT3 se encontraron reducidos. Por ello parece que ninguna de las sirtuinas mencionadas estarían implicadas en la disminución de la producción mitocondrial de ROS y el estrés oxidativo observado bajo esta intervención nutricional. Esto no supone que la RD no pueda estar actuando a través de estas proteínas, dado que el efecto que la Restricción de metionina ejerce sobre la longevidad, basado en la disminución del estrés oxidativo, es solo una parte del efecto de la RD, que además de actuar a través de esa vía, podría hacerlo también a través de otras aún desconocidas pero que podrían implicar cambios en estas proteínas. Por otro lado, un estudio reciente llevado a cabo por Lai y colaboradores ha demostrado que la sobreexpresión de la enzima AC5 induce disfunción cardíaca en ratones, mediante un mecanismo que inhibiría la proteína SIRT1 y como resultado el factor de transcripción FoxO3a, que disminuiría la transcripción de la enzima antioxidante MnSOD (Lai et al., 2013). Por lo tanto, el bloqueo de la señalización β -adrenérgica podría estar actuando a través de la estimulación tanto de la proteína p-ERK como de la proteína SIRT1. En nuestro trabajo con atenolol, la proteína SIRT3, con funciones diferentes a las que ejerce la SIRT1, se encontró reducida pero no se determinó la cantidad de la proteína SIRT1, lo que podría ser interesante para investigaciones futuras.

Acerca de la señalización mediada por los tratamientos implementados y de acuerdo a los resultados del capítulo II, en nuestro trabajo se demostró que el bloqueo

β -adrenérgico durante siete semanas con atenolol incrementó la cantidad de p-ERK. De forma similar la restricción de metionina también indujo el aumento de los niveles de esta proteína. Estos resultados están de acuerdo con un trabajo llevado a cabo por Tsai y colaboradores en 2010 en el que el cultivo de hepatocitos sujetos a restricción de metionina *in vitro* indujo un aumento de la proteína de señalización p-ERK (Tsai et al., 2010) y con un trabajo llevado a cabo en cerebro, donde se demostró que la restricción de dieta era capaz de revertir el descenso inducido por la edad en la cantidad de p-ERK (Zhen et al., 1999). El trabajo llevado a cabo por Sun y colaboradores en 2009 analizó la cantidad de esta proteína y otras relacionadas con esta vía de señalización tanto en ratones restringidos dietéticamente como en ratones restringidos en metionina. Los resultados obtenidos indican que la restricción de dieta y la restricción de metionina podrían estar regulados por diferentes vías de señalización, dado que mientras que la restricción de dieta incrementó la cantidad de la proteína p-ERK en el hígado, la restricción de metionina no indujo cambios en los niveles de esta proteína, tan solo se produjo un aumento en los niveles de la proteína p-JNK2 (Sun et al., 2009). Esta diferencia con respecto a nuestros resultados obtenidos con restricción de metionina en corazón podría deberse a que en el trabajo llevado a cabo por Sun y colaboradores la intervención nutricional se inició a edades avanzadas y en ratones, no como en nuestro caso, en el que los animales eran ratas jóvenes. **El tratamiento combinado de restricción de metionina y bloqueo β -adrenérgico con atenolol indujo un incremento de la proteína p-ERK muy acentuado** (con una magnitud de aumento del 156%), reflejando no solo la simple suma de los efectos de ambos tratamientos, sino su efecto sinérgico. La proteína p-ERK está implicada en numerosos procesos relacionados con la proliferación celular y la apoptosis (Figura D1), aunque en este caso podría estar modulando el estrés oxidativo, por ejemplo, el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, que es una característica compartida por ambos tratamientos.

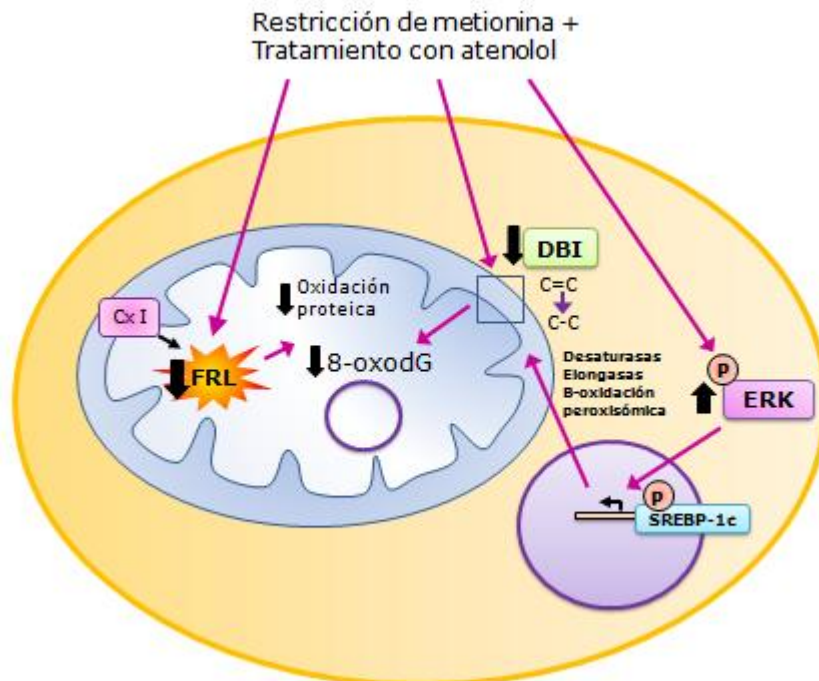


Figura D3. Efectos ejercidos por el tratamiento conjunto de la restricción de metionina y el tratamiento con atenolol. Ambos tratamientos aplicados simultáneamente disminuyen la fuga de radicales libres (FRL) en el complejo I, el daño oxidativo a proteínas, la insaturación de los ácidos grasos de membrana e incrementan la fosforilación de la proteína ERK, que puede estar modulando la expresión génica de procesos relacionados con la síntesis o remodelación de los ácidos grasos de membrana. Como consecuencia, se induce la disminución del daño oxidativo al ADN mitocondrial.

6. MODULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE ROS. PAPEL DE UNA SOLA MOLÉCULA: LA METIONINA

Nuestros datos avalan la idea de que el componente de la dieta responsable de la disminución del estrés oxidativo y de parte del efecto sobre la longevidad de la restricción de dieta es la metionina. La restricción de metionina al 40% disminuye la producción mitocondrial de ROS en los principales órganos vitales tras un tratamiento a corto plazo e incluso cuando esta intervención se inicia en animales viejos (Tabla D1). Además, en todos los casos, la modificación en la producción de ROS estuvo acompañada de un descenso en el daño oxidativo al ADN mitocondrial y a proteínas. Aunque, hace unos años, se pensó que existía una vía de señalización hormonal que regulaba la longevidad a través de la modulación del estrés oxidativo, los trabajos

llevados a cabo en nuestro laboratorio junto con otros estudios permitieron determinar que ni la vía insulina/IGF-1 (Sanz et al., 2005b) ni las hormonas tiroideas (Caro et al., 2007; Lopez-Torres et al., 2000; Venditti et al., 2003) eran responsables de la modulación de la producción mitocondrial de ROS. Por lo tanto, la modulación de la producción de ROS durante la restricción de dieta se produciría a nivel celular, actuando cada célula en función de la cantidad de metionina que recibe. La metionina es un aminoácido esencial, responsable de la iniciación de la síntesis proteica y que se encuentra en baja concentración en las proteínas. Por ello, tiene sentido que su falta (que podría comprometer numerosas funciones celulares) pueda iniciar un programa destinado a comprometer el éxito reproductivo e incrementar la longevidad. Los seres vivos habrían adaptado este indicador a la falta de este aminoácido esencial, no a la falta de aporte calórico, porque un aporte calórico alto sería inútil si no se estuviese incluyendo los aminoácidos esenciales que garantizarían la homeostasis celular.

La reducción de la producción mitocondrial de radicales libres tanto en los experimentos procedentes de la Biología Comparada como de la Biología Experimental se produce exclusivamente a nivel del complejo I. Además, el papel de este complejo como regulador del envejecimiento se ha visto reforzado también por otro tipo de estudios en los que se manipulaba su expresión. Por un lado, la ausencia de su expresión en modelos de invertebrados ha demostrado incrementar la longevidad (Dillin et al., 2002) y además, en moscas, también se ha demostrado que la sustitución del complejo I por una enzima alternativa (ND1, NADH deshidrogenasa interna 1) presente en plantas y hongos pero ausente en la mayoría de animales, reduce la producción de ROS e incrementa la longevidad (Sanz et al., 2010), resultados que refuerzan el papel de este complejo como regulador de procesos de envejecimiento.

De acuerdo con nuestros resultados y los obtenidos en trabajos previos de nuestro laboratorio, parece que la ingesta de metionina es la responsable de la modulación de la producción mitocondrial de ROS en el complejo I. Ahora cabe preguntarse qué mecanismos son los responsables de esta regulación. Antes de centrarnos en ellos, es necesario mencionar que en ninguno de los trabajos de la presente tesis, el descenso en la producción mitocondrial de ROS se debió a variaciones en el consumo de oxígeno ni a cambios en la enzima antioxidante MnSOD ni en las sirtuinas analizadas. De forma

similar, un trabajo reciente con restricción de metionina al 80% ha descrito la ausencia de cambios en la actividad total de la enzima antioxidante SOD y de forma particular, en la actividad de la MnSOD (Maddineni et al., 2013). Por lo tanto, el efecto observado tiene que deberse a otros mecanismos que detallaremos a continuación y que se manifiestan con cambios cuantitativos o cualitativos en el complejo I:

★ Cambios cuantitativos:

Un mecanismo simple está basado en la disminución de la cantidad del complejo I en las mitocondrias, que directamente conduciría a una menor producción de radicales libres. Esto ha sido descrito en la restricción de dieta (Nicoletti et al., 2005) y de proteínas (Sanz et al., 2004), así como en las aves y mamíferos longevos en comparación con especies de vida corta (St-Pierre et al, 2002; Pamplona et al., 2005). En los trabajos descritos en esta tesis con respecto a la restricción de metionina en corazón, no hubo cambios en la cantidad del complejo I en el capítulo 1 pero, sin embargo, si se describió menor cantidad de las dos subunidades del complejo I con un tratamiento similar en el trabajo descrito en el capítulo 3. Además en ese caso también se produjo el aumento de las cantidades de los complejo II y III, que también ha sido descrito previamente en otros trabajos con restricción de metionina (Sanz et al., 2006d). Estas diferencias pudieron deberse a que la composición de las dietas fue ligeramente diferente, conteniendo en el primer caso mayor cantidad de ácido ascórbico (vitamina C) en la mezcla vitamínica.

La disminución de la cantidad de las subunidades del complejo I estaría de acuerdo con lo descrito en otros trabajos para cerebro e hígado bajo restricción de metionina al 40% (Caro et al., 2008; 2009a) y para corazón e hígado tras la restricción de metionina al 80% (Sanz et al., 2006d) . Sin embargo, parece que estos cambios son regulados dependiendo del tejido o de la edad, porque en riñón no se mostró ninguna variación tras la restricción de metionina al 40% y según nuestros resultados del capítulo I.2., cuando este protocolo dietético se inició a edades avanzadas tampoco hubo cambios respecto a la cantidad del complejo I, tan sólo se indujo un incremento en el complejo IV, que podría contribuir a facilitar el flujo electrónico y así disminuir la producción de radicales libres. Sin embargo, este complejo suele encontrarse en

exceso en la mitocondria y no ser limitante para el flujo electrónico. Además, este incremento solo fue significativo con respecto a los animales jóvenes control pero no a los viejos control, lo que sumado a la ausencia de cambios en el consumo de oxígeno descartan esta posibilidad como responsable de la disminución en la producción mitocondrial de radicales libres.

Acerca de la causa de la disminución de la cantidad del complejo I, la flavoproteína AIF puede estar implicada en estos cambios. Esta proteína, denominada factor inductor de apoptosis (AIF), se encuentra en el espacio intermembrana y está implicada en procesos diversos que incluyen la regulación de la apoptosis y el mantenimiento de la función de la cadena respiratoria, concretamente la regulación del ensamblaje y estabilización del complejo I (Sevrioukova, 2011; Polster, 2013). Nuestros resultados muestran la concordancia entre los cambios en la cantidad de esta proteína y del complejo I, que se demostraron también bajo restricción de metionina en hígado y cerebro (Caro et al., 2008, 2009a). Por lo tanto, parece que la reducción de la cantidad del complejo I es una tendencia generalizada bajo la restricción de metionina y que responde a la disminución de la proteína AIF. Sin embargo, no se extiende a todos los órganos ni cuando el tratamiento se inicia a edades avanzadas, por lo que podría estar sujeta a cambios específicos de tejido y no a una regulación más general. Por estas razones, estos cambios no pueden explicar por si solos la menor producción mitocondrial de radicales libres, estando otro tipo de cambios, como los cualitativos, implicados en esta modulación.

★ Cambios cualitativos

La restricción de metionina también induce cambios cualitativos en el complejo I que logran conseguir una menor fuga de radicales libres por parte de este complejo respiratorio. Es decir, el complejo I de los animales restringidos en metionina es más eficiente evitando el “escape” de electrones y la consiguiente formación de radicales libres por flujo electrónico en la cadena respiratoria de forma similar a lo que ha sido descrito en las especies longevas con respecto a las especies de vida corta (Barja, 2004a,b). La menor fuga porcentual de radicales libres en el complejo I ha sido demostrado en la presente tesis con la restricción de metionina al 40% en corazón y en

hígado cuando el tratamiento se inició a edades avanzadas e incluso con el tratamiento combinado de restricción de metionina al 40% y atenolol durante 7 semanas. Además estos resultados están de acuerdo con trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio que demostraron que la restricción de metionina al 80% en hígado y corazón (Sanz et al., 2006d) y al 40% en cerebro, riñón e hígado en animales jóvenes y durante 7 semanas también disminuye la fuga de radicales libres en el complejo I (Caro et al., 2008; 2009a) (Tabla D1). Este menor “escape” de electrones por parte del complejo I puede ser debido a la disminución del grado de reducción electrónica, es decir, al aumento del potencial redox del sitio donador de electrones al oxígeno del complejo I. Esto ha sido demostrado en la presente tesis en el tratamiento de restricción de metionina al 40% en corazón y en hígado a edades avanzadas, ya que la disminución de la producción de radicales libres se observa, como en el caso de la RD, la RMet al 80% en hígado y corazón y la RMet al 40% en hígado, cerebro y riñón, con la reducción parcial del complejo I, es decir con el sustrato del complejo I, glutamato o piruvato sin la presencia del inhibidor, rotenona, que generaría una reducción completa.

Además, otro tipo de modificaciones pueden explicar la menor producción de radicales libres por el complejo I de forma cualitativa, como por ejemplo las modificaciones post-traduccionales de nitración, fosforilación o glutationización. Como se explicó en la introducción, mantener un complejo I poco glutationizado podría contribuir a disminuir la producción de ROS (Taylor et al., 2003). Aunque en nuestro trabajo no pudimos determinar si estos procesos se estaban produciendo, si que se puede deducir de otros estudios que si la restricción de metionina incrementa la concentración de glutatión reducido en sangre (Richie et al., 1994), disminuirá la de glutatión oxidado pudiendo reducir la glutationización del complejo I.

Para concluir este apartado, vamos a proponer un modelo que explique la reducción en la producción de ROS en el complejo I durante la restricción de metionina (Figura D4): Todo comienza con la disminución de los niveles citosólicos de metionina y otros aminoácidos sulfurados como consecuencia de la restricción de este aminoácido en la dieta, lo que ha sido demostrado en varios trabajos y refrendado en un interesante estudio llevado a cabo por la Dra. Perrone en al año 2012 en el que se

analizó la respuesta genómica y metabólica a esta intervención nutricional (Perrone et al., 2012b).

La alteración de los niveles de este aminoácido u otros relacionados puede:

- a) interaccionar químicamente con las subunidades del complejo I.
- b) modificar proteínas de señalización y por consiguiente la expresión génica.
- c) disminuir el sustrato NADH que cede electrones al complejo I.

Respecto al **mecanismo a)** la molécula de metionina, alguno de sus metabolitos o algún aminoácido sulfurado que también varía sus niveles tras esta intervención nutricional, podrían **interaccionar químicamente con el complejo I** de forma que podría llegar a modificar algunos polipéptidos críticos para el funcionamiento de este complejo respiratorio. Así, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que la adición directa de metionina a mitocondrias aisladas y funcionales incrementó su producción de radicales libres en hígado y riñón pero no en corazón y cerebro (Gomez et al., 2011). Por lo tanto, sí podría existir un efecto rápido y directo de la molécula de metionina sobre el complejo I en ciertos órganos. También ha sido propuesto que en vez de la metionina, fuese alguno de sus metabolitos el responsable de esta modulación. En el trabajo comentado anteriormente, la homocisteína añadida directamente a mitocondrias aisladas y funcionales incrementó la producción mitocondrial de radicales libres en riñón pero la disminuyó en hígado, cerebro y corazón. Curiosamente, la restricción de metionina incrementó los niveles de esta molécula en hígado (Elshorbagy et al., 2010), por lo que quizá también podría existir un efecto de esta molécula a la hora de disminuir la producción de radicales libres. El resto de metabolitos estudiados, SAM y SAH no tuvieron efecto directo sobre la producción mitocondrial de radicales libres (Gomez et al., 2011).

Por otro lado, también se ha descrito que los efectos beneficiosos de la restricción de metionina sobre la reducción del tejido adiposo estarían mediados por el menor nivel de cisteína que se produce en la restricción de metionina en hígado (Elshorbagy et al., 2011). Por ello, y aunque no ha sido estudiado todavía, la molécula de cisteína también parece buena candidata para ejercer efectos sobre la producción mitocondrial de ROS. Por lo tanto, parece que la metionina, la homocisteína o la cisteína podrían interaccionar con algunas subunidades del complejo I modulando la producción

mitocondrial de ROS. En principio y desde el punto de vista químico, podríamos pensar que la molécula de metionina, a diferencia de lo que sucede con la homocisteína o la cisteína, tendría más difícil el reaccionar con otros compuestos debido a que el grupo azufre se localiza en el interior de la molécula y no está disponible para una reacción directa. Pero se ha demostrado recientemente que la reacción de la metionina con radicales hidroxilo generaría radicales de metionina que podrían dar lugar finalmente al producto metanetiol (Spasojevic et al., 2012) que podría reaccionar con el complejo I de forma similar a como lo podría hacer la cisteína. En conclusión, la restricción de metionina disminuye los niveles de metionina y cisteína e incrementa los de homocisteína y estas variaciones podrían influir en el funcionamiento del complejo I mediante reacciones químicas.

El **mecanismo b)** propone que la restricción de metionina podría estar alterando los niveles de **moléculas implicadas en procesos de señalización** y esto ejercería **cambios a nivel de expresión génica**, que podrían disminuir la cantidad del complejo I o modificar el grado de reducción electrónica de este complejo. Por un lado, una de las moléculas candidatas sería el metabolito de la metionina, S-Adenosilmetionina (SAM), que podría ver alterados sus niveles tras la restricción de metionina, lo que estaría de acuerdo con el incremento en sus niveles que se ha demostrado tras la manipulación contraria, la suplementación de metionina en la dieta (Gomez et al., 2009). Dado que esta molécula es un donador de grupos metilo, la metilación del ADN podría verse modificada a partir de las variaciones en los niveles de SAM. Como el envejecimiento parece estar asociado a cambios de metilación del ADN en sitios específicos (Christensen et al., 2009; Maegawa et al., 2010; Cedar y Bergman, 2012), las dietas restringidas en metionina podrían extender la longevidad en roedores a través de cambios en la modulación de los patrones de metilación del ADN. De acuerdo con esto y como se ha descrito en la presente tesis, nosotros detectamos que esta intervención nutricional indujo una pequeña pero significativa reducción en el porcentaje de metilación global del ADN en corazón de rata Wistar, mientras que esto no se reprodujo cuando la intervención se inició a edades avanzadas.

A la vez, otros tipos de moléculas podrían ser modificadas por el tratamiento y éstas podrían modular la expresión génica que resultaría en un menor estrés oxidativo.

Este podría ser el caso de la proteína p-ERK, que aumentó su cantidad tras el tratamiento con la restricción de metionina como ha sido demostrado en nuestros resultados del capítulo III. Sin embargo, el hecho de que el tratamiento con atenolol también incrementase los niveles de esta proteína y esta intervención no disminuyese la producción mitocondrial de radicales libres plantea la posibilidad de que p-ERK no esté relacionada con este proceso, por lo que podría estar regulando la expresión génica de proteínas implicadas en otros procesos también relacionados con el estrés oxidativo como ha sido discutido en el apartado anterior. En cualquier caso, este mecanismo podría producir respuestas génicas destinadas a disminuir la cantidad del complejo I por masa mitocondrial, lo que tendería a disminuir la producción de radicales libres o a disminuir el grado de reducción electrónica del complejo I.

El último **mecanismo c)** que podría estar implicado en una menor producción de radicales libres sería la **reducción en la matriz mitocondrial del sustrato NADH** que cede electrones al complejo I. Aunque es más probable que este mecanismo esté actuando en el caso de la restricción de dieta que en la restricción de metionina, como ha sido descrito en un estudio que demostró como sustratos como el piruvato, malato y el succinato, así como el NADH y el ratio NADH/NAD⁺ se vieron disminuidos en animales restringidos dietéticamente (Burch et al., 1970), también ha sido descrita una disminución del piruvato y del lactato en el hígado de animales sometidos a restricción de metionina (Perrone et al., 2012b), por lo que este mecanismo podría también ser tenido en cuenta.

En conclusión, estos mecanismos podrían contribuir a generar mitocondrias más eficaces con menor producción de radicales libres lo que contribuiría a incrementar la longevidad en la restricción de metionina y, junto con otros muchos cambios, en la restricción de dieta.

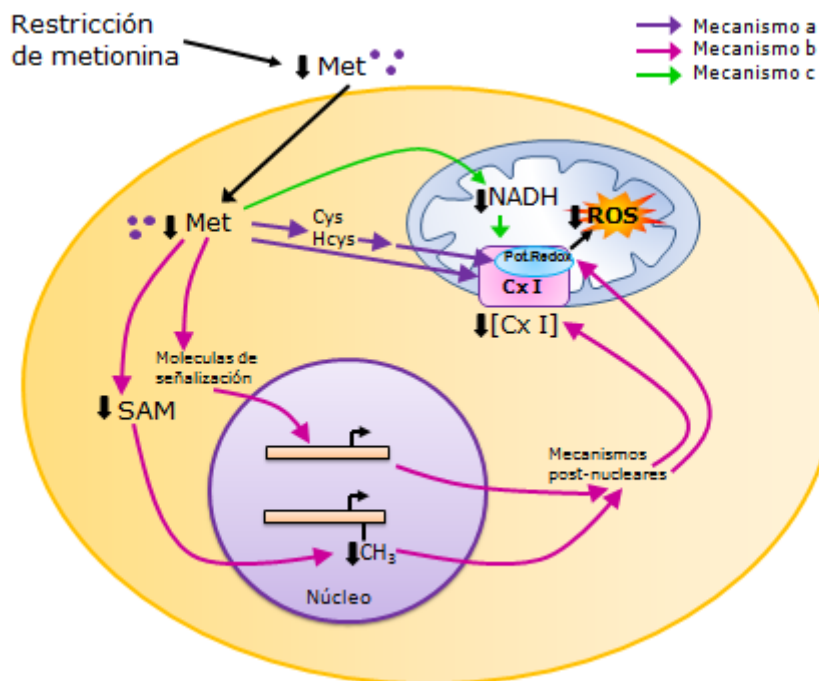


Figura D4. Posibles mecanismos implicados en la disminución de la producción mitocondrial de ROS durante la restricción de metionina.

La menor concentración de metionina en el citosol puede conducir a tres tipos de mecanismos: a) interacción química con el complejo I, que podría reducir directamente la producción de radicales libres; b) modulación de moléculas de señalización que podrían inducir cambios en la expresión génica destinados a disminuir la cantidad del complejo I o su grado de reducción electrónica; c) disminución del sustrato NADH, que cede electrones al complejo I.

PAPEL DEL ATENOLOL

A pesar de que en principio nuestra hipótesis planteaba que el bloqueo de la señalización β -adrenérgica podría disminuir la producción mitocondrial de ROS, nuestros datos experimentales no apoyan esta idea. En el primer trabajo llevado a cabo con atenolol en ratón, con un periodo corto de tratamiento, no se observaron efectos sobre este parámetro y la cantidad de las subunidades del complejo I se vieron incrementadas. En el trabajo con atenolol a más largo plazo, 7 semanas en corazón de rata, se observó en cambio un incremento de la producción mitocondrial de ROS en el complejo I y una de las dos subunidades que conforman este complejo se vio disminuida. Estos efectos no fueron consecuencia de variaciones en el consumo de oxígeno y pudieron deberse a cambios cualitativos, como el incremento del grado de reducción electrónica o la modificación post-traduccional del complejo I. La diferencia

entre ambos tratamientos podría deberse a que en el primer caso se trataría de una primera fase de respuesta diferente a la que se establece al cabo de un mayor tiempo de tratamiento, que podría implicar procesos de regulación más complejos. Además, la disminución de una de las dos subunidades podría reflejar una respuesta adaptativa con el fin de moderar la producción de radicales libres en el caso del tratamiento con atenolol a más largo plazo.

Sin embargo, el incremento de la producción de radicales libres se neutralizó en el grupo con el tratamiento conjunto RMet y atenolol, que además presentó menor fuga de radicales libres que incluso el grupo control, situándose al mismo nivel que los animales restringidos. Por ello, cuando el tratamiento se combinó, el efecto de la restricción de metionina sobre la producción de radicales libres debió ser mayor que el efecto ejercido por el fármaco y por tanto capaz de contrarrestarlo. Por lo tanto parece que el efecto del bloqueo de la señalización beta-adrenérgica sobre la longevidad no se debe, como en las manipulaciones dietéticas, a una menor producción mitocondrial de radicales libres y debe estar modulado por otros factores, como el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, el otro factor que relaciona el estrés oxidativo y la longevidad en especies longevas frente a especies de vida corta.

7. MODULACIÓN DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA

Según nuestros resultados, existe una clara modulación de la composición lipídica por el bloqueo beta-adrenérgico mediante el tratamiento con atenolol. Sin embargo, las intervenciones nutricionales no tienen un efecto tan claro (Tabla D2). La restricción de dieta no modificó el índice de dobles enlaces en el corazón de rata con un tratamiento a corto plazo (Pamplona 2002a,b), pero sí lo hizo cuando la intervención fue de mayor duración, de un año (Lambert et al., 2004). Sin embargo la restricción proteica (Ayala et al., 2007) y de metionina al 80% (Sanz et al., 2006d) a corto plazo en hígado y corazón sí disminuyeron este parámetro. Un trabajo reciente llevado a cabo en el laboratorio del Dr. Pamplona describió que, además de disminuir la insaturación de los ácidos grasos de membrana, la restricción de metionina al 80% en ratones indujo cambios en el perfil lipídico de forma similar en cerebro y médula espinal, lo que sugiere un efecto específico de la restricción de metionina sobre el perfil lipídico

del sistema nervioso, y de forma diferente sobre el tejido hepático. Los cambios descritos en estos tres tejidos tras la RMet se basaron en modificaciones de fosfolípidos específicos, esfingolípidos y la ubiquinona 9, cambios que describen respuestas adaptativas de la composición de la membrana lipídica con el fin de incrementar la resistencia al estrés oxidativo (Jove et al., 2013). En cuanto a la restricción de metionina al 40% y como ha sido comentado anteriormente, no se ha descrito efecto sobre el índice de dobles enlaces o el índice de peroxidizabilidad en hígado, riñón y cerebro (Caro et al., 2008; 2009a). En corazón existen resultados contradictorios, aunque según los resultados del objetivo 4 es claro el descenso del DBI y del PI tanto con la restricción de metionina como con el tratamiento combinado de RMet y atenolol. Por lo tanto, parece que la restricción de metionina ejerce efectos sobre la modulación de la composición lipídica y estos podrían depender del grado de restricción del aminoácido en la dieta y en el caso de la restricción al 40% del tejido estudiado. Con respecto al efecto del atenolol los cambios en la composición de lípidos de membrana se produjeron tanto con un tratamiento agudo (2 semanas) (Objetivo 3) como más largo (7 semanas), aunque el mayor efecto fue observado en el primer caso.

La pregunta que surge a continuación es cómo se produce esta modulación y qué consecuencias tiene en relación al estrés oxidativo. Los mecanismos responsables de la composición de los ácidos grasos de membrana pueden ser varios e incluir: la vía de desaturación de los ácidos grasos, el ciclo de deacilación-reacilación y el papel de las vías catabólicas de PUFAs específicos.

Respecto a la vía de desaturación, las enzimas desaturasas introducen un doble enlace en una posición específica del ácido graso. Aunque los mamíferos expresan tres tipos de actividad desaturasa, delta-9, delta-6 y delta-5 (Guillou et al., 2010), los datos disponibles indican que las actividades desaturasa delta-5 y delta-6 son menores en las especies longevas que en las de vida corta (Pamplona et al., 2002c). Esto explicaría la disminución de la presencia de los ácidos grasos altamente insaturados, docosahexaenoico, 22:6n-3 y araquidónico 20:4n-6 en favor de los ácidos grasos mucho menos insaturados, linoleico 18:2n-6 y linolénico 18:3n-3 en las especies longevas (Hulbert et al., 2007), dado que estas enzimas son limitantes en las síntesis de los ácidos grasos mencionados. De forma similar a lo que sucede en los animales

longevos, los dos tratamientos con atenolol disminuyeron de forma muy marcada los ácidos grasos altamente insaturados docosahexaenoico 22:6n-3 y araquidónico, 20:4n-6. Sin embargo, sus precursores 18:3n-3 y 18:2n-6 no incrementaron sus niveles en ninguno de los casos. A pesar de ello, la estimación de diferentes actividades desaturadas y elongadas llevada a cabo en el trabajo del objetivo 4, ofrecieron resultados interesantes como la disminución de la actividad desaturasa delta 5, como ocurre en los animales longevos, en los animales tratados con atenolol. Aún así, debido a que la reducción fue pequeña y también se encontró un aumento de la actividad desaturasa delta 6, creemos que deberían estar implicados cambios adicionales en el metabolismo de los ácidos grasos como la remodelación de los grupos acilo de los fosfolípidos mediante reacciones de deacilación-acilación o a través de vías catabólicas, específicas para diferentes PUFAs.

Por otro lado, en el modelo de restricción de metionina y cuando esta intervención se implementó de forma conjunta con el tratamiento con atenolol también se detectaron cambios en los ácidos grasos mencionados 22:6n-3 y 20:4n-6 y la actividad desaturasa delta5 disminuyó de forma acusada en el tratamiento conjunto (80% de descenso). Además también se produjo el incremento en la actividad desaturasa delta 6 y otra serie de cambios en las actividades de las elongadas, en concreto la Elovl 2 y en la actividad de la beta oxidación peroxisómica, encargada de los últimos pasos de la síntesis de los ácidos grasos 22:6n-3 (Guillou et al., 2010).

Por lo tanto, parece que los modelos dietéticos estarían actuando de manera más marcada sobre las enzimas encargadas de la desaturación, elongación o beta oxidación peroxisómica y el bloqueo beta-adrenérgico también podría inducir cambios en otras vías, como el ciclo de deacilación–reacilación o a través de la activación de vías catabólicas específicas de determinados PUFAs. El ciclo de deacilación-reacilación es un mecanismo importante de modulación de la composición lipídica dado que se encarga de la introducción de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana. Parece que la baja insaturación de los ácidos grasos de membrana en las especies longevas también podría deberse a cambios en este ciclo de deacilación-reacilación, dado que diversos estudios que han analizado las principales clases de fosfolípidos de las membranas en estudios con diferentes especies o con la especie longeva rata topo

desnuda (*naked mole rat*), han encontrado una redistribución del ácido araquidónico y docosahexaenoico solo en determinados tipos de fosfolípidos (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) que conforman la membrana (Portero-Otin et al., 2001; Mitchell et al., 2007). Por lo tanto, el bloqueo β -adrenérgico podría estar modulando la composición lipídica a través de cambios en este ciclo, por lo que resultaría interesante en un futuro, estudiar qué tipos de fosfolípidos que conforman la membrana se ven afectados por esta redistribución de ácidos grasos que confieren a la membrana mayor resistencia al estrés oxidativo.

Tanto la modificación en las enzimas desaturasas y elongasas como en las enzimas que participan en la beta-oxidación peroxisómica y en los ciclos de deacilación-reacilación podría responder a la variación en la expresión de genes nucleares como respuesta a la señalización inducida por el bloqueo beta-adrenérgico o por la restricción de metionina. Una proteína clave en la regulación de la expresión génica de las enzimas desaturasas y en general, de las enzimas encargadas de la síntesis de los ácidos grasos, es el factor de transcripción SREBP-1c (Steroil regulatory element binding protein 1-c), que modula la transcripción de los genes que codifican para la desaturasa 6 y 5, y parece estar regulada por la señalización mediante insulina, y por la presencia elevada de los PUFAs (Nakamura y Nara, 2002; Eberlé et al., 2004). Por lo tanto, este factor de transcripción podría estar siendo regulado por la proteína de señalización p-ERK, que según ha sido demostrado en nuestros trabajos se encuentra incrementada tanto como consecuencia del bloqueo β -adrenérgico mediante el tratamiento con atenolol como con la restricción de metionina al 40% en corazón. El hecho de que distintas formas de este factor de transcripción: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2 hayan sido descritas como sustratos directos de la fosforilación por la proteína p-ERK (Kotzka et al., 2012), da pistas sobre el mecanismo por el cual esta proteína podría estar regulando la composición lipídica.

Además, también hemos demostrado como el tratamiento combinado de RMet+atenolol incrementa de manera muy superior la fosforilación de la proteína ERK y eso va unido a un mayor descenso del grado de insaturación de membrana. Por otro lado, de acuerdo con un experimento llevado a cabo en el laboratorio de la Dra. Perrone se ha demostrado que la restricción de metionina al 80% ejerce efectos sobre

numerosos genes, entre ellos, las enzimas elongasas y otras enzimas implicadas en el metabolismo lipídico (Perrone et al., 2012b). Por ello proponemos que tanto la restricción de metionina como el tratamiento con atenolol podrían estar modificando la expresión génica de enzimas implicadas en la modulación de la composición lipídica mediante la regulación del factor de transcripción SREBP1-c, a través de la estimulación de la proteína p-ERK con el fin de generar membranas celulares no solo más resistentes al estrés oxidativo sino menos “propagadoras” del daño.

Por último cabe destacar que en el caso de la restricción de metionina y como se comentó anteriormente, la menor producción de radicales libres disminuyó el daño oxidativo al ADN mitocondrial y a las proteínas. En el caso del atenolol, cuando el tratamiento fue más prolongado se redujo el daño oxidativo al ADN mitocondrial a pesar del incremento en la producción de radicales libres. Esto puede achacarse al papel importante que juega la composición lipídica en el estrés oxidativo. El hecho de que las membranas celulares contengan una cantidad elevada de ácidos grasos poliinsaturados no solo las hace ser blanco directo para las reacciones con los radicales libres sino que también las hace participar en una serie de reacciones en cadena con los radicales libres. De esta forma, conseguir un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, como en nuestro caso con el tratamiento con atenolol, será realmente ventajoso porque disminuirá su sensibilidad a la peroxidación lipídica y protegerá otras moléculas contra el daño secundario derivado del proceso de peroxidación lipídica en sí misma, como por ejemplo el caso del ADN mitocondrial, altamente susceptible a este tipo de daño por su localización en contacto incluso con la membrana mitocondrial interna. Así, nuestros resultados apuntan a la modulación de la composición lipídica como un mecanismo importante en la disminución de la tasa de envejecimiento de ratones con la señalización β -adrenérgica interrumpida o roedores restringidos en metionina.

CONCLUSIONES

- ★ La restricción de metionina al 40% a corto plazo disminuye la producción y fuga de radicales libres en el complejo I en mitocondrias cardíacas, lo que se acompaña con el descenso en los niveles de daño oxidativo al ADN mitocondrial y de daño oxidativo, glicoxidativo y lipoxidativo a proteínas. Estos cambios son similares a los observados previamente en restricción de dieta y de metionina al 80% pero sin efectos negativos sobre la tasa de crecimiento de los animales. Además, el grado de metilación global del ADN genómico también se ve alterado tras este tratamiento, lo que sugiere la posible existencia de cambios en la expresión génica.
- ★ Las ratas viejas (24 meses) mantienen la capacidad de disminuir la producción y fuga de radicales libres en mitocondrias hepáticas en respuesta a la restricción de metionina al 40% durante 7 semanas, al igual que ha sido descrito en ratas jóvenes. Además, la restricción de metionina iniciada a edades avanzadas disminuye el daño oxidativo al ADN mitocondrial y revierte el incremento producido por la edad en los marcadores de modificación proteica. Ello indica que la restricción de metionina resulta efectiva para reducir el estrés oxidativo incluso a edades avanzadas.
- ★ Nuestros trabajos, junto con estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, indican que la metionina podría ser el componente de la dieta responsable de la disminución en el estrés oxidativo y probablemente de parte del incremento en longevidad que se produce en la restricción de dieta.
- ★ La interrupción de la señalización β -adrenérgica tras 2 semanas de tratamiento con atenolol disminuye el nivel de los marcadores de oxidación y lipoxidación proteica, reduce de forma muy marcada el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, e incrementa la cantidad de la proteína p-ERK en el corazón de ratón C57BL/6. Sin embargo este tratamiento no afecta a la producción mitocondrial de radicales libres ni al daño oxidativo al ADN mitocondrial.

- ★ Estos resultados apoyan la idea de que el incremento de longevidad observado en los ratones AC5KO, con la señalización β -adrenérgica bloqueada, puede estar relacionado con la menor insaturación de ácidos grasos de membrana y el consiguiente menor daño lipoxidativo a las proteínas celulares, lo que podría estar inducido por un incremento en la señalización mediada por la proteína ERK.
- ★ Los trabajos expuestos en la presente tesis indican que los dos factores que correlacionan con la longevidad de aves y mamíferos: una baja intensidad de producción mitocondrial de radicales libres y un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana pueden ser obtenidos mediante la restricción de metionina en la dieta o el tratamiento con atenolol.
- ★ El tratamiento combinado de restricción de metionina en la dieta y atenolol en el agua de bebida disminuye el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, los marcadores de oxidación proteica e incrementa la cantidad de la proteína p-ERK de forma más acusada que cada uno de los tratamientos utilizados por separado. Además, el tratamiento combinado revierte el incremento de la producción mitocondrial de radicales libres inducido por el tratamiento con atenolol, disminuye la fuga de radicales libres en el complejo I y el daño oxidativo al ADN mitocondrial.
- ★ Aunque las variaciones en los niveles de daño oxidativo al ADN mitocondrial se relacionan con las variaciones en la producción de radicales libres, el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana también puede contribuir a modificar el daño al ADN mitocondrial, dado que no solo modula la susceptibilidad a la peroxidación lipídica sino que también regula la producción secundaria de radicales libres.

BIBLIOGRAFÍA

- ABLES GP, PERRONE CE, ORENTREICH D, ORENTREICH N (2012) Methionine-restricted C57BL/6J mice are resistant to diet-induced obesity and insulin resistance but have low bone density. *PLoS one* 7:e51357.
- AHN BH, KIM HS, SONG S, LEE IH, LIU J, VASSILOPOULOS A, DENG CX, FINKEL T (2008) A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:14447-14452.
- AHUJA N, ISSA JP (2000) Aging, methylation and cancer. *Histology and histopathology* 15:835-842.
- AHUJA N, SCHWER B, CAROBBIO S, WALTREGNY D, NORTH BJ, CASTRONOVO V, MAECHLER P, VERDIN E (2007) Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 282:33583-33592.
- AIKENS J, DIX TA (1991) Peroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *The Journal of biological chemistry* 266:15091-15098.
- ALBERTINI E, KOZIEL R, DURR A, NEUHAUS M, JANSEN-DURR P (2012) Cystathionine beta synthase modulates senescence of human endothelial cells. *Aging (Albany NY)* 4:664-673.
- ALBRING M, GRIFFITH J, ATTARDI G (1977) Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:1348-1352.
- ALEDO JC, LI Y, DE MAGALHAES JP, RUIZ-CAMACHO M, PEREZ-CLAROS JA (2011) Mitochondrially encoded methionine is inversely related to longevity in mammals. *Aging cell* 10:198-207.
- ALEDO JC, VALVERDE H, DE MAGALHAES JP (2012) Mutational bias plays an important role in shaping longevity-related amino acid content in mammalian mtDNA-encoded proteins. *Journal of molecular evolution* 74:332-341.
- ALMEIDA AM, BERTONCINI CR, BORECKY J, SOUZA-PINTO NC, VERCESI AE (2006) Mitochondrial DNA damage associated with lipid peroxidation of the mitochondrial membrane induced by Fe²⁺-citrate. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78:505-514.
- AMARAL CL, BUENO RDE B, BURIM RV, QUEIROZ RH, BIANCHI MDE L, ANTUNES LM (2011) The effects of dietary supplementation of methionine on genomic stability and p53 gene promoter methylation in rats. *Mutation research* 722:78-83.
- AMES BN, SHIGENAGA MK, HAGEN TM (1995) Mitochondrial decay in aging. *Biochimica et biophysica acta* 1271:165-170.
- ANDERSON S, BANKIER AT, BARRELL BG, DE BRUIJN MH, COULSON AR, DROUIN J, EPERON IC, NIERLICH DP, ROE BA, SANGER F, SCHREIER PH, SMITH AJ, STADEN R, YOUNG IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
- ANDERSSON DC, FAUCONNIER J, YAMADA T, LACAMPAGNE A, ZHANG SJ, KATZ A, WESTERBLAD H (2011) Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the beta-adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *The Journal of physiology* 589:1791-1801.
- ANDZIAK B, O'CONNOR TP, BUFFENSTEIN R (2005) Antioxidants do not explain the disparate longevity between mice and the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Mechanisms of ageing and development* 126:1206-1212.
- ANDZIAK B, BUFFENSTEIN R (2006) Disparate patterns of age-related changes in lipid peroxidation in long-lived naked mole-rats and shorter-lived mice. *Aging cell* 5:525-532.
- ANDZIAK B, O'CONNOR TP, QI W, DEWAAL EM, PIERCE A, CHAUDHURI AR, VAN REMMEN H, BUFFENSTEIN R (2006) High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging cell* 5:463-471.
- ANISIMOV VN, SEMENCHENKO AV, YASHIN AI (2003) Insulin and longevity: antidiabetic biguanides as geroprotectors. *Biogerontology* 4:297-307.
- ANISIMOV VN, BERSTEIN LM, POPOVICH IG, ZABEZHINSKI MA, EGORMIN PA, PISKUNOVA TS, SEMENCHENKO AV, TYNDYK ML, YUROVA MN, KOVALENKO IG, POROSHINA TE (2011) If started early in life,

- metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. *Aging (Albany NY)* 3:148-157.
- APOSHIAN HV (1997) Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology* 37:397-419.
- ASAI K, YANG GP, GENG YJ, TAKAGI G, BISHOP S, ISHIKAWA Y, SHANNON RP, WAGNER TE, VATNER DE, HOMCY CJ, VATNER SF (1999) Beta-adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic G(salpa) mouse. *The Journal of clinical investigation* 104:551-558.
- ASUNCION JG, MILLAN A, PLA R, BRUSEGHINI L, ESTERAS A, PALLARDO FV, SASTRE J, VINA J (1996) Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10:333-338.
- AYALA V, NAUDI A, SANZ A, CARO P, PORTERO-OTIN M, BARJA G, PAMPLONA R (2007) Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 62:352-360.
- AZZU V, JASTROCH M, DIVAKARUNI AS, BRAND MD (2010) The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1797:785-791.
- BAEK IH, YUN MH, YUN HY, KWON KI (2008) Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the cardiovascular effects of beta blockers in humans. *Archives of pharmacal research* 31:814-821.
- BAILEY CJ, TURNER RC (1996) Metformin. *The New England journal of medicine* 334:574-579.
- BARJA G (1993) Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? *Free radical research communications* 18:63-70.
- BARJA G, CADENAS S, ROJAS C, PEREZ-CAMPO R, LOPEZ-TORRES M (1994a) Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free radical research* 21:317-327.
- BARJA G, CADENAS S, ROJAS C, LOPEZ-TORRES M, PEREZ-CAMPO R (1994b) A decrease of free radical production near critical targets as a cause of maximum longevity in animals. *Comparative biochemistry and physiology Biochemistry and molecular biology* 108:501-512.
- BARJA G, HERRERO A (1998) Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 30:235-243.
- BARJA G (1999) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 31:347-366.
- BARJA G, HERRERO A (2000) Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14:312-318.
- BARJA G (2002) The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 34:227-233.
- BARJA G (2004a) Free radicals and aging. *Trends in neurosciences* 27:595-600.
- BARJA G (2004b) Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 79:235-251.
- BARJA G (2007) Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation research* 10:215-224.

- BARROWS CH, JR., KOKKONEN G (1975) Protein synthesis, development, growth and life span. *Growth* 39:525-533.
- BARTKE A, COSCHIGANO K, KOPCHICK J, CHANDRASHEKAR V, MATTISON J, KINNEY B, HAUCK S (2001a) Genes that prolong life: relationships of growth hormone and growth to aging and life span. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 56:B340-349.
- BARTKE A, WRIGHT JC, MATTISON JA, INGRAM DK, MILLER RA, ROTH GS (2001b) Extending the lifespan of long-lived mice. *Nature* 414:412.
- BASS TM, WEINKOVE D, HOUTHOOFD K, GEMS D, PARTRIDGE L (2007) Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of ageing and development* 128:546-552.
- BAUER JH, GOUPIL S, GARBER GB, HELFAND SL (2004) An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:12980-12985.
- BAUR JA, PEARSON KJ, PRICE NL, JAMIESON HA, LERIN C, KALRA A, PRABHU VV, ALLARD JS, LOPEZ-LLUCH G, LEWIS K, PISTELL PJ, POOSALA S, BECKER KG, BOSS O, GWINN D, WANG M, RAMASWAMY S, FISHBEIN KW, SPENCER RG, LAKATTA EG, LE COUTEUR D, SHAW RJ, NAVAS P, PUIGSERVER P, INGRAM DK, DE CABO R, SINCLAIR DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342.
- BAUR JA, CHEN D, CHINI EN, CHUA K, COHEN HY, DE CABO R, DENG C, DIMMELER S, GIUS D, GUARENTE LP, HELFAND SL, IMAI S, ITOH H, KADOWAKI T, KOYA D, LEEUWENBURGH C, MCBURNEY M, NABESHIMA Y, NERI C, OBERDOERFFER P, PESTELL RG, ROGINA B, SADOSHIMA J, SARTORELLI V, SERRANO M, SINCLAIR DA, STEGBORN C, TATAR M, TISSENBAUM HA, TONG Q, TSUBOTA K, VAQUERO A, VERDIN E (2010) Dietary restriction: standing up for sirtuins. *Science* 329:1012-1013; author reply 1013-1014.
- BECKMAN KB, AMES BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews* 78:547-581.
- BELL EL, GUARENTE L (2011) The Sirt3 divining rod points to oxidative stress. *Molecular cell* 42:561-568.
- BENDER A, KRISHNAN KJ, MORRIS CM, TAYLOR GA, REEVE AK, PERRY RH, JAROS E, HERSHESON JS, BETTS J, KLOPSTOCK T, TAYLOR RW, TURNBULL DM (2006) High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature genetics* 38:515-517.
- BERTHONNECHE C, PETER B, SCHUPFER F, HAYOZ P, KUTALIK Z, ABRIEL H, PEDRAZZINI T, BECKMANN JS, BERGMANN S, MAURER F (2009) Cardiovascular response to beta-adrenergic blockade or activation in 23 inbred mouse strains. *PloS one* 4:e6610.
- BIARY N, AKAR FG (2010) A brighter side of ROS revealed by selective activation of beta-adrenergic receptor subtypes. *The Journal of physiology* 588:2973-2974.
- BIELSKI BH, ARUDI RL, SUTHERLAND MW (1983) A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry* 258:4759-4761.
- BJORNSSON HT, SIGURDSSON MI, FALLIN MD, IRIZARRY RA, ASPELUND T, CUI H, YU W, RONGIONE MA, EKSTROM TJ, HARRIS TB, LAUNER LJ, EIRIKSDOTTIR G, LEPPERT MF, SAPIENZA C, GUDNASON V, FEINBERG AP (2008) Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 299:2877-2883.
- BLANCHARD JL, LYNCH M (2000) Organellar genes: why do they end up in the nucleus? *Trends in genetics : TIG* 16:315-320.
- BOHR VA (2002) Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free radical biology & medicine* 32:804-812.
- BONAWITZ ND, CHATENAY-LAPOINTE M, PAN Y, SHADEL GS (2007) Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell metabolism* 5:265-277.

- BONKOWSKI MS, ROCHA JS, MASTERNAK MM, AL REGAIEY KA, BARTKE A (2006) Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:7901-7905.
- BOURNE GH (1973) Lipofuscin. *Progress in brain research* 40:187-201.
- BOVERIS A, CHANCE B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical journal* 134:707-716.
- BOVERIS A, CADENAS E, STOPPANI AO (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *The Biochemical journal* 156:435-444.
- BRAIDY N, GUILLEMIN GJ, MANSOUR H, CHAN-LING T, POLJAK A, GRANT R (2011) Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PloS one* 6:e19194.
- BRAND MD, BUCKINGHAM JA, ESTEVES TC, GREEN K, LAMBERT AJ, MIWA S, MURPHY MP, PAKAY JL, TALBOT DA, ECHTAY KS (2004) Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. *Biochemical Society symposium* 203-213.
- BRANDT U (1997) Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochimica et biophysica acta* 1318:79-91.
- BRENNER RR (1984) Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics. *Progress in lipid research* 23:69-96.
- BROWN-BORG HM, BORG KE, MELISKA CJ, BARTKE A (1996) Dwarf mice and the ageing process. *Nature* 384:33.
- BRUNET-ROSSINNI AK, AUSTAD SN (2004) Ageing studies on bats: a review. *Biogerontology* 5:211-222.
- BUFFENSTEIN R (2005) The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 60:1369-1377.
- BULTEMA JB, BRAUN HP, BOEKEMA EJ, KOURIL R (2009) Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochimica et biophysica acta* 1787:60-67.
- BURCH HB, LOWRY OH, BRADLEY ME, MAX PF, JR. (1970) Hepatic metabolites and cofactors in riboflavin deficiency and calorie restriction. *The American journal of physiology* 219:409-415.
- BURNETT C, VALENTINI S, CABREIRO F, GOSS M, SOMOGYVARI M, PIPER MD, HODDINOTT M, SUTPHIN GL, LEKO V, MCELWEE JJ, VAZQUEZ-MANRIQUE RP, ORFILA AM, ACKERMAN D, AU C, VINTI G, RIESEN M, HOWARD K, NERI C, BEDALOV A, KAEBERLEIN M, SOTI C, PARTRIDGE L, GEMS D (2011) Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature* 477:482-485.
- BUTTEMER WA, BATTAM H, HULBERT AJ (2008) Fowl play and the price of petrel: long-living Procellariiformes have peroxidation-resistant membrane composition compared with short-living Galliformes. *Biology letters* 4:351-354.
- CABREIRO F, AU C, LEUNG KY, VERGARA-IRIGARAY N, COCHEME HM, NOORI T, WEINKOVE D, SCHUSTER E, GREENE ND, GEMS D (2013) Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell* 153:228-239.
- CADENAS E, BOVERIS A, RAGAN CI, STOPPANI AO (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* 180:248-257.
- CADET J, RAVANAT JL, TAVERNAPORRO M, MENONI H, ANGELOV D (2012) Oxidatively generated complex DNA damage: tandem and clustered lesions. *Cancer letters* 327:5-15.
- CARO P, GOMEZ J, SANZ A, PORTERO-OTIN M, PAMPLONA R, BARJA G (2007) Effect of graded corticosterone treatment on aging-related markers of oxidative stress in rat liver mitochondria. *Biogerontology* 8:1-11.

- CARO P, GOMEZ J, LOPEZ-TORRES M, SANCHEZ I, NAUDI A, JOVE M, PAMPLONA R, BARJA G (2008) Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 9:183-196.
- CARO P, GOMEZ J, SANCHEZ I, NAUDI A, AYALA V, LOPEZ-TORRES M, PAMPLONA R, BARJA G (2009a) Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. *Rejuvenation research* 12:421-434.
- CARO P, GOMEZ J, SANCHEZ I, GARCIA R, LOPEZ-TORRES M, NAUDI A, PORTERO-OTIN M, PAMPLONA R, BARJA G (2009b) Effect of 40% restriction of dietary amino acids (except methionine) on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology* 10:579-592.
- CARO P, GOMEZ J, ARDUINI A, GONZALEZ-SANCHEZ M, GONZALEZ-GARCIA M, BORRAS C, VINA J, PUERTAS MJ, SASTRE J, BARJA G (2010) Mitochondrial DNA sequences are present inside nuclear DNA in rat tissues and increase with age. *Mitochondrion* 10:479-486.
- CARROLL J, FEARNLEY IM, SKEHEL JM, SHANNON RJ, HIRST J, WALKER JE (2006) Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *The Journal of biological chemistry* 281:32724-32727.
- CAVUOTO P, FENECH MF (2012) A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer treatment reviews* 38:726-736.
- CECCHINI G (2003) Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual review of biochemistry* 72:77-109.
- CEDAR H, BERGMAN Y (2012) Programming of DNA methylation patterns. *Annual review of biochemistry* 81:97-117.
- CEFALU WT, WANG ZQ, BELL-FARROW AD, TERRY JG, SONNTAG W, WAITE M, PARKS J (2000) Chronic caloric restriction alters muscle membrane fatty acid content. *Experimental gerontology* 35:331-341.
- CLANCY DJ, GEMS D, HARSHMAN LG, OLDHAM S, STOCKER H, HAFEN E, LEEVERS SJ, PARTRIDGE L (2001) Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292:104-106.
- CLARKE S, BANFIELD K (2001) S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases. In: *Homocysteine in Health and Disease* (Carmel, R. and Jacobsen, D., eds), pp 63-78.
- CLINE SD (2012) Mitochondrial DNA damage and its consequences for mitochondrial gene expression. *Biochimica et biophysica acta* 1819:979-991.
- COLMAN RJ, ANDERSON RM, JOHNSON SC, KASTMAN EK, KOSMATKA KJ, BEASLEY TM, ALLISON DB, CRUZEN C, SIMMONS HA, KEMNITZ JW, WEINDRUCH R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325:201-204.
- COOKE MS, PODMORE ID, MISTRY N, EVANS MD, HERBERT KE, GRIFFITHS HR, LUNEC J (2003) Immunochemical detection of UV-induced DNA damage and repair. *Journal of immunological methods* 280:125-133.
- COSCHIGANO KT, CLEMMONS D, BELLUSH LL, KOPCHICK JJ (2000) Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. *Endocrinology* 141:2608-2613.
- COSTA RA, ROMAGNA CD, PEREIRA JL, SOUZA-PINTO NC (2011) The role of mitochondrial DNA damage in the cytotoxicity of reactive oxygen species. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 43:25-29.
- CROFTS AR (2004) Proton-coupled electron transfer at the Qo-site of the bc1 complex controls the rate of ubihydroquinone oxidation. *Biochimica et biophysica acta* 1655:77-92.
- CROTT JW, CHOI SW, BRANDA RF, MASON JB (2005) Accumulation of mitochondrial DNA deletions is age, tissue and folate-dependent in rats. *Mutation research* 570:63-70.
- CHALKIADAKI A, GUARENTE L (2012) Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nature reviews Endocrinology* 8:287-296.

- CHANCE B, WILLIAMS GR (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry* 17:65-134.
- CHANCE B, SIES H, BOVERIS A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews* 59:527-605.
- CHENG X, IVESSA AS (2010) The migration of mitochondrial DNA fragments to the nucleus affects the chronological aging process of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging cell* 9:919-923.
- CHRISTENSEN BC, HOUSEMAN EA, MARSIT CJ, ZHENG S, WRENSCH MR, WIEMELS JL, NELSON HH, KARAGAS MR, PADBURY JF, BUENO R, SUGARBAKER DJ, YEH RF, WIENCKE JK, KELSEY KT (2009) Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS genetics* 5:e1000602.
- CHUNG H, KIM AK, JUNG SA, KIM SW, YU K, LEE JH (2010) The *Drosophila* homolog of methionine sulfoxide reductase A extends lifespan and increases nuclear localization of FOXO. *FEBS letters* 584:3609-3614.
- DALLE-DONNE I, ROSSI R, COLOMBO R, GIUSTARINI D, MILZANI A (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry* 52:601-623.
- DE GREY AD (2002) HO2*: the forgotten radical. *DNA and cell biology* 21:251-257.
- DELANEY S, JAREM DA, VOLLE CB, YENNIE CJ (2012) Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA. *Free radical research* 46:420-441.
- DHAHBI JM, MOTE PL, WINGO J, ROWLEY BC, CAO SX, WALFORD RL, SPINDLER SR (2001) Caloric restriction alters the feeding response of key metabolic enzyme genes. *Mechanisms of ageing and development* 122:1033-1048.
- DHAHBI JM, KIM HJ, MOTE PL, BEAVER RJ, SPINDLER SR (2004) Temporal linkage between the phenotypic and genomic responses to caloric restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:5524-5529.
- DILLIN A, HSU AL, ARANTES-OLIVEIRA N, LEHRER-GRAIWER J, HSIN H, FRASER AG, KAMATH RS, AHRINGER J, KENYON C (2002) Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science* 298:2398-2401.
- DIZDAROGLU M (1992) Measurement of radiation-induced damage to DNA at the molecular level. *International journal of radiation biology* 61:175-183.
- DIZDAROGLU M, JARUGA P, BIRINCIOLU M, RODRIGUEZ H (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free radical biology & medicine* 32:1102-1115.
- DIZDAROGLU M, JARUGA P (2012) Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free radical research* 46:382-419.
- DREW B, PHANEUF S, DIRKS A, SELMAN C, GREDILLA R, LEZZA A, BARJA G, LEEUWENBURGH C (2003) Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 284:R474-480.
- DROSE S, BRANDT U (2012) Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Advances in experimental medicine and biology* 748:145-169.
- DU XJ, GAO XM, WANG B, JENNINGS GL, WOODCOCK EA, DART AM (2000) Age-dependent cardiomyopathy and heart failure phenotype in mice overexpressing beta(2)-adrenergic receptors in the heart. *Cardiovascular research* 48:448-454.
- EBERLE D, HEGARTY B, BOSSARD P, FERRE P, FOUFFELLE F (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86:839-848.
- EL-MIR MY, NOGUEIRA V, FONTAINE E, AVERET N, RIGOULET M, LEVERVE X (2000) Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *The Journal of biological chemistry* 275:223-228.
- ELSHORBAGY AK, VALDIVIA-GARCIA M, REFSUM H, SMITH AD, MATTOCKS DA, PERRONE CE (2010) Sulfur amino acids in methionine-restricted rats: hyperhomocysteinemia. *Nutrition* 26:1201-1204.

- ELSHORBAGY AK, VALDIVIA-GARCIA M, MATTOCKS DA, PLUMMER JD, SMITH AD, DREYON CA, REFSUM H, PERRONE CE (2011) Cysteine supplementation reverses methionine restriction effects on rat adiposity: significance of stearoyl-coenzyme A desaturase. *Journal of lipid research* 52:104-112.
- ENGELHARDT S, HEIN L, WIESMANN F, LOHSE MJ (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:7059-7064.
- ESTERHAZY D, KING MS, YAKOVLEV G, HIRST J (2008) Production of reactive oxygen species by complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Escherichia coli* and comparison to the enzyme from mitochondria. *Biochemistry* 47:3964-3971.
- FAILLA G (1958) The aging process and cancerogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 71:1124-1140.
- FALKENBERG M, LARSSON NG, GUSTAFSSON CM (2007) DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual review of biochemistry* 76:679-699.
- FATO R, BERGAMINI C, LEONI S, LENAZ G (2008) Mitochondrial production of reactive oxygen species: role of complex I and quinone analogues. *BioFactors* 32:31-39.
- FATO R, BERGAMINI C, BORTOLUS M, MANIERO AL, LEONI S, OHNISHI T, LENAZ G (2009) Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta* 1787:384-392.
- FLURKEY K, PAPACONSTANTINO J, MILLER RA, HARRISON DE (2001) Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:6736-6741.
- FOKSINSKI M, ROZALSKI R, GUZ J, RUSZKOWSKA B, SZTUKOWSKA P, PIWOWARSKI M, KLUNGLAND A, OLINSKI R (2004) Urinary excretion of DNA repair products correlates with metabolic rates as well as with maximum life spans of different mammalian species. *Free radical biology & medicine* 37:1449-1454.
- FONTANA L, KLEIN S (2007) Aging, adiposity, and calorie restriction. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 297:986-994.
- FONTANA L, WEISS EP, VILLAREAL DT, KLEIN S, HOLLOSZY JO (2008) Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. *Aging cell* 7:681-687.
- FONTANA L, KLEIN S, HOLLOSZY JO (2010) Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *Age (Dordr)* 32:97-108.
- FONTANA L, VINCIGUERRA M, LONGO VD (2012) Growth factors, nutrient signaling, and cardiovascular aging. *Circulation research* 110:1139-1150.
- FRAGA MF, BALLESTAR E, PAZ MF, ROPER S, SETIEN F, BALLESTAR ML, HEINE-SUNER D, CIGUDOSA JC, URIOSTE M, BENITEZ J, BOIX-CHORNET M, SANCHEZ-AGUILERA A, LING C, CARLSSON E, POULSEN P, VAAG A, STEPHAN Z, SPECTOR TD, WU YZ, PLASS C, ESTELLER M (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:10604-10609.
- FRIEDRICH T, BOTTCHER B (2004) The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System. *Biochimica et biophysica acta* 1608:1-9.
- FUNOVIC P, KORDA M, KUBANT R, BARLAG RE, JACOB RE, MASON RP, MALINSKI T (2008) Effect of beta-blockers on endothelial function during biological aging: a nanotechnological approach. *Journal of cardiovascular pharmacology* 51:208-215.
- GALKIN A, BRANDT U (2005) Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of biological chemistry* 280:30129-30135.
- GELLISSSEN G, BRADFIELD JY, WHITE BN, WYATT GR (1983) Mitochondrial DNA sequences in the nuclear genome of a locust. *Nature* 301:631-634.

- GEMS D, PARTRIDGE L (2001) Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture. *Current opinion in genetics & development* 11:287-292.
- GHOSH PM, SHU ZJ, ZHU B, LU Z, IKENO Y, BARNES JL, YEH CK, ZHANG BX, KATZ MS, KAMAT A (2012) Role of beta-adrenergic receptors in regulation of hepatic fat accumulation during aging. *The Journal of endocrinology* 213:251-261.
- GOFFART S, WIESNER RJ (2003) Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Experimental physiology* 88:33-40.
- GOMEZ J, CARO P, SANCHEZ I, NAUDI A, JOVE M, PORTERO-OTIN M, LOPEZ-TORRES M, PAMPLONA R, BARJA G (2009) Effect of methionine dietary supplementation on mitochondrial oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver and heart. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 41:309-321.
- GOMEZ J, SANCHEZ-ROMAN I, GOMEZ A, SANCHEZ C, SUAREZ H, LOPEZ-TORRES M, BARJA G (2011) Methionine and homocysteine modulate the rate of ROS generation of isolated mitochondria in vitro. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 43:377-386.
- GOODRICK CL (1978) Body weight increment and length of life: the effect of genetic constitution and dietary protein. *Journal of gerontology* 33:184-190.
- GOTTLE M, GEDUHN J, KONIG B, GILLE A, HOCHERL K, SEIFERT R (2009) Characterization of mouse heart adenylyl cyclase. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 329:1156-1165.
- GOTTLIEB SS, MCCARTER RJ, VOGEL RA (1998) Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 339:489-497.
- GRANDISON RC, PIPER MD, PARTRIDGE L (2009) Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature* 462:1061-1064.
- GREAVES LC, TURNBULL DM (2009) Mitochondrial DNA mutations and ageing. *Biochimica et biophysica acta* 1790:1015-1020.
- GREDELLA R, BARJA G, LOPEZ-TORRES M (2001a) Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 33:279-287.
- GREDELLA R, SANZ A, LOPEZ-TORRES M, BARJA G (2001b) Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15:1589-1591.
- GREDELLA R, LOPEZ-TORRES M, BARJA G (2002) Effect of time of restriction on the decrease in mitochondrial H₂O₂ production and oxidative DNA damage in the heart of food-restricted rats. *Microscopy research and technique* 59:273-277.
- GREDELLA R, BARJA G (2005) Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146:3713-3717.
- GREDELLA R, GARM C, STEVNSNER T (2012) Nuclear and mitochondrial DNA repair in selected eukaryotic aging model systems. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012:282438.
- GUILLOU H, ZADRAVEC D, MARTIN PG, JACOBSSON A (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progress in lipid research* 49:186-199.
- GULATI P, THOMAS G (2007) Nutrient sensing in the mTOR/S6K1 signalling pathway. *Biochemical Society transactions* 35:236-238.
- HADDAD LS, KELBERT L, HULBERT AJ (2007) Extended longevity of queen honey bees compared to workers is associated with peroxidation-resistant membranes. *Experimental gerontology* 42:601-609.
- HAGOPIAN K, HARPER ME, RAM JJ, HUMBLE SJ, WEINDRUCH R, RAMSEY JJ (2005) Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver

- mitochondria. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 288:E674-684.
- HAGOPIAN K, CHEN Y, SIMMONS DOMER K, SOO HOO R, BENTLEY T, McDONALD RB, RAMSEY JJ (2011) Caloric restriction influences hydrogen peroxide generation in mitochondrial sub-populations from mouse liver. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 43:227-236.
- HALESTRAP AP, PASDOIS P (2009) The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochimica et biophysica acta* 1787:1402-1415.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal* 219:1-14.
- HAMILTON ML, VAN REMMEN H, DRAKE JA, YANG H, GUO ZM, KEWITT K, WALTER CA, RICHARDSON A (2001) Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:10469-10474.
- HANSEN M, CHANDRA A, MITIC LL, ONKEN B, DRISCOLL M, KENYON C (2008) A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS genetics* 4:e24.
- HARMAN D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11:298-300.
- HARMAN D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society* 20:145-147.
- HARMAN D (1986) *Free radical theory of aging: role of free radical reactions in the origination and evolution of life, aging and disease processes.*: Liss.
- HARPER AE, BENEVENGA NJ, WOHLHUETER RM (1970) Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiological reviews* 50:428-558.
- HARRISON DE, STRONG R, SHARP ZD, NELSON JF, ASTLE CM, FLURKEY K, NADON NL, WILKINSON JE, FRENKEL K, CARTER CS, PAHOR M, JAVORS MA, FERNANDEZ E, MILLER RA (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460:392-395.
- HASS BS, HART RW, LU MH, LYN-COOK BD (1993) Effects of caloric restriction in animals on cellular function, oncogene expression, and DNA methylation in vitro. *Mutation research* 295:281-289.
- HATEFI Y, HAAVIK AG, FOWLER LR, GRIFFITHS DE (1962) Studies on the electron transfer system. XLII. Reconstitution of the electron transfer system. *The Journal of biological chemistry* 237:2661-2669.
- HAYFLICK L (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research* 37:614-636.
- HEILBRONN LK, DE JONGE L, FRISARD MI, DELANY JP, LARSON-MEYER DE, ROOD J, NGUYEN T, MARTIN CK, VOLAUFOVA J, MOST MM, GREENWAY FL, SMITH SR, DEUTSCH WA, WILLIAMSON DA, RAVUSSIN E, PENNINGTON CT (2006) Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 295:1539-1548.
- HERRERO A, BARJA G (1997) Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mechanisms of ageing and development* 98:95-111.
- HERRERO A, BARJA G (1998) H₂O₂ production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved. *Mechanisms of ageing and development* 103:133-146.
- HERRERO A, BARJA G (1999) 8-oxo-deoxyguanosine levels in heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of two mammals and three birds in relation to their different rates of aging. *Aging* 11:294-300.
- HERRERO A, BARJA G (2000) Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 32:609-615.

- HERRERO A, PORTERO-OTIN M, BELLMUNT MJ, PAMPLONA R, BARJA G (2001) Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H₂O₂ production and lipid and protein oxidative damage. *Mechanisms of ageing and development* 122:427-443.
- HEYN H, ESTELLER M (2012) DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nature reviews Genetics* 13:679-692.
- HIDIROGLOU N, GILANI GS, LONG L, ZHAO X, MADERE R, COCKELL K, BELONGE B, RATNAYAKE WM, PEACE R (2004) The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil. *The Journal of nutritional biochemistry* 15:730-740.
- HIPKISS AR (2012) Can the beneficial effects of methionine restriction in rats be explained in part by decreased methylglyoxal generation resulting from suppressed carbohydrate metabolism? *Biogerontology* 13:633-636.
- HIRSCHEY MD, SHIMAZU T, GOETZMAN E, JING E, SCHWER B, LOMBARD DB, GRUETER CA, HARRIS C, BIDDINGER S, ILKAYEVA OR, STEVENS RD, LI Y, SAHA AK, RUDERMAN NB, BAIN JR, NEWGARD CB, FARESE RV, JR., ALT FW, KAHN CR, VERDIN E (2010) SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 464:121-125.
- HIRST J, KING MS, PRYDE KR (2008) The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochemical Society transactions* 36:976-980.
- HOCK MB, KRALLI A (2009) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annual review of physiology* 71:177-203.
- HOCH FL (1992) Cardiolipins and biomembrane function. *Biochimica et biophysica acta* 1113:71-133.
- HOFFMAN DL, SALTER JD, BROOKES PS (2007) Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 292:H101-108.
- HOFFMAN RM (1985) Altered methionine metabolism and transmethylation in cancer. *Anticancer research* 5:1-30.
- HOLT IJ, HE J, MAO CC, BOYD-KIRKUP JD, MARTINSSON P, SEMBONGI H, REYES A, SPELBRINK JN (2007) Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome. *Mitochondrion* 7:311-321.
- HOLZENBERGER M, DUPONT J, DUCOS B, LENEUVE P, GELOEN A, EVEN PC, CERVERA P, LE BOUC Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421:182-187.
- HOLLOSZY JO, FONTANA L (2007) Caloric restriction in humans. *Experimental gerontology* 42:709-712.
- HOWITZ KT, BITTERMAN KJ, COHEN HY, LAMMING DW, LAVU S, WOOD JG, ZIPKIN RE, CHUNG P, KISIELEWSKI A, ZHANG LL, SCHERER B, SINCLAIR DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191-196.
- HUDSON EK, HOGUE BA, SOUZA-PINTO NC, CROTEAU DL, ANSON RM, BOHR VA, HANSFORD RG (1998) Age-associated change in mitochondrial DNA damage. *Free radical research* 29:573-579.
- HULBERT AJ, FAULKS SC, BUFFENSTEIN R (2006) Oxidation-resistant membrane phospholipids can explain longevity differences among the longest-living rodents and similarly-sized mice. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 61:1009-1018.
- HULBERT AJ, PAMPLONA R, BUFFENSTEIN R, BUTTEMER WA (2007) Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological reviews* 87:1175-1213.
- HULBERT AJ, BEARD LA, GRIGG GC (2008) The exceptional longevity of an egg-laying mammal, the short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*) is associated with peroxidation-resistant membrane composition. *Experimental gerontology* 43:729-733.

- HUTTER D, YO Y, CHEN W, LIU P, HOLBROOK NJ, ROTH GS, LIU Y (2000) Age-related decline in Ras/ERK mitogen-activated protein kinase cascade is linked to a reduced association between Shc and EGF receptor. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 55:B125-134.
- IKEYAMA S, KOKKONEN G, SHACK S, WANG XT, HOLBROOK NJ (2002) Loss in oxidative stress tolerance with aging linked to reduced extracellular signal-regulated kinase and Akt kinase activities. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16:114-116.
- IONS LJ, WAKELING LA, BOSOMWORTH HJ, HARDYMAN JE, ESCOLME SM, SWAN DC, VALENTINE RA, MATHERS JC, FORD D (2012) Effects of Sirt1 on DNA methylation and expression of genes affected by dietary restriction. *Age (Dordr)*.
- ISHIKAWA Y, IWATSUBO K, TSUNEMATSU T, OKUMURA S (2005) Genetic manipulation and functional analysis of cAMP signalling in cardiac muscle: implications for a new target of pharmacotherapy. *Biochemical Society transactions* 33:1337-1340.
- ISSA JP, OTTAVIANO YL, CELANO P, HAMILTON SR, DAVIDSON NE, BAYLIN SB (1994) Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nature genetics* 7:536-540.
- IWATSUBO K, MINAMISAWA S, TSUNEMATSU T, NAKAGOME M, TOYA Y, TOMLINSON JE, UMEMURA S, SCARBOROUGH RM, LEVY DE, ISHIKAWA Y (2004) Direct inhibition of type 5 adenylyl cyclase prevents myocardial apoptosis without functional deterioration. *The Journal of biological chemistry* 279:40938-40945.
- JANG YC, LIU Y, HAYWORTH CR, BHATTACHARYA A, LUSTGARTEN MS, MULLER FL, CHAUDHURI A, QI W, LI Y, HUANG JY, VERDIN E, RICHARDSON A, VAN REMMEN H (2012) Dietary restriction attenuates age-associated muscle atrophy by lowering oxidative stress in mice even in complete absence of CuZnSOD. *Aging cell* 11:770-782.
- JIA K, CHEN D, RIDDLE DL (2004) The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* 131:3897-3906.
- JOBSON RW, NABHOLZ B, GALTIER N (2010) An evolutionary genome scan for longevity-related natural selection in mammals. *Molecular biology and evolution* 27:840-847.
- JOHNSON AA, AKMAN K, CALIMPORT SR, WUTTKE D, STOLZING A, DE MAGALHAES JP (2012) The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. *Rejuvenation research* 15:483-494.
- JOVE M, AYALA V, RAMIREZ-NUNEZ O, NAUDI A, CABRE R, SPICKETT CM, PORTERO-OTIN M, PAMPLONA R (2013) Specific Lipidome Signatures in Central Nervous System from Methionine-Restricted Mice. *Journal of proteome research*.
- JUDGE S, JANG YM, SMITH A, HAGEN T, LEEUWENBURGH C (2005) Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19:419-421.
- JURETIC N (1995) Mitochondrial DNA rearrangements: intracellular information system. *FEBS letters* 362:337-341.
- KABIL H, KABIL O, BANERJEE R, HARSHMAN LG, PLETCHER SD (2011) Increased transsulfuration mediates longevity and dietary restriction in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:16831-16836.
- KAEBERLEIN M, MCVEY M, GUARENTE L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & development* 13:2570-2580.
- KAEBERLEIN M, McDONAGH T, HELTWEG B, HIXON J, WESTMAN EA, CALDWELL SD, NAPPER A, CURTIS R, DiSTEFANO PS, FIELDS S, BEDALOV A, KENNEDY BK (2005) Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *The Journal of biological chemistry* 280:17038-17045.
- KAEBERLEIN M (2010) Lessons on longevity from budding yeast. *Nature* 464:513-519.

- KAPAH P, ZID BM, HARPER T, KOSLOVER D, SAPIN V, BENZER S (2004) Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Current biology* : CB 14:885-890.
- KASTLE M, GRUNE T (2011) Protein oxidative modification in the aging organism and the role of the ubiquitin proteasomal system. *Current pharmaceutical design* 17:4007-4022.
- KENYON C (2001) A conserved regulatory system for aging. *Cell* 105:165-168.
- KENYON CJ (2010) The genetics of ageing. *Nature* 464:504-512.
- KHORAKOVA M, DEIL Z, KHAUSMAN D, MATSEK K (1990) [Effect of carbohydrate-enriched diet and subsequent food restriction on life prolongation in Fischer 344 male rats]. *Fiziologicheskii zhurnal* 36:16-21.
- KISBY GE, KOHAMA SG, OLIVAS A, CHURCHWELL M, DOERGE D, SPANGLER E, DECABO R, INGRAM DK, IMHOF B, BAO G, KOW YW (2010) Effect of caloric restriction on base-excision repair (BER) in the aging rat brain. *Experimental Gerontology* 45:208-216.
- KNIGHT JA (1995) The process and theories of aging. *Annals of clinical and laboratory science* 25:1-12.
- KOLTAI E, SZABO Z, ATALAY M, BOLDOGH I, NAITO H, GOTO S, NYAKAS C, RADAK Z (2010) Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mechanisms of ageing and development* 131:21-28.
- KOMNINO D, LEUTZINGER Y, REDDY BS, RICHIE JP, JR. (2006) Methionine restriction inhibits colon carcinogenesis. *Nutrition and cancer* 54:202-208.
- KOOPMAN WJ, NIJTMANS LG, DIETEREN CE, ROESTENBERG P, VALSECCHI F, SMEITINK JA, WILLEMS PH (2010) Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxidants & redox signaling* 12:1431-1470.
- KOTZKA J, KNEBEL B, HAAS J, KREMER L, JACOB S, HARTWIG S, NITZGEN U, MULLER-WIELAND D (2012) Preventing phosphorylation of sterol regulatory element-binding protein 1a by MAP-kinases protects mice from fatty liver and visceral obesity. *PLoS one* 7:e32609.
- KOYAMA T, KUME S, KOYA D, ARAKI S, ISSHIKI K, CHIN-KANASAKI M, SUGIMOTO T, HANEDA M, SUGAYA T, KASHIWAGI A, MAEGAWA H, UZU T (2011) SIRT3 attenuates palmitate-induced ROS production and inflammation in proximal tubular cells. *Free radical biology & medicine* 51:1258-1267.
- KRAYTSBERG Y, KUDRYAVTSEVA E, MCKEE AC, GEULA C, KOWALL NW, KHRAPKO K (2006) Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nature genetics* 38:518-520.
- KU HH, BRUNK UT, SOHAL RS (1993) Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free radical biology & medicine* 15:621-627.
- KU HH, SOHAL RS (1993) Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and anti-oxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential. *Mechanisms of ageing and development* 72:67-76.
- KUDIN AP, BIMPONG-BUTA NY, VIELHABER S, ELGER CE, KUNZ WS (2004) Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 279:4127-4135.
- KUDIN AP, DEBSKA-VIELHABER G, KUNZ WS (2005) Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 59:163-168.
- KUMAGAI H, KATOH S, HIROSAWA K, KIMURA M, HISHIDA A, IKEGAYA N (2002) Renal tubulointerstitial injury in weanling rats with hyperhomocysteinemia. *Kidney international* 62:1219-1228.
- KUSHNAREVA Y, MURPHY AN, ANDREYEV A (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *The Biochemical journal* 368:545-553.

- KWABI-ADDO B, CHUNG W, SHEN L, ITTMANN M, WHEELER T, JELINEK J, ISSA JP (2007) Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13:3796-3802.
- LAGOUGE M, ARGMANN C, GERHART-HINES Z, MEZIANE H, LERIN C, DAUSSIN F, MESSADEQ N, MILNE J, LAMBERT P, ELLIOTT P, GENY B, LAAKSO M, PUIGSERVER P, AUWERX J (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109-1122.
- LAI L, YAN L, GAO S, HU CL, GE H, DAVIDOW A, PARK M, BRAVO C, IWATSUBO K, ISHIKAWA Y, AUWERX J, SINCLAIR DA, VATNER SF, VATNER DE (2013) Type 5 Adenylyl Cyclase Increases Oxidative Stress by Transcriptional Regulation of Manganese Superoxide Dismutase via the SIRT1/FoxO3a Pathway. *Circulation* 127:1692-1701.
- LAKATTA EG (1993) Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiological reviews* 73:413-467.
- LAMBERT AJ, PORTERO-OTIN M, PAMPLONA R, MERRY BJ (2004) Effect of ageing and caloric restriction on specific markers of protein oxidative damage and membrane peroxidizability in rat liver mitochondria. *Mechanisms of ageing and development* 125:529-538.
- LAMBERT AJ, BOYSEN HM, BUCKINGHAM JA, YANG T, PODLUTSKY A, AUSTAD SN, KUNZ TH, BUFFENSTEIN R, BRAND MD (2007) Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging cell* 6:607-618.
- LAMBERT AJ, BUCKINGHAM JA, BOYSEN HM, BRAND MD (2010) Low complex I content explains the low hydrogen peroxide production rate of heart mitochondria from the long-lived pigeon, *Columba livia*. *Aging cell* 9:78-91.
- LATORRE A, MOYA A, AYALA FJ (1986) Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:8649-8653.
- LEBEL CP, BONDY SC (1991) Persistent protein damage despite reduced oxygen radical formation in the aging rat brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 9:139-146.
- LEE HC, WEI YH (2012) Mitochondria and aging. *Advances in experimental medicine and biology* 942:311-327.
- LENAZ G, FATO R, GENOVA ML, BERGAMINI C, BIANCHI C, BIONDI A (2006) Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochimica et biophysica acta* 1757:1406-1420.
- LENAZ G, GENOVA ML (2010) Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxidants & redox signaling* 12:961-1008.
- LENAZ G (2012) Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Advances in experimental medicine and biology* 942:93-136.
- LENAZ G, GENOVA ML (2012) Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation. *Advances in experimental medicine and biology* 748:107-144.
- LETO S, KOKKONEN GC, BARROWS CH, JR. (1976) Dietary protein, life-span, and biochemical variables in female mice. *Journal of gerontology* 31:144-148.
- LEVI B, WERMAN MJ (2001) Fructose triggers DNA modification and damage in an *Escherichia coli* plasmid. *The Journal of nutritional biochemistry* 12:235-241.
- LIM DH, HAN JY, KIM JR, LEE YS, KIM HY (2012) Methionine sulfoxide reductase B in the endoplasmic reticulum is critical for stress resistance and aging in *Drosophila*. *Biochemical and biophysical research communications* 419:20-26.
- LIN SJ, DEFOSSEZ PA, GUARENTE L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289:2126-2128.

- LIN SJ, KAEBERLEIN M, ANDALIS AA, STURTZ LA, DEFOSSEZ PA, CULOTTA VC, FINK GR, GUARENTE L (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418:344-348.
- LOFT S, POULSEN HE (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *Journal of molecular medicine* 74:297-312.
- LOPEZ-LLUCH G, IRUSTA PM, NAVAS P, DE CABO R (2008) Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Experimental gerontology* 43:813-819.
- LOPEZ-TORRES M, ROMERO M, BARJA G (2000) Effect of thyroid hormones on mitochondrial oxygen free radical production and DNA oxidative damage in the rat heart. *Molecular and cellular endocrinology* 168:127-134.
- LOPEZ-TORRES M, GREDILLA R, SANZ A, BARJA G (2002) Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free radical biology & medicine* 32:882-889.
- LOPEZ-TORRES M, BARJA G (2008) Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction possible implications for humans. *Biochimica et biophysica acta* 1780:1337-1347.
- LORENZINI A, TRESINI M, MAWAL-DEWAN M, FRISONI L, ZHANG H, ALLEN RG, SELL C, CRISTOFALO VJ (2002) Role of the Raf/MEK/ERK and the PI3K/Akt(PKB) pathways in fibroblast senescence. *Experimental gerontology* 37:1149-1156.
- LOSCHEN G, FLOHE L, CHANCE B (1971) Respiratory chain linked H(2)O(2) production in pigeon heart mitochondria. *FEBS letters* 18:261-264.
- LOUGH AN, ROARK LM, KATO A, REAM TS, LAMB JC, BIRCHLER JA, NEWTON KJ (2008) Mitochondrial DNA transfer to the nucleus generates extensive insertion site variation in maize. *Genetics* 178:47-55.
- MADDINENI S, NICHENAMETLA S, SINHA R, WILSON R, RICHIE P (2013) Methionine restriction affects oxidative stress and glutathione-related redox pathways in the rat. *Experimental Biology and Medicine* 238:392-399.
- MADSEN MA, HSIEH CC, BOYLSTON WH, FLURKEY K, HARRISON D, PAPACONSTANTINO J (2004) Altered oxidative stress response of the long-lived Snell dwarf mouse. *Biochemical and biophysical research communications* 318:998-1005.
- MAEGAWA S, HINKAL G, KIM HS, SHEN L, ZHANG L, ZHANG J, ZHANG N, LIANG S, DONEHOWER LA, ISSA JP (2010) Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome research* 20:332-340.
- MAIR W, DILLIN A (2008) Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annual review of biochemistry* 77:727-754.
- MALIK Q, HERBERT KE (2012) Oxidative and non-oxidative DNA damage and cardiovascular disease. *Free radical research* 46:554-564.
- MALLOY VL, KRAJCIK RA, BAILEY SJ, HRISTOPOULOS G, PLUMMER JD, ORENTREICH N (2006) Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging cell* 5:305-314.
- MANGANO DT, LAYUG EL, WALLACE A, TATEO I (1996) Effect of atenolol on mortality and cardiovascular morbidity after noncardiac surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *The New England journal of medicine* 335:1713-1720.
- MANSOURI A, MULLER FL, LIU Y, NG R, FAULKNER J, HAMILTON M, RICHARDSON A, HUANG TT, EPSTEIN CJ, VAN REMMEN H (2006) Alterations in mitochondrial function, hydrogen peroxide release and oxidative damage in mouse hind-limb skeletal muscle during aging. *Mechanisms of ageing and development* 127:298-306.
- MARESCA B, COSSINS AR (1993) Cell physiology. Fatty feedback and fluidity. *Nature* 365:606-607.
- MARGULIS L (1970) Recombination of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas*: assortment of mitochondria and chloroplasts? *Journal of theoretical biology* 26:337-342.
- MARNETT LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research* 424:83-95.

- MARNETT LJ, PLASTARAS JP (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends in genetics* : TIG 17:214-221.
- MARTIN-MONTALVO A, CABO RD (2012) Mitochondrial Metabolic Reprogramming Induced by Calorie Restriction. *Antioxidants & redox signaling*.
- MARTIN B, MATTSON MP, MAUDSLEY S (2006) Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. *Ageing research reviews* 5:332-353.
- MARTIN B, JI S, MAUDSLEY S, MATTSON MP (2010) "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: why it matters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:6127-6133.
- MARTIN W (2003) Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:8612-8614.
- MARTINOV MV, VITVITSKY VM, BANERJEE R, ATAULLAKHANOV FI (2010) The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochimica et biophysica acta* 1804:89-96.
- MATTISON JA, ROTH GS, BEASLEY TM, TILMONT EM, HANDY AM, HERBERT RL, LONGO DL, ALLISON DB, YOUNG JE, BRYANT M, BARNARD D, WARD WF, QI W, INGRAM DK, DE CABO R (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489:318-321.
- MATTSON MP (2002) Brain evolution and lifespan regulation: conservation of signal transduction pathways that regulate energy metabolism. *Mechanisms of ageing and development* 123:947-953.
- MCCAY CM, CROWELL MF, MAYNARD LA (1935) The effect of retarded growth upon the length of the life-span and ultimate body size. *J Nutr* 10:63-79.
- MCCORD JM, FRIDOVICH I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* 244:6049-6055.
- MCCUBREY JA, STEELMAN LS, FRANKLIN RA, ABRAMS SL, CHAPPELL WH, WONG EW, LEHMANN BD, TERRIAN DM, BASECKE J, STIVALA F, LIBRA M, EVANGELISTI C, MARTELLI AM (2007) Targeting the RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT and p53 pathways in hematopoietic drug resistance. *Advances in enzyme regulation* 47:64-103.
- MCKIERNAN SH, COLMAN RJ, AIKEN E, EVANS TD, BEASLEY TM, AIKEN JM, WEINDRUCH R, ANDERSON RM (2012) Cellular adaptation contributes to calorie restriction-induced preservation of skeletal muscle in aged rhesus monkeys. *Experimental gerontology* 47:229-236.
- MEANA JJ, GARCIA-SEVILLA JA (2003) Fármacos que modifican la actividad simpática. In: *Farmacología Humana* (Florez, J., ed), pp 281-295.
- MERESCHKOWSKY C (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche [On the nature and origin of chromatophores (plastids) in the plant kingdom]. *Biol Centralbl* 25:593-604.
- MEYER TE, KOVACS SJ, EHSANI AA, KLEIN S, HOLLOSZY JO, FONTANA L (2006) Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *Journal of the American College of Cardiology* 47:398-402.
- MICHIKAWA Y, MAZZUCHELLI F, BRESOLIN N, SCARLATO G, ATTARDI G (1999) Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 286:774-779.
- MILAGRO FI, CAMPION J, CORDERO P, GOYENECHEA E, GOMEZ-URIZ AM, ABETE I, ZULET MA, MARTINEZ JA (2011) A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25:1378-1389.
- MILNE B, HONG M (2004) Increasing longevity by decreasing sympathetic stress--early beta receptor blockade pharmacotherapy. *Medical hypotheses* 62:755-758.
- MILLER RA, HARPER JM, DYSKO RC, DURKEE SJ, AUSTAD SN (2002a) Longer life spans and delayed maturation in wild-derived mice. *Experimental biology and medicine* 227:500-508.

- MILLER RA, CHANG Y, GALECKI AT, AL-REGAIEY K, KOPCHICK JJ, BARTKE A (2002b) Gene expression patterns in calorically restricted mice: partial overlap with long-lived mutant mice. *Molecular endocrinology* 16:2657-2666.
- MILLER RA, BUEHNER G, CHANG Y, HARPER JM, SIGLER R, SMITH-WHEELOCK M (2005) Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging cell* 4:119-125.
- MIN KJ, TATAR M (2006) Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of ageing and development* 127:643-646.
- MIQUEL J, ECONOMOS AC, FLEMING J, JOHNSON JE, JR. (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Experimental gerontology* 15:575-591.
- MITCHELL P (1975) Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS letters* 56:1-6.
- MITCHELL TW, BUFFENSTEIN R, HULBERT AJ (2007) Membrane phospholipid composition may contribute to exceptional longevity of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): a comparative study using shotgun lipidomics. *Experimental gerontology* 42:1053-1062.
- MIYAMURA Y, TAWA R, KOIZUMI A, UEHARA Y, KURISHITA A, SAKURAI H, KAMIYAMA S, ONO T (1993) Effects of energy restriction on age-associated changes of DNA methylation in mouse liver. *Mutation research* 295:63-69.
- MOBBS CV, BRAY GA, ATKINSON RL, BARTKE A, FINCH CE, MARATOS-FLIER E, CRAWLEY JN, NELSON JF (2001) Neuroendocrine and pharmacological manipulations to assess how caloric restriction increases life span. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 56 Spec No 1:34-44.
- MOGHADDAS S, HOPPEL CL, LESNEFSKY EJ (2003) Aging defect at the QO site of complex III augments oxyradical production in rat heart interfibrillar mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* 414:59-66.
- MONNIER VM (2003) Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Archives of biochemistry and biophysics* 419:1-15.
- MOOSMANN B, BEHL C (2008) Mitochondrially encoded cysteine predicts animal lifespan. *Aging cell* 7:32-46.
- MORI N, HIRAYAMA K (2000) Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. *J Nutr* 130:2349-2355.
- MORIYA M (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:1122-1126.
- MOSKOVITZ J, BAR-NOY S, WILLIAMS WM, REQUENA J, BERLETT BS, STADTMAN ER (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:12920-12925.
- MOUCHIROUD L, MOLIN L, DALLIERE N, SOLARI F (2010) Life span extension by resveratrol, rapamycin, and metformin: The promise of dietary restriction mimetics for a healthy aging. *BioFactors* 36:377-382.
- MULLER F (2000) The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: its relevance to aging. *Age* 23:227-253.
- MULLER FL, LIU Y, VAN REMMEN H (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry* 279:49064-49073.
- MULLER FL, LUSTGARTEN MS, JANG Y, RICHARDSON A, VAN REMMEN H (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free radical biology & medicine* 43:477-503.
- MULLER FL, LIU Y, ABDUL-GHANI MA, LUSTGARTEN MS, BHATTACHARYA A, JANG YC, VAN REMMEN H (2008) High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring

- on both complex I- and complex II-linked substrates. *The Biochemical journal* 409:491-499.
- MUNRO D, BLIER PU (2012) The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging cell* 11:845-855.
- MUNSCHER C, RIEGER T, MULLER-HOCKER J, KADENBACH B (1993) The point mutation of mitochondrial DNA characteristic for MERRF disease is found also in healthy people of different ages. *FEBS letters* 317:27-30.
- MURGATROYD C, SPENGLER D (2012) Genetic variation in the epigenetic machinery and mental health. *Current psychiatry reports* 14:138-149.
- MURPHY MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* 417:1-13.
- MURRAY J, TAYLOR SW, ZHANG B, GHOSH SS, CAPALDI RA (2003) Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry* 278:37223-37230.
- NAKAGAWA T, GUARENTE L (2009) Urea cycle regulation by mitochondrial sirtuin, SIRT5. *Aging (Albany NY)* 1:578-581.
- NAKAGAWA T, LOMB DJ, HAIGIS MC, GUARENTE L (2009) SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* 137:560-570.
- NAKAMURA MT, NARA TY (2002) Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochemical Society transactions* 30:1076-1079.
- NAKAMURA MT, CHEON Y, LI Y, NARA TY (2004) Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids* 39:1077-1083.
- NAUDI A, CARO P, JOVE M, GOMEZ J, BOADA J, AYALA V, PORTERO-OTIN M, BARJA G, PAMPLONA R (2007) Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation research* 10:473-484.
- NAUDI A, JOVE M, CACABELOS D, AYALA V, CABRE R, CARO P, GOMEZ J, PORTERO-OTIN M, BARJA G, PAMPLONA R (2013) Formation of S-(carboxymethyl)-cysteine in rat liver mitochondrial proteins: effects of caloric and methionine restriction. *Amino acids* 44:361-371.
- NICOLETTI VG, MARINO VM, CUPPARI C, LICCIARDELLO D, PATTI D, PURRELLO VS, STELLA AM (2005) Effect of antioxidant diets on mitochondrial gene expression in rat brain during aging. *Neurochemical research* 30:737-752.
- NICHOLLS D (2002) Mitochondrial bioenergetics, aging, and aging-related disease. *Science of aging knowledge environment* : SAGE KE 2002:pe12.
- NISOLI E, TONELLO C, CARDILE A, COZZI V, BRACALE R, TEDESCO L, FALCONE S, VALERIO A, CANTONI O, CLEMENTI E, MONCADA S, CARRUBA MO (2005) Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310:314-317.
- NYSTROM T (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO journal* 24:1311-1317.
- OKUMURA S, SUZUKI S, ISHIKAWA Y (2009) New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: effects of targeted disruption of the type 5 adenylyl cyclase gene. *Journal of pharmacological sciences* 109:354-359.
- OLOVNIKOV AM (1971) [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Doklady Akademii nauk SSSR* 201:1496-1499.
- OMODEI D, FONTANA L (2011) Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS letters* 585:1537-1542.
- ONKEN B, DRISCOLL M (2010) Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PloS one* 5:e8758.
- ORENTREICH N, MATIAS JR, DEFELICE A, ZIMMERMAN JA (1993) Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr* 123:269-274.

- ORGEL LE (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 49:517-521.
- PAGE MM, STUART JA (2012) Activities of DNA base excision repair enzymes in liver and brain correlate with body mass, but not lifespan. *Age (Dordr)* 34:1195-1209.
- PALMISANO G, SARDANELLI AM, SIGNORILE A, PAPA S, LARSEN MR (2007) The phosphorylation pattern of bovine heart complex I subunits. *Proteomics* 7:1575-1583.
- PAMPLONA R, PRAT J, CADENAS S, ROJAS C, PEREZ-CAMPO R, LOPEZ TORRES M, BARJA G (1996) Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mechanisms of ageing and development* 86:53-66.
- PAMPLONA R, REQUENA JR, PORTERO-OTIN M, PRAT J, THORPE SR, BELLMUNT MJ (1998a) Carboxymethylated phosphatidylethanolamine in mitochondrial membranes of mammals--evidence for intracellular lipid glycoxidation. *European journal of biochemistry / FEBS* 255:685-689.
- PAMPLONA R, PORTERO-OTIN M, RIBA D, RUIZ C, PRAT J, BELLMUNT MJ, BARJA G (1998b) Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *Journal of lipid research* 39:1989-1994.
- PAMPLONA R, PORTERO-OTIN M, REQUENA JR, THORPE SR, HERRERO A, BARJA G (1999a) 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. *Mechanisms of ageing and development* 106:283-296.
- PAMPLONA R, PORTERO-OTIN M, RIBA D, LEDO F, GREDILLA R, HERRERO A, BARJA G (1999b) Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the canary and the parakeet than in the mouse. *Aging* 11:44-49.
- PAMPLONA R, PORTERO-OTIN M, RIBA D, REQUENA JR, THORPE SR, LOPEZ-TORRES M, BARJA G (2000) Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 55:B286-291.
- PAMPLONA R, PORTERO-OTIN M, BELLMUN MJ, GREDILLA R, BARJA G (2002a) Aging increases Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and caloric restriction decreases Nepsilon-(carboxyethyl)lysine and Nepsilon-(malondialdehyde)lysine in rat heart mitochondrial proteins. *Free radical research* 36:47-54.
- PAMPLONA R, PORTERO-OTIN M, REQUENA J, GREDILLA R, BARJA G (2002b) Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls. *Mechanisms of ageing and development* 123:1437-1446.
- PAMPLONA R, BARJA G, PORTERO-OTIN M (2002c) Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Annals of the New York Academy of Sciences* 959:475-490.
- PAMPLONA R, PORTERO-OTIN M, SANZ A, REQUENA J, BARJA G (2004) Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Experimental gerontology* 39:725-733.
- PAMPLONA R, PORTERO-OTIN M, SANZ A, AYALA V, VASILEVA E, BARJA G (2005) Protein and lipid oxidative damage and complex I content are lower in the brain of budgerigar and canaries than in mice. Relation to aging rate. *Age (Dordr)* 27:267-280.
- PAMPLONA R, BARJA G (2006) Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochimica et biophysica acta* 1757:496-508.
- PAMPLONA R, BARJA G (2007) Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing research reviews* 6:189-210.

- PAMPLONA R (2011) Advanced lipoxidation end-products. *Chemico-biological interactions* 192:14-20.
- PAMPLONA R, BARJA G (2011) An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology* 12:409-435.
- PAMPLONA R, COSTANTINI D (2011) Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 301:R843-863.
- PAPA S, MARTINO PL, CAPITANIO G, GABALLO A, DE RASMO D, SIGNORILE A, PETRUZZELLA V (2012) The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Advances in experimental medicine and biology* 942:3-37.
- PARK CM, CHO CW, ROSENFELD ME, SONG YS (2008) Methionine supplementation accelerates oxidative stress and nuclear factor kappaB activation in livers of C57BL/6 mice. *Journal of medicinal food* 11:667-674.
- PARRELLA E, MAXIM T, MAIALETTI F, ZHANG L, WAN J, WEI M, COHEN P, FONTANA L, LONGO VD (2013) Protein restriction cycles reduce IGF-1 and phosphorylated Tau, and improve behavioral performance in an Alzheimer's disease mouse model. *Aging cell* 12:257-268.
- PATRUSHEV M, KASYMOV V, PATRUSHEVA V, USHAKOVA T, GOGVADZE V, GAZIEV A (2004) Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61:3100-3103.
- PAWLIKOWSKA L, HU D, HUNTSMAN S, SUNG A, CHU C, CHEN J, JOYNER AH, SCHORK NJ, HSUEH WC, REINER AP, PSATY BM, ATZMON G, BARZILAI N, CUMMINGS SR, BROWNER WS, KWOK PY, ZIV E, STUDY OF OSTEOPOROTIC F (2009) Association of common genetic variation in the insulin/IGF1 signaling pathway with human longevity. *Aging cell* 8:460-472.
- PEARL R (1928) *The rate of living: being an account of some experimental studies on the biology of life duration*: A.A. Knopf.
- PEARSON KJ, BAUR JA, LEWIS KN, PESHKIN L, PRICE NL, LABINSKY N, SWINDELL WR, KAMARA D, MINOR RK, PEREZ E, JAMIESON HA, ZHANG Y, DUNN SR, SHARMA K, PLESHKO N, WOOLLETT LA, CSISZAR A, IKENO Y, LE COUTEUR D, ELLIOTT PJ, BECKER KG, NAVAS P, INGRAM DK, WOLF NS, UNGVARI Z, SINCLAIR DA, DE CABO R (2008) Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell metabolism* 8:157-168.
- PEREZ-CAMPO R, LOPEZ-TORRES M, CADENAS S, ROJAS C, BARJA G (1998) The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *Journal of comparative physiology B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 168:149-158.
- PERRONE CE, MATTOCKS DA, JARVIS-MORAR M, PLUMMER JD, ORENTREICH N (2010) Methionine restriction effects on mitochondrial biogenesis and aerobic capacity in white adipose tissue, liver, and skeletal muscle of F344 rats. *Metabolism: clinical and experimental* 59:1000-1011.
- PERRONE CE, MALLOY VL, ORENTREICH DS, ORENTREICH N (2012a) Metabolic adaptations to methionine restriction that benefit health and lifespan in rodents. *Experimental gerontology*.
- PERRONE CE, MATTOCKS DA, PLUMMER JD, CHITTUR SV, MOHNEY R, VIGNOLA K, ORENTREICH DS, ORENTREICH N (2012b) Genomic and metabolic responses to methionine-restricted and methionine-restricted, cysteine-supplemented diets in Fischer 344 rat inguinal adipose tissue, liver and quadriceps muscle. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics* 5:132-157.
- PETTI AA, CRUTCHFIELD CA, RABINOWITZ JD, BOTSTEIN D (2011) Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:E1089-1098.

- PIPER MD, PARTRIDGE L, RAUBENHEIMER D, SIMPSON SJ (2011) Dietary restriction and aging: a unifying perspective. *Cell metabolism* 14:154-160.
- POLSTER BM (2013) AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: a "complex" problem. *Neurochemistry international* 62:695-702.
- PORTER AG, URBANO AG (2006) Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 28:834-843.
- PORTERO-OTIN M, BELLMUNT MJ, RUIZ MC, BARJA G, PAMPLONA R (2001) Correlation of fatty acid unsaturation of the major liver mitochondrial phospholipid classes in mammals to their maximum life span potential. *Lipids* 36:491-498.
- PORTERO-OTIN M, REQUENA JR, BELLMUNT MJ, AYALA V, PAMPLONA R (2004) Protein nonenzymatic modifications and proteasome activity in skeletal muscle from the short-lived rat and long-lived pigeon. *Experimental gerontology* 39:1527-1535.
- PUCA AA, ANDREW P, NOVELLI V, ANSEMI CV, SOMALVICO F, CIRILLO NA, CHATGILIALOGLU C, FERRERI C (2008) Fatty acid profile of erythrocyte membranes as possible biomarker of longevity. *Rejuvenation research* 11:63-72.
- PUIGSERVER P, WU Z, PARK CW, GRAVES R, WRIGHT M, SPIEGELMAN BM (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92:829-839.
- RAHA S, ROBINSON BH (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in biochemical sciences* 25:502-508.
- RAHA S, MYINT AT, JOHNSTONE L, ROBINSON BH (2002) Control of oxygen free radical formation from mitochondrial complex I: roles for protein kinase A and pyruvate dehydrogenase kinase. *Free radical biology & medicine* 32:421-430.
- RAO AM, DRAKE MR, STIPANUK MH (1990) Role of the transsulfuration pathway and of gamma-cystathionase activity in the formation of cysteine and sulfate from methionine in rat hepatocytes. *J Nutr* 120:837-845.
- REFSGAARD HH, TSAI L, STADTMAN ER (2000) Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:611-616.
- REHSIA NS, DHALLA NS (2010) Mechanisms of the beneficial effects of beta-adrenoceptor antagonists in congestive heart failure. *Experimental and clinical cardiology* 15:e86-95.
- REMONDINO A, KWON SH, COMMUNAL C, PIMENTEL DR, SAWYER DB, SINGH K, COLUCCI WS (2003) Beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of the mitochondrial pathway. *Circulation research* 92:136-138.
- RICH PR, MARECHAL A (2010) The mitochondrial respiratory chain. *Essays in biochemistry* 47:1-23.
- RICHARDSON B (2003) Impact of aging on DNA methylation. *Ageing research reviews* 2:245-261.
- RICHIE JP, JR., LEUTZINGER Y, PARTHASARATHY S, MALLOY V, ORENTREICH N, ZIMMERMAN JA (1994) Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8:1302-1307.
- RICHTER C (1987) Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chemistry and physics of lipids* 44:175-189.
- RICHTER C (1988) Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS letters* 241:1-5.
- RICHTER C, SUTER M, WALTER PB (1998) Mitochondrial free radical damage and DNA repair. *BioFactors* 7:207-208.
- ROGINA B, HELFAND SL (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15998-16003.
- ROSS MH (1961) Length of life and nutrition in the rat. *J Nutr* 75:197-210.

- ROSS MH (1976) Nutrition and longevity in experimental animals. *Current concepts in nutrition* 4:43-57.
- RUAN H, TANG XD, CHEN ML, JOINER ML, SUN G, BROTH N, WEISSBACH H, HEINEMANN SH, IVERSON L, WU CF, HOSHI T (2002) High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:2748-2753.
- RUBIO AR, MORALES-SEGURA MA (2004) Nitric oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: far beyond vessel tone control. *Archives of medical research* 35:1-11.
- RUBNER M (1908) *Das Problem der Lebensdauer und seine Beziehungen zu Wachstum und Ernährung*. R. Oldenburg, Ed., Munchen.
- RUIZ MC, AYALA V, PORTERO-OTIN M, REQUENA JR, BARJA G, PAMPLONA R (2005) Protein methionine content and MDA-lysine adducts are inversely related to maximum life span in the heart of mammals. *Mechanisms of ageing and development* 126:1106-1114.
- SANCHEZ-ROMAN I, BARJA G (2013) Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: Role of methionine restriction. *Experimental gerontology*.
- SANZ A, BARTKE A, BARJA G (2002) Long-lived Ames dwarf mice: Oxidative damage to mitochondrial DNA in heart and brain. *Journal of the American Aging Association* 25:119-122.
- SANZ A, CARO P, BARJA G (2004) Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 36:545-552.
- SANZ A, CARO P, IBANEZ J, GOMEZ J, GREDILLA R, BARJA G (2005a) Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 37:83-90.
- SANZ A, GREDILLA R, PAMPLONA R, PORTERO-OTIN M, VARA E, TRESGUERRES JA, BARJA G (2005b) Effect of insulin and growth hormone on rat heart and liver oxidative stress in control and caloric restricted animals. *Biogerontology* 6:15-26.
- SANZ A, PAMPLONA R, BARJA G (2006a) Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxidants & redox signaling* 8:582-599.
- SANZ A, CARO P, SANCHEZ JG, BARJA G (2006b) Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067:200-209.
- SANZ A, GOMEZ J, CARO P, BARJA G (2006c) Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 38:327-333.
- SANZ A, CARO P, AYALA V, PORTERO-OTIN M, PAMPLONA R, BARJA G (2006d) Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20:1064-1073.
- SANZ A, SOIKKELI M, PORTERO-OTIN M, WILSON A, KEMPPAINEN E, MCILROY G, ELLILA S, KEMPPAINEN KK, TUOMELA T, LAKANMAA M, KIVIRANTA E, STEFANATOS R, DUFOUR E, HUTZ B, NAUDI A, JOVE M, ZEB A, VARTIAINEN S, MATSUNO-YAGI A, YAGI T, RUSTIN P, PAMPLONA R, JACOBS HT (2010) Expression of the yeast NADH dehydrogenase Ndi1 in *Drosophila* confers increased lifespan independently of dietary restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:9105-9110.
- SATO A, HUANG MZ, WATANABE S, OKUYAMA H, NAKAMOTO H, RADAK Z, GOTO S (1998) Protein carbonyl content roughly reflects the unsaturation of lipids in muscle but not in other tissues of stroke-prone spontaneously hypertensive strain (SHRSP) rats fed different fats and oils. *Biological & pharmaceutical bulletin* 21:1271-1276.
- SAZANOV LA, HINCHLIFFE P (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* 311:1430-1436.

- SCIALO F, MALLIKARJUN V, STEFANATOS R, SANZ A (2012) Regulation of Lifespan by the Mitochondrial Electron Transport Chain: Reactive Oxygen Species-Dependent and Reactive Oxygen Species-Independent Mechanisms. *Antioxidants & redox signaling*.
- SCHAFFER E, DENCHER NA, VONCK J, PARCEJ DN (2007) Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I1III2IV1 from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 46:12579-12585.
- SELMAN C, LINGARD S, CHOUDHURY AI, BATTERHAM RL, CLARET M, CLEMENTS M, RAMADANI F, OKKENHAUG K, SCHUSTER E, BLANC E, PIPER MD, AL-QASSAB H, SPEAKMAN JR, CARMIGNAC D, ROBINSON IC, THORNTON JM, GEMS D, PARTRIDGE L, WITHERS DJ (2008) Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:807-818.
- SELMAN C, TULLET JM, WIESER D, IRVINE E, LINGARD SJ, CHOUDHURY AI, CLARET M, AL-QASSAB H, CARMIGNAC D, RAMADANI F, WOODS A, ROBINSON IC, SCHUSTER E, BATTERHAM RL, KOZMA SC, THOMAS G, CARLING D, OKKENHAUG K, THORNTON JM, PARTRIDGE L, GEMS D, WITHERS DJ (2009) Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science* 326:140-144.
- SELMAN C, WITHERS DJ (2011) Mammalian models of extended healthy lifespan. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 366:99-107.
- SELL DR, LANE MA, JOHNSON WA, MASORO EJ, MOCK OB, REISER KM, FOGARTY JF, CUTLER RG, INGRAM DK, ROTH GS, MONNIER VM (1996) Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:485-490.
- SEVRIUKOVA IF (2011) Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxidants & redox signaling* 14:2545-2579.
- SHAY JW, WERBIN H (1992) New evidence for the insertion of mitochondrial DNA into the human genome: significance for cancer and aging. *Mutation research* 275:227-235.
- SHERMAN PW, JARVIS JUM (2002) Extraordinary life spans of naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*). *Journal of Zoology (London)* 258:307-211.
- SHI Y, PULLIAM DA, LIU Y, HAMILTON RT, JERNIGAN AL, BHATTACHARYA A, SLOANE LB, QI W, CHAUDHURI A, BUFFENSTEIN R, UNGVARI Z, AUSTAD SN, VAN REMMEN H (2013) Reduced mitochondrial ROS, enhanced antioxidant defense, and distinct age-related changes in oxidative damage in muscles of long-lived *Peromyscus leucopus*. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 304:R343-355.
- SHIMOKAWA I, HIGAMI Y, YU BP, MASORO EJ, IKEDA T (1996) Influence of dietary components on occurrence of and mortality due to neoplasms in male F344 rats. *Aging* 8:254-262.
- SIMPSON SJ, RAUBENHEIMER D (2009) Macronutrient balance and lifespan. *Aging (Albany NY)* 1:875-880.
- SINGH K, XIAO L, REMONDINO A, SAWYER DB, COLUCCI WS (2001) Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Journal of cellular physiology* 189:257-265.
- SMITH DL, JR., ELAM CF, JR., MATTISON JA, LANE MA, ROTH GS, INGRAM DK, ALLISON DB (2010) Metformin supplementation and life span in Fischer-344 rats. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 65:468-474.
- SOHAL RS, SVENSSON I, SOHAL BH, BRUNK UT (1989) Superoxide anion radical production in different animal species. *Mechanisms of ageing and development* 49:129-135.
- SOHAL RS, SOHAL BH, BRUNK UT (1990) Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mechanisms of ageing and development* 53:217-227.
- SOHAL RS, KU HH, AGARWAL S, FORSTER MJ, LAL H (1994) Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mechanisms of ageing and development* 74:121-133.

- SOMEYA S, YU W, HALLOWS WC, XU J, VANN JM, LEEUWENBURGH C, TANOKURA M, DENU JM, PROLLA TA (2010) Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 143:802-812.
- SPASOJEVIC I, BOGDANOVIC PRISTOV J, VUJISIC L, SPASIC M (2012) The reaction of methionine with hydroxyl radical: reactive intermediates and methanethiol production. *Amino acids* 42:2439-2445.
- SPEAKMAN JR (2003) Oxidative phosphorylation, mitochondrial proton cycling, free-radical production and aging. *Advances in Cell Aging and Gerontology* 14:35-68.
- SPISELLER G (2010) Is lipid peroxidation of polyunsaturated acids the only source of free radicals that induce aging and age-related diseases? *Rejuvenation research* 13:91-103.
- SRIVASTAVA S, CHANDRASEKAR B, GU Y, LUO J, HAMID T, HILL BG, PRABHU SD (2007) Downregulation of CuZn-superoxide dismutase contributes to beta-adrenergic receptor-mediated oxidative stress in the heart. *Cardiovascular research* 74:445-455.
- ST-PIERRE J, BUCKINGHAM JA, ROEBUCK SJ, BRAND MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of biological chemistry* 277:44784-44790.
- STADTMAN ER, LEVINE RL (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids* 25:207-218.
- STADTMAN ER, MOSKOVITZ J, LEVINE RL (2003) Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxidants & redox signaling* 5:577-582.
- STADTMAN ER (2004) Cyclic oxidation and reduction of methionine residues of proteins in antioxidant defense and cellular regulation. *Archives of biochemistry and biophysics* 423:2-5.
- STADTMAN ER, VAN REMMEN H, RICHARDSON A, WEHR NB, LEVINE RL (2005) Methionine oxidation and aging. *Biochimica et biophysica acta* 1703:135-140.
- STANFEL MN, SHAMIEH LS, KAEBERLEIN M, KENNEDY BK (2009) The TOR pathway comes of age. *Biochimica et biophysica acta* 1790:1067-1074.
- STREHLER BL (1962) *Time, Cells, and Aging*: Academic Press.
- STUART JA, KARAHALIL B, HOGUE BA, SOUZA-PINTO NC, BOHR VA (2004) Mitochondrial and nuclear DNA base excision repair are affected differently by caloric restriction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:595-597.
- STUART JA, MAYARD S, HASHIGUCHI K, SOUZA-PINTO NC, BOHR VA (2005) Localization of mitochondrial DNA base excision repair to an inner membrane-associated particulate fraction. *Nucleic acids research* 33:3722-3732.
- SUH Y, ATZMON G, CHO MO, HWANG D, LIU B, LEAHY DJ, BARZILAI N, COHEN P (2008) Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:3438-3442.
- SUN C, ZHANG F, GE X, YAN T, CHEN X, SHI X, ZHAI Q (2007) SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell metabolism* 6:307-319.
- SUN L, SADIGHI AKHA AA, MILLER RA, HARPER JM (2009) Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 64:711-722.
- SUTER M, RICHTER C (1999) Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases. *Biochemistry* 38:459-464.
- SWYNGHEDAUW B, BESSE S, ASSAYAG P, CARRE F, CHEVALIER B, CHARLEMAGNE D, DELCAYRE C, HARDOUIN S, HEYMES C, MOALIC JM (1995) Molecular and cellular biology of the senescent hypertrophied and failing heart. *The American journal of cardiology* 76:2D-7D.
- SZILARD L (1959) On the Nature of the Aging Process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 45:30-45.

- TABNER BJ, TURNBULL S, KING JE, BENSON FE, EL-AGNAF OM, ALLSOP D (2006) A spectroscopic study of some of the peptidyl radicals formed following hydroxyl radical attack on beta-amyloid and alpha-synuclein. *Free radical research* 40:731-739.
- TAYLOR ER, HURRELL F, SHANNON RJ, LIN TK, HIRST J, MURPHY MP (2003) Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *The Journal of biological chemistry* 278:19603-19610.
- TAYLOR RP, STARNES JW (2003) Age, cell signalling and cardioprotection. *Acta physiologica Scandinavica* 178:107-116.
- THORPE SR, BAYNES JW (2003) Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino acids* 25:275-281.
- TISSENBAUM HA, GUARENTE L (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410:227-230.
- TORRES C, FRANCIS MK, LORENZINI A, TRESINI M, CRISTOFALO VJ (2003) Metabolic stabilization of MAP kinase phosphatase-2 in senescence of human fibroblasts. *Experimental cell research* 290:195-206.
- TROEN AM, LUTGENS E, SMITH DE, ROSENBERG IH, SELHUB J (2003) The atherogenic effect of excess methionine intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:15089-15094.
- TROEN AM, FRENCH EE, ROBERTS JF, SELHUB J, ORDOVAS JM, PARNELL LD, LAI CQ (2007) Lifespan modification by glucose and methionine in *Drosophila melanogaster* fed a chemically defined diet. *Age (Dordr)* 29:29-39.
- TSAI CW, LIN AH, WANG TS, LIU KL, CHEN HW, LII CK (2010) Methionine restriction up-regulates the expression of the pi class of glutathione S-transferase partially via the extracellular signal-regulated kinase-activator protein-1 signaling pathway initiated by glutathione depletion. *Molecular nutrition & food research* 54:841-850.
- TURRENS JF, ALEXANDRE A, LEHNINGER AL (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* 237:408-414.
- TURRENS JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552:335-344.
- TYLER DD (1992) The mitochondrion in health and disease: VCH.
- Ushijima K, Maekawa T, Ishikawa-Kobayashi E, Ando H, Shiga T, Fujimura A (2013) Influence of beta-blockers on the myocardial mRNA expressions of circadian clock- and metabolism-related genes. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH* 7:107-117.
- UTHUS EO, BROWN-BORG HM (2006) Methionine flux to transsulfuration is enhanced in the long living Ames dwarf mouse. *Mechanisms of ageing and development* 127:444-450.
- VAN HEEMST D, BEEKMAN M, MOOIJART SP, HEIJMANS BT, BRANDT BW, ZWAAN BJ, SLAGBOOM PE, WESTENDORP RG (2005) Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging cell* 4:79-85.
- VELLAI T, TAKACS-VELLAI K, ZHANG Y, KOVACS AL, OROSZ L, MULLER F (2003) Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426:620.
- VENDITTI P, DE ROSA R, DI MEO S (2003) Effect of thyroid state on H₂O₂ production by rat liver mitochondria. *Molecular and cellular endocrinology* 205:185-192.
- VENTURA B, GENOVA ML, BOVINA C, FORMIGGINI G, LENA Z G (2002) Control of oxidative phosphorylation by Complex I in rat liver mitochondria: implications for aging. *Biochimica et biophysica acta* 1553:249-260.
- VERDIN E, HIRSCHHEY MD, FINLEY LW, HAIGIS MC (2010) Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends in biochemical sciences* 35:669-675.
- VERZAR F (1968) Intrinsic and extrinsic factors of molecular ageing. *Experimental gerontology* 3:69-75.

- VISWANATHAN M, KIM SK, BERDICHEVSKY A, GUARENTE L (2005) A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Developmental cell* 9:605-615.
- VLISSARA H (2005) Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043:452-460.
- VOTYAKOVA TV, REYNOLDS IJ (2001) DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *Journal of neurochemistry* 79:266-277.
- WAKELING LA, IONS LJ, FORD D (2009) Could Sirt1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions? *Age (Dordr)* 31:327-341.
- WEINDRUCH R, NAYLOR PH, GOLDSTEIN AL, WALFORD RL (1988) Influences of aging and dietary restriction on serum thymosin alpha 1 levels in mice. *Journal of gerontology* 43:B40-42.
- WEINDRUCH R, KAYO T, LEE CK, PROLLA TA (2001) Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *J Nutr* 131:918S-923S.
- WEINDRUCH R (2003) Caloric restriction, gene expression, and aging. *Alzheimer disease and associated disorders* 17 Suppl 2:S58-59.
- WILLETTE AA, BENDLIN BB, COLMAN RJ, KASTMAN EK, FIELD AS, ALEXANDER AL, SRIDHARAN A, ALLISON DB, ANDERSON R, VOYTKO ML, KEMNITZ JW, WEINDRUCH RH, JOHNSON SC (2012) Calorie restriction reduces the influence of glucoregulatory dysfunction on regional brain volume in aged rhesus monkeys. *Diabetes* 61:1036-1042.
- WILLIAMS TD, CHAMBERS JB, ROBERTS LM, HENDERSON RP, OVERTON JM (2003) Diet-induced obesity and cardiovascular regulation in C57BL/6J mice. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 30:769-778.
- WINCZURA A, ZDZALIK D, TUDEK B (2012) Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *Free radical research* 46:442-459.
- WINSTON ML (1991) *The biology of the honey bee*: HARVARD University Press.
- WOLF E, KAHNT E, EHRLEIN J, HERMANN W, BREM G, WANKE R (1993) Effects of long-term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: lessons from transgenic animal models. *Mechanisms of ageing and development* 68:71-87.
- WOOD JG, ROGINA B, LAVU S, HOWITZ K, HELFAND SL, TATAR M, SINCLAIR D (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430:686-689.
- YADAVA N, POTLURI P, SCHEFFLER IE (2008) Investigations of the potential effects of phosphorylation of the MWFE and ESSS subunits on complex I activity and assembly. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40:447-460.
- YAGI T, MATSUNO-YAGI A (2003) The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry* 42:2266-2274.
- YAKES FM, VAN HOUTEN B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:514-519.
- YAN L, VATNER DE, O'CONNOR JP, IVESSA A, GE H, CHEN W, HIROTANI S, ISHIKAWA Y, SADOSHIMA J, VATNER SF (2007) Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell* 130:247-258.
- YAN L, PARK JY, DILLINGER JG, DE LORENZO MS, YUAN C, LAI L, WANG C, HO D, TIAN B, STANLEY WC, AUWERX J, VATNER DE, VATNER SF (2012) Common mechanisms for calorie restriction and adenylyl cyclase type 5 knockout models of longevity. *Aging cell* 11:1110-1120.
- YAN L, GAO S, HO D, PARK M, GE H, WANG C, TIAN Y, LAI L, DE LORENZO MS, VATNER DE, VATNER SF (2013) Calorie restriction can reverse, as well as prevent, aging cardiomyopathy. *Age (Dordr)*.

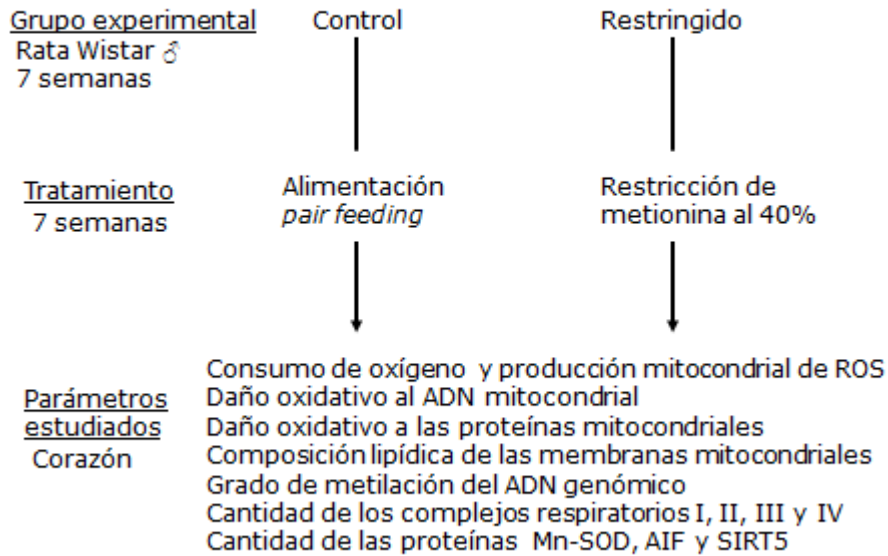
- YANG SY, HOY M, FULLER B, SALES KM, SEIFALIAN AM, WINSLET MC (2010) Pretreatment with insulin-like growth factor I protects skeletal muscle cells against oxidative damage via PI3K/Akt and ERK1/2 MAPK pathways. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 90:391-401.
- YU BP, MASORO EJ, MURATA I, BERTRAND HA, LYND FT (1982) Life span study of SPF Fischer 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease. *Journal of gerontology* 37:130-141.
- YU BP, MASORO EJ, MCMAHAN CA (1985) Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *Journal of gerontology* 40:657-670.
- YU CA, YU L, KING TE (1974) Soluble cytochrome b-c1 complex and the reconstitution of succinate-cytochrome c reductase. *The Journal of biological chemistry* 249:4905-4910.
- ZARA V, CONTE L, TRUMPOWER BL (2009) Evidence that the assembly of the yeast cytochrome bc1 complex involves the formation of a large core structure in the inner mitochondrial membrane. *The FEBS journal* 276:1900-1914.
- ZHEN X, URYU K, CAI G, JOHNSON GP, FRIEDMAN E (1999) Age-associated impairment in brain MAPK signal pathways and the effect of caloric restriction in Fischer 344 rats. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 54:B539-548.
- ZHOU G, MYERS R, LI Y, CHEN Y, SHEN X, FENYK-MELODY J, WU M, VENTRE J, DOEBBER T, FUJII N, MUSI N, HIRSHMAN MF, GOODYEAR LJ, MOLLER DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation* 108:1167-1174.
- ZICKERMANN V, DROSE S, TOCILESCU MA, ZWICKER K, KERSCHER S, BRANDT U (2008) Challenges in elucidating structure and mechanism of proton pumping NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of bioenergetics and biomembranes* 40:475-483.

ANEXOS

ANEXO I: DISEÑO EXPERIMENTAL

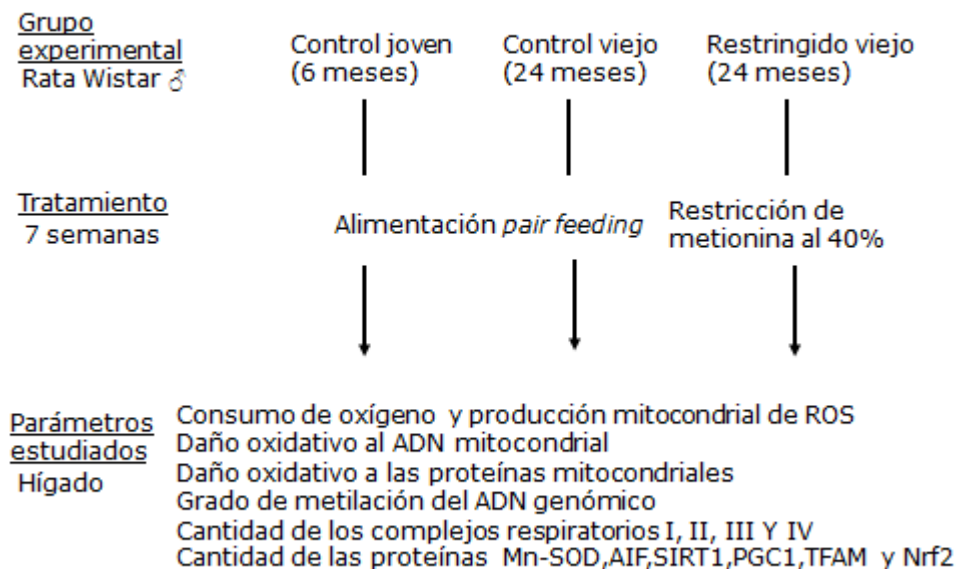
OBJETIVO 1

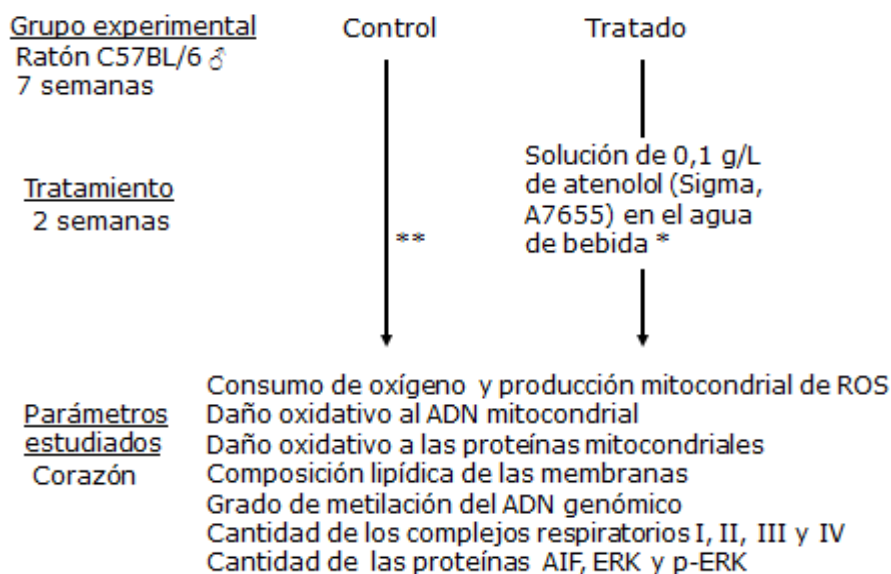
RESTRICCIÓN DE METIONINA AL 40% A CORTO PLAZO



OBJETIVO 2

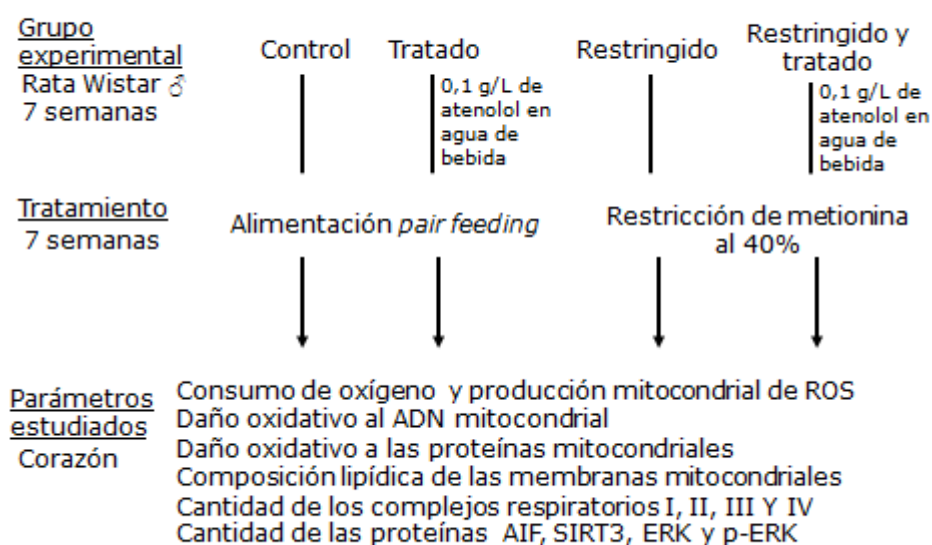
RESTRICCIÓN DE METIONINA Y ENVEJECIMIENTO



OBJETIVO 3**BLOQUEO DE LA SEÑALIZACIÓN β ADRENÉRGICA**

*= Estudios previos han demostrado que esta dosis de atenolol causa bloqueo de los receptores β 1-adrenérgicos (Williams et al., 2003)

**= Los animales tuvieron acceso libre al agua de bebida. La ingesta de agua y de comida por animal fue controlada diariamente.

OBJETIVO 4**RESTRICCIÓN DE METIONINA Y BLOQUEO DE LA SEÑALIZACIÓN β ADRENÉRGICA**

DIETAS EMPLEADAS

Salvo en el objetivo 3, en el que se empleó una dieta estándar para roedores (Panlab, Spain), las dietas utilizadas en el resto de experimentos fueron dietas semipurificadas, encargadas a MP Biochemicals (Irvine, CA) e importadas a España por Leti (Barcelona, Spain) (Tabla A1). Los animales controles fueron alimentados con una dieta semipurificada basada en la composición AIN-93G del Instituto de Nutrición de los Estados Unidos de América. La dieta que se proporcionó a los animales restringidos en metionina fue una modificación de la anterior, reduciéndose su contenido en metionina en un 40% (desde el 0,86% en los controles hasta el 0,516% en los animales restringidos). Esta disminución de la metionina se compensó con el incremento del resto de componentes en proporción directa a su abundancia en la dieta. Dado que la disminución de la metionina fue pequeña, con este procedimiento las cantidades ingeridas por día de todos los componentes de la dieta, excepto la metionina, fueron prácticamente idénticos en los animales controles y experimentales.

La ingesta se controló diariamente y los animales controles recibieron cada día la misma cantidad de alimento que los animales restringidos habían ingerido como media el día anterior (método *pair feeding*) dado que existen evidencias que demuestran que los roedores sometidos a RMet tienden a comer algo menos de lo normal (Richie et al., 1994; Miller et al., 2005). Este procedimiento asegura que ambos grupos experimentales consumen la misma cantidad de calorías y ayuda a minimizar el potencial problema del carácter probablemente subóptimo de los animales controles alimentados *ad libitum* (Martin et al., 2010).

Tabla A1: Composición detallada de las dietas semipurificadas empleadas en los objetivos 1, 2, y 4.

Componentes (g/100g)	Dieta Control	Dieta Restringida en metionina al 40%
L-arginina	1,12	1,124
L-lisina	1,44	1,445
L-histidina	0,33	0,331
L-leucina	1,11	1,114
L-isoleucina	0,82	0,823
L-valina	0,82	0,823
L-treonina	0,82	0,823
L-triptófano	0,18	0,181
L-metionina	0,86	0,516
Ácido L-glutámico	2,70	2,709
L-fenilalanina	1,16	1,164
L-glicina	2,33	2,338
Dextrina	5	5,017
Almidón de maíz	31,80	31,92
Sacarosa	31,79	31,92
Celulosa	5	5,017
Bitartrato de colina	0,2	0,201
Mezcla de vitaminas*	1,00 *(1,02)	1,003 *(1,023)
Mezcla de minerales	3,5	3,512
Aceite de maíz	8	8,028

*La dieta empleada en el objetivo 1 fue ligeramente diferente, conteniendo en la mezcla vitamínica una cantidad extra de 0,02 gramos de ácido ascórbico en cada dieta.

ANEXO II: RESUMEN DE LOS MÉTODOS EMPLEADOS

Aislamiento mitocondrial y consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas

Las mitocondrias se obtuvieron mediante distintos protocolos de centrifugación diferencial. En todos los trabajos recogidos en esta tesis se utilizaron mitocondrias funcionales. El grado de acoplamiento y funcionalidad mitocondrial se valoró mediante el índice de control respiratorio (RCI) que es la relación entre el consumo de oxígeno en estado 3 (fosforilación oxidativa) y en estado 4 (reposo). El consumo de oxígeno mitocondrial se valoró por polarografía con un electrodo tipo Clark.

Valoración de la producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno

La determinación de la tasa de producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno se realizó mediante el método fluorimétrico descrito por Barja en 2002, específico para el peróxido de hidrógeno que reacciona con el ácido homovanílico en presencia de peroxidasa de rábano y produce un dímero fluorescente (con excitación 312 nm, emisión 420 nm) (Barja, 2002). La adición de superóxido dismutasa en el medio de incubación permite transformar el superóxido producido por la cadena respiratoria en peróxido de hidrógeno, que es detectado en nuestro método.

Con el fin de localizar el complejo responsable de la producción de radicales libres y los mecanismos causantes de su modificación en cada caso, se utilizaron sustratos ligados al complejo I (glutamato/malato o piruvato/malato) y sustratos ligados al complejo II (succinato), así como distintos inhibidores específicos (rotenona en el caso del complejo I y Antimicina A en el complejo III).

El consumo de oxígeno y la producción de radicales libres se realizaron en las mismas condiciones, lo que permite el cálculo de la fuga de radicales libres, que es el porcentaje de electrones que escapan de la cadena respiratoria generando radicales libres en lugar de reducir el oxígeno a agua e indica el grado de eficiencia de la cadena respiratoria en transportar electrones para producir ATP minimizando la producción mitocondrial de ROS.

Valoración del estrés oxidativo: daño al ADN mitocondrial y a las proteínas mitocondriales

El estudio del daño oxidativo al ADN se realizó a partir del aislamiento del ADN mitocondrial según Latorre y colaboradores en 1986 (Latorre et al., 1986) adaptado a mamíferos (Asuncion et al., 1996) y la cuantificación de la 2'-deoxiguanosina y de su correspondiente base oxidada 8-hidroxi-7,8-2'-deoxiguanosina (8-oxodG) mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección ultravioleta y electroquímica-culométrica respectivamente (Loft y Poulsen, 1999). El daño oxidativo a proteínas se valoró mediante precipitación de las proteínas y posterior análisis por cromatografía de gases/espectrofotometría de masas (GC/MS) según Pamplona et al., (2000) y Requena et al., (2001). Se analizaron los siguientes marcadores específicos: Semialdehído glutámico (GSA) y Semialdehído aminoacético (ASA), marcadores de oxidación proteica; N^ε-(carboximetil)-lisina (CML) y N^ε-(carboxietil)-lisina (CEL), marcadores de daño glicooxidativo y N^ε-(malondialdehído)-lisina (MDAL), marcador, junto con CML de lipooxidación.

Composición lipídica de las membranas celulares y mitocondriales

La determinación de los ácidos grasos de las membranas se realizó de acuerdo a Pamplona et al., 1999a, mediante técnicas de cromatografía de gases/espectrofotometría de masas (GC/MS). Se valoraron los siguientes parámetros: Composición individual de los ácidos grasos; Porcentaje de ácidos grasos saturados (SFA); Porcentaje de ácidos grasos insaturados (UFA); Porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA); Porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA); Longitud media de cadena (ACL), calculada como: $[(\%Total14 \times 14) + (\%Total16 \times 16) + (\%Total18 \times 18) + (\%Total20 \times 20) + (\%Total22 \times 22) + (\%Total24 \times 24)]/100$. La densidad de dobles enlaces de la membrana fue calculada como el Índice de Dobles Enlaces, DBI= $[(1 \times \sum mol\% \text{ monoenoico}) + (2 \times \sum mol\% \text{ dienoico}) + (3 \times \sum mol\% \text{ trienoico}) + (4 \times \sum mol\% \text{ tetraenoico}) + (5 \times \sum mol\% \text{ pentaenoico}) + (6 \times \sum mol\% \text{ hexaenoico})]$. Finalmente, la susceptibilidad de la membrana a sufrir peroxidación se calculó como el Índice de Peroxidizabilidad, PI= $[(0.025 \times \sum mol\% \text{ monoenoico}) + (1 \times \sum mol\% \text{ dienoico}) + (2 \times \sum mol\% \text{ trienoico}) + (4 \times \sum mol\% \text{ tetraenoico}) + (6 \times \sum mol\% \text{ pentaenoico}) + (8 \times \sum mol\% \text{ hexaenoico})]$. La actividad de las enzimas elongasas y desaturasas se estimaron como

la relación entre el producto específico y el sustrato de cada enzima (Guillou et al., 2010); $\Delta 9(n-9) = 18:1n-9/18:0$; $\Delta 5(n-6) = 20:4n-6/20:3n-6$; $\Delta 6(n-3) = 24:6n-3/24:5n-3$; $\Delta 6(n-3) = 18:4n-3/18:3n-3$; $ELOVL5(n-6) = 20:2n-6/18:2n-6$; $ELOVL2 \ \& \ 5 = 22:4n-6/20:4n-6$; $ELOVL2 \ \& \ 5 = 22:5n-3/20:5n-3$, y $ELOVL2(n-3) = 24:5n-3/22:5n-3$. La oxidación β -peroxisómica se calculó mediante la relación entre $22:6n-3/24:6n-3$.

Grado de metilación del ADN genómico

El grado de metilación del ADN genómico fue cuantificado con un Kit Methylamp de cuantificación de metilación global del ADN (P-1014 Epigentek). La fracción metilada del ADN (expresada como % del total del ADN genómico) fue reconocida por un anticuerpo frente a 5-metilcitosina y cuantificado a través de una reacción tipo ELISA.

Cuantificación proteica

La cantidad de los complejos respiratorios y de proteínas implicadas en vías de señalización asociadas a la longevidad y a la biogénesis mitocondrial fue determinada por Western Blot mediante la utilización de anticuerpos monoclonales.

TITLE: Mitochondrial oxidative stress modulation through dietary methionine restriction or beta-adrenergic signaling blocking. Relation to longevity in rodents.

SUMMARY

INTRODUCTION

Understanding the mechanisms underlying the ageing process is one of the most relevant issues for the human being. Despite many theories of ageing have been proposed, The Mitochondrial Free Radical Theory of Aging is currently supported by different kind of experimental and comparative studies (Pamplona and Barja, 2011). According to this theory (Harman, 1972; Miquel et al., 1980), mitochondria, and particularly respiratory complexes I and III are important sources of reactive oxygen species (ROS) that can oxidatively damage many different kind of cellular macromolecules.

Comparative studies have identified two oxidative stress related factors that inversely correlate with longevity in mammals and birds: the intensity of mitochondrial ROS production and the fatty acid unsaturation degree (Pamplona and Barja, 2011). Long-lived animal species have low rates of mitochondrial ROS production at complex I and low levels of oxidative damage at their mitochondria. Interspecies comparisons also show that the specific compositional pattern of lipid cellular membranes in long-lived animal species gives them a high resistance to oxidative modification, which is obtained by decreasing the fatty acid unsaturation degree, the number of fatty acid double bonds (DBI, double bond index) (Pamplona et al., 2002; Hulbert et al., 2007).

In addition, experimental studies also connect longevity with oxidative stress related factors. Dietary Restriction, (DR) which extends longevity in many different organisms, also lowers the rate of mitochondrial ROS production at complex I and mitochondrial oxidative damage in many vital tissues (Gredilla and Barja, 2005). In order to look for the specific dietary component responsible for these beneficial effects during DR, different nutritional interventions have been performed. In agreement with their lack of effect on longevity, neither lipid restriction, nor carbohydrate restriction change oxidative stress related parameters. However, protein restriction (PR) and, specifically, 80% restriction of a single nutrient, the aminoacid methionine, increases longevity and decreases the rate of mitochondrial ROS

generation at complex I and the oxidative damage in rat heart and liver mitochondria (Lopez-Torres and Barja, 2008; Sanchez-Roman and Barja, 2013). However, 80% methionine restriction (MetR) and DR induce negative effects such as delays in puberty and decreases in growth rate and final body size.

In addition to dietary studies, it has been shown that genetic manipulations also might modulate ageing. Extension of life span in C57BL/6 mice has been obtained through the interruption of β -adrenergic receptor signaling at the level of type 5 isoform of adenylyl cyclase (AC) (Yan et al., 2007). In this animal model, knocking out AC5 (AC5 knockout [KO] mice) increases mean and maximum longevity, delays bone and heart deterioration and activates the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. Although a decrease in oxidative stress has been proposed as mediator, the mechanisms involved in life extension in this animal model have not been clarified.

For these reasons, the general aim of this thesis is to clarify the mechanisms by which dietary methionine restriction and beta-adrenergic signaling blocking delay the ageing rate. It seems especially interesting to test if the two main oxidative stress-linked factors related to longevity mentioned above: mitochondrial ROS generation rate and the fatty acid unsaturation degree are also decreased in rodents under these manipulations. To achieve this goal, we propose the following specific objectives: 1. To clarify the effects of 40% methionine restriction on mitochondrial oxidative stress in the rat heart. 2. To determine if aged rats maintain the capacity to lower mitochondrial oxidative stress in response to a short-term exposure to methionine restriction. 3. To investigate if beta-adrenergic blocking through atenolol treatment modifies oxidative stress in C57BL/6 mice heart. 4. To study the effects of combined treatment of methionine restriction and atenolol on mitochondrial oxidative stress in the rat heart.

RESEARCH CONTENTS

1. Effects of dietary methionine restriction on mitochondrial oxidative stress in the rat heart

In this investigation, 40% dietary methionine restriction was performed for 7 weeks in rats, in order to determine if methionine is the dietary component responsible for the beneficial effects of 40% dietary restriction on oxidative stress.

40% Methionine restriction during 7 weeks did not change growth rate and decreased mitochondrial ROS production exclusively at complex I, without modifying mitochondrial oxygen consumption or the amount of the antioxidant enzyme superoxide dismutase manganese (MnSOD) in rat cardiac mitochondria. In agreement with the decrease in mitochondrial ROS production, 40%MetR reduced the oxidative damage to mitochondrial DNA and the markers of protein oxidation, lipoxidation and glycooxidation. These beneficial changes were similar, although slightly less profound, to the ones previously observed in the rat heart under 80%MetR, suggesting a dose-dependent effect of methionine (Sanz et al., 2006), and were greater than the ones described in rat heart under 40%DR (Gredilla et al., 2002), that needs a long-term treatment to induce similar effects.

We also investigated whether decreasing dietary methionine content could induce effects on an important mechanism of gene expression modification: DNA methylation. We found that our nutritional intervention lowered the global genomic DNA methylation, which fits well with our hypothesis since dietary methionine is essential for synthesis of S-adenosylmethionine (SAM) that provides methyl groups required for DNA methylation. Thus, it is possible that qualitative changes leading to a lower mitochondrial ROS production were secondary to changes in gene expression induced by the decrease in DNA methylation. Finally, the amount of SIRT5 and global unsaturation indexes were not modified by our treatment.

2. Methionine restriction and aging: Effects of methionine restriction applied at old age on mitochondrial oxidative stress in rat liver

In order to determine if old rats maintain the capacity to lower oxidative stress in response to 40%MetR similarly to young animals, we studied the effects of this intervention in old rats (24 months of age) fed with control diet or 40%MetR diet and young rats (6 months) fed with control diet during 7 weeks.

Methionine restriction applied at old age lowered mitochondrial ROS production and free radical leak at complex I as well as oxidative damage to mitochondrial DNA in liver, which is in agreement with results previously found in young rats under MetR (Sanz et al., 2006; Caro et al., 2008). Furthermore, this nutritional intervention was

able to totally or partially reverse the aging-related increases in protein modification. Our results show that old rats maintain the capacity to respond to methionine restriction with a decrease in mitochondrial oxidative stress.

In the present study performed in old rats and in contrast to what had been observed in young rats under MetR (objective 1), global DNA methylation was not modified. This could mean that the capacity of MetR to decrease global DNA methylation is lost during aging in rat liver. Regarding to mitochondrial biogenesis, sirtuins and antioxidant factors, we detected an increase in the amount of SIRT1 with age, and decreases in SIRT1 and Mitochondrial transcription factor A (TFAM) with MetR, whereas PGC1, Nrf2 and MnSOD did not change. Our results suggest that MetR does not decrease oxidative stress through sirtuins or antioxidants factors. Concerning mitochondrial biogenesis, the effects of MetR could be tissue or age specific because, increases in PGC1 with the same dietary protocol have been detected in young rat brain (Naudi et al., 2007).

3. Modulation of mitochondrial oxidative stress through the interruption of β -adrenergic signaling pathway

To delve into the study of the mechanisms by which the interruption of β -adrenergic signaling increases longevity in C57BL/6 mice, we blocked β -adrenergic receptor signaling in these mice using the β 1 selective blocker atenolol in drinking water for 2 weeks and we measured oxidative-stress related parameters in the mouse heart.

Atenolol treatment did not change the mitochondrial ROS generation rate and the oxidative damage to heart mitochondrial DNA. Then, we measured the other known oxidative stress-related parameter that is low in long-lived animals, the fatty acid unsaturation degree. Strikingly, we found that atenolol treatment strongly decreased the total number of fatty acid double bonds (DBI) as well as the peroxidizability index (PI) in the heart of C57B/6 mice, and that was due to decreases in the highly unsaturated 22:6n-3 and 20:4n-6 fatty acids and to increases in the much less unsaturated 16:0, 18:1n-9 and 16:1n-7 fatty acids. These changes confer the cellular membranes superior resistance to lipid peroxidation and lower lipoxidation dependent damage to macromolecules. In agreement with this, atenolol treated mice showed

lower levels of protein lipoxidation and oxidation markers, whereas glycoxidation markers were increased, which can be due to an increase in glycolytic intermediates, possibly induced by atenolol treatment. Finally, with the aim of clarifying the signaling mechanisms involved in the changes observed, we found that atenolol treated mice had higher levels of p-ERK signaling protein, similarly to what has been previously found in AC5KO mice.

Therefore, our results lead to the proposal that the increase in longevity observed in AC5KO mice can be due in part to the decrease in fatty acid unsaturation degree and oxidative stress induced by changes in gene expression activated by increases in ERK-dependent signaling.

4. Effects of combined treatment of dietary methionine restriction and β -adrenergic signaling blocking on mitochondrial oxidative stress.

According to the results obtained in the first and third objective, we observed that both treatments applied separately were able to modify the only two known traits that correlate longevity with oxidative stress. From these, decreasing mitochondrial ROS production seems to be at work in dietary and methionine restriction, whereas in the case of the β -adrenergic blockade, is the second mechanism, lowering the fatty acid unsaturation degree, the one involved. In order to study whether simultaneous application of both treatments is able to induce additive or even synergic effects, we studied the effects of Control, atenolol, MetR or MetR+atenolol treatments in male Wistar rats. After 7 weeks of treatment we measured oxidative-stress related parameters in the rat heart.

Despite in our study atenolol treatment increased mitochondrial ROS production, this was reverted when both treatments were implemented simultaneously, similarly to what was found in free radical leak. Both MetR and atenolol treatment lowered oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins, as well as, the fatty acid unsaturation degree, which seemed to be due, at least in part, to decreases in desaturase and elongase activities or peroxisomal β -oxidation. Furthermore, the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) was stimulated by MetR and atenolol treatment. The decreases in membrane fatty acid unsaturation and protein oxidation, and the increase in p-ERK showed synergic effects of both

treatments. In summary, simultaneous treatment with MetR and atenolol was more efficient than either single treatment alone to lower oxidative stress in rat heart mitochondria.

CONCLUSIONS

- ★ Short-term 40% methionine restriction decreases mitochondrial ROS production and free radical leak at complex I, the level of 8-oxodG in mitochondrial DNA (mtDNA) and the amount of protein modification markers in the rat heart. These changes are similar to the ones previously observed in dietary restricted and 80% methionine restricted animals but without negative effects on the growth rate. Furthermore, global DNA methylation degree is also decreased by our intervention, which suggests that changes in gene expression could be involved in the observed effects.
- ★ Aged rats (24 months of age) maintain the capacity to lower mitochondrial ROS production and free radical leak at complex I in the rat liver in response to short term 40% methionine restriction, similarly to what has been shown in young animals. In addition, methionine restriction implemented at old age decreases the oxidative damage to mtDNA and reverses aging-related increases in protein modification. These results suggest that methionine restriction is able to reduce oxidative stress even when it is implemented at old age.
- ★ Our results reinforce the idea that methionine is the dietary component responsible for the decrease in mitochondrial oxidative stress and possibly for part of the increase in longevity that takes place during DR.
- ★ Interruption of β -adrenergic signaling through 2 weeks atenolol treatment strongly decreases the fatty acid unsaturation degree, the levels of protein lipoxidation and oxidation markers, and increases the amount of p-Extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling protein in the mouse C57BL/6 heart. However, this treatment does not modify mitochondrial ROS production and oxidative damage to mtDNA.

- ★ These results support the idea that the increased longevity of the AC5 KO (Adenylyl cyclase 5 Knock Out) mice can be due in part to an ERK signaling mediated stress resistance due to a decrease in fatty acid unsaturation, leading to lower lipid peroxidation and decreased lipoxidation-derived damage to cellular proteins.
- ★ A low rate of mitochondrial ROS production and a low fatty acid unsaturation degree are characteristic traits of long-lived animals and can be obtained in a single species by methionine restriction or atenolol treatment.
- ★ Simultaneous treatment with methionine restriction and atenolol is more efficient than either single treatment alone to lower the fatty acid unsaturation degree and the protein oxidation markers and to increase the phosphorylation of ERK signaling protein. Furthermore, combined treatment MetR + atenolol reverses the increase in mitochondrial ROS production induced by atenolol treatment, decreases the free radical leak at complex I and the level of 8-oxodG in the mtDNA.
- ★ A low fatty acid unsaturation degree not only protects cellular membranes against lipid peroxidation, it also lowers the generation of secondary radicals and toxic lipid peroxidation products which can deleteriously modify proteins and DNA.

BIBLIOGRAPHY

CARO P, GOMEZ J, LÓPEZ-TORRES M, SÁNCHEZ I, NAUDÍ A, JOVE M, PAMPLONA R, BARJA G (2008) Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 9:183-196.

GREDILLA R, LÓPEZ-TORRES M, BARJA G (2002) Effect of time of restriction on the decrease in mitochondrial H₂O₂ production and oxidative DNA damage in the heart of food-restricted rats. *Microsc Res Tech.* 59: 273-277.

GREDILLA R, BARJA G (2005) Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146:3713-3717

HARMAN D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society* 20: 145-147

HULBERT AJ, PAMPLONA R, BUFFENSTEIN R, BUTTEMER WA (2007) Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev* 87: 1175-1213.

LOPEZ-TORRES M, BARJA G (2008) Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction, possible implications for humans. *Biochim Biophys Acta* 1780: 1337-1347.

NAUDI A, CARO P, JOVÉ M, GÓMEZ J, BOADA J, AYALA V, PORTERO-OTIN M, BARJA G, PAMPLONA R (2007) Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation Res* 10: 473-484.

PAMPLONA R, BARJA G, PORTERO-OTIN M (2002) Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Ann N Y Acad Sci* 959: 475-490.

PAMPLONA R, BARJA G (2011) An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology* 12: 409-435.

SANCHEZ-ROMAN I, BARJA G (2013) Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: Role of methionine restriction. *Exp Gerontol In press*

SANZ A, CARO P, AYALA V, PORTERO-OTIN M, PAMPLONA R, BARJA G (2006) Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J.* 20: 1064-1073.

YAN L, VATNER DE, O'CONNOR JP, IVESSA A, GE H, CHEN W, HIROTANI S, ISHIKAWA Y, SADOSHIMA J, VATNER SF (2007) Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell* 130:247-258.

