

# Restricción calórica, estrés oxidativo y longevidad

Mónica López-Torres y Gustavo Barja

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

En el presente artículo se revisan los estudios disponibles acerca de la relación entre el estrés oxidativo y el envejecimiento en distintas especies de vertebrados y en mamíferos sometidos a restricción calórica (RC). Los antioxidantes endógenos correlacionan de modo inverso con la longevidad máxima de las especies animales y los experimentos que modifican sus valores pueden aumentar la supervivencia y la longevidad media pero no la longevidad máxima. Los datos disponibles indican que las especies longevas de vertebrados tienen tasas bajas de producción mitocondrial de radicales libres y un grado bajo de instauración de los ácidos grasos de sus membranas, dos factores cruciales que pueden determinar su lenta velocidad de envejecimiento. El daño oxidativo al ADN mitocondrial es también menor en las especies de vertebrados longevos que en las de vida corta. Por otra parte, la RC, la manipulación experimental mejor descrita que aumenta las longevidades media y máxima, también disminuye la producción mitocondrial de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) y el daño oxidativo al ADN mitocondrial. Datos recientes indican que el descenso en generación mitocondrial de ROS se debe a la restricción proteica en vez de a la de calorías, y más concretamente a la restricción de metionina en la dieta. Una mayor longevidad se conseguiría en parte mediante una baja tasa de generación de daño oxidativo endógeno y también mediante la posesión de macromoléculas altamente resistentes a la modificación oxidativa, como es el caso de las proteínas y los lípidos titulares.

## Palabras clave

Longevidad. Envejecimiento. Longevidad máxima. Radicales libres. Daño al ADN. Mitocondria. Restricción calórica. Restricción proteica. Restricción de metionina. Insaturación de ácidos grasos.

Los resultados de los autores descritos en este artículo han sido apoyados por los proyectos de investigación n.º BFU2005-02584 del Ministerio de Educación y Ciencia y de las ayudas de la Comunidad de Madrid/UCM a grupos de investigación (910521-2006 y 2007).

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

Recibido el 24-4-2008; aceptado el 24-4-2008.

## Calorie restriction, oxidative stress and longevity

Studies on the relationship between oxidative stress and ageing in different vertebrate species and in calorie-restricted animals are reviewed. Endogenous antioxidants inversely correlate with maximum longevity in animal species and experiments modifying levels of these antioxidants can increase survival and mean life span but not maximum life span (MLSP). The available evidence shows that long-living vertebrates consistently have low rates of mitochondrial free radical generation, as well as a low grade of fatty acid unsaturation on cellular membranes, which are two crucial factors determining their ageing rate. Oxidative damage to mitochondrial DNA is also lower in long-living vertebrates than in short-living vertebrates. Calorie restriction, the best described experimental strategy that consistently increases mean and maximum life span, also decreases mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation and oxidative damage to mitochondrial DNA. Recent data indicate that the decrease in mitochondrial ROS generation is due to protein restriction rather than to calorie restriction, and more specifically to dietary methionine restriction. Greater longevity would be partly achieved by a low rate of endogenous oxidative damage generation, but also by a macromolecular composition highly resistant to oxidative modification, as is the case for lipids and proteins.

## Key words

Longevity. Ageing. Maximum longevity. Free radicals. DNA damage. Mitochondria. Calorie restriction. Protein restriction. Methionine restriction. Fatty acid unsaturation.

## INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso endógeno y progresivo probablemente debido a más de una causa principal. Por lo tanto, aunque los animales se mantengan en condiciones óptimas durante toda su vida, seguirán mostrando una velocidad de envejecimiento típicamente característica de su especie. Así pues, su potencial de vida máximo (MLSP) está determinado fundamentalmente por sus genes, no por el ambiente. Por el contrario, la longevidad media está determinada sobre todo por el ambiente y en menor medida también por el genotipo. Hoy día, la intensidad de generación de especies reactivas derivadas del oxígeno

(ROS) se acepta ampliamente como una de las principales causas potenciales del envejecimiento<sup>1-4</sup>. Según la teoría del envejecimiento mitocondrial por radicales libres, los ROS producidos endógenamente durante la respiración tisular dan lugar a un daño tisular continuo y progresivo que desemboca en el envejecimiento. En los tejidos del individuo sano las mitocondrias son la fuente principal de producción de ROS y los únicos orgánulos celulares, aparte del núcleo, que contienen ADN. Los ROS pueden dañar a los lípidos, las proteínas y, de modo especialmente relevante para el envejecimiento, también al ADN. La información disponible apoya que la tasa de generación mitocondrial de ROS puede ser uno de los factores principales determinantes de la velocidad del envejecimiento y, por lo tanto, del MLSP de cada especie animal. Muchos estudios han demostrado de forma coherente que la tasa de generación mitocondrial de ROS (mitROS) es menor en las especies animales longevas que en las de vida corta<sup>3-6</sup>. Además, la restricción calórica (RC), la manipulación experimental mejor conocida que disminuye la tasa de envejecimiento y aumenta el MLSP en muchas especies, disminuye la tasa de generación de mitROS<sup>7,8</sup>. En ambos tipos de investigaciones, los estudios comparados y los de restricción de dieta, las tasas bajas de generación de mitROS van acompañadas de valores bajos de daño oxidativo en el ADN mitocondrial (ADNmt) y en proteínas<sup>9,10</sup> y de una tasa lenta de envejecimiento. Aunque los efectos de la RC están bien establecidos, los mecanismos implicados no se conocen en detalle. Estudios recientes acerca del papel de componentes específicos de la dieta están empezando a clarificar este punto<sup>11</sup>. La restricción de proteínas (RP) en la dieta, y de modo más preciso la restricción de metionina, parece ser el factor determinante del efecto de la restricción de dieta, independientemente de las calorías, sobre la generación de mitROS y el estrés oxidativo.

Por otra parte, los estudios comparados también indican que la velocidad del envejecimiento y, por tanto, el MLSP no sólo están relacionados con la tasa de generación de ROS, sino también con la composición de las macromoléculas titulares. Las especies longevas muestran tasas bajas de generación de daño endógeno pero también una composición de sus macromoléculas tisulares que es altamente resistente a la modificación oxidativa. Se sabe que al aumentar la insaturación de los ácidos grasos aumenta enormemente su sensibilidad al daño oxidativo. Las especies longevas de aves y mamíferos tienen membranas celulares con un bajo grado de insaturación, sobre todo debido a una presencia muy pequeña de ácidos grasos altamente insaturados. Esas membranas son entonces menos sensibles al estrés oxidativo y muestran menores niveles de peroxidación lipídica y de modificación de proteínas dependiente de lipoxidación<sup>12-14</sup>. Análogamente, se ha descrito que el contenido en metionina de las proteínas tisulares correlaciona negativamente con la MLSP en los mamíferos<sup>15</sup>. La metionina es uno de los aminoácidos más sensibles al daño oxidativo, transformándose en metionina sul-

fóxido en presencia de ROS. Así, los tejidos de las especies longevas tienen proteínas constituyentes menos sensibles a la modificación oxidativa debido a su contenido comparativamente menor en metionina comparado con las proteínas de las especies de vida corta.

## PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE ROS EN DISTINTAS ESPECIES

Las mitocondrias se consideran la principal fuente de ROS en las células sanas debido a la actividad constante de la cadena respiratoria situada en su membrana interna. La inmensa mayoría del consumo de oxígeno celular ocurre en esa cadena respiratoria. Así, aunque sólo un pequeño porcentaje de los electrones acaben dando lugar a la formación de ROS, la cantidad total es importante. Puesto que las mitocondrias son también los únicos orgánulos extranucleares que contienen su propio ADN, éste se convierte en una diana del daño oxidativo de especial importancia en el caso del envejecimiento debido a su capacidad para generar daño de tipo acumulativo. Los valores tisulares de estrés oxidativo global se pueden controlar bien mediante la generación o mediante la eliminación de ROS. Después de estudios intensivos realizados hace una década, quedó claro que los antioxidantes, aunque quizá puedan ser importantes para la protección frente a enfermedades, no controlan la velocidad del envejecimiento. Este concepto se apoya en distintos tipos de investigaciones. Las hipótesis iniciales de que el envejecimiento podría deberse a una caída de los valores de antioxidantes con la edad se descartó pronto en cuanto se comprobó que los cambios en los valores tisulares de antioxidantes endógenos en función de la edad no seguían un patrón coherente y no caían necesariamente en los animales viejos<sup>3,16,17</sup>. Por otro lado, la lenta velocidad de envejecimiento de los animales longevas podría teóricamente deberse a la presencia constitutiva de un sistema antioxidante más potente. Pero cuando se realizaron estudios comparados en especies con distinto MLSP, se encontró justamente la situación opuesta. Los vertebrados longevas no mostraban valores mayores sino menores de enzimas antioxidantes y de antioxidantes endógenos de bajo peso molecular que las especies de vida corta<sup>6,18,19</sup>, lo que indicaba, como se discute más adelante, que su generación de ROS in vivo debía ser también menor. Además, cuando se aumentan de modo experimental los antioxidantes tisulares mediante su suplementación en la dieta, mediante la inducción farmacológica o mediante técnicas transgénicas, la longevidad media aumenta a veces de forma moderada, pero el MLSP no cambia<sup>3,20-24</sup>. Sólo se han descrito aumentos marginales o muy pequeños en MLSP en muy pocas ocasiones<sup>25</sup>, y en alguna de ellas la repetición de los experimentos, como en el caso de moscas transgénicas, con más superóxido dismutasa y catalasa no ha confirmado los resultados. Por último, los estudios en los que se han generado animales *Knock out* para genes que codifican an-

tioxidantes muestran que los animales pueden mostrar diferentes afecciones, pero sus tasas de envejecimiento no parecen verse afectadas<sup>26,27</sup>. En resumen, la información disponible está abrumadoramente de acuerdo en que los antioxidantes no controlan el envejecimiento y la longevidad máxima, aunque puedan quizá proteger contra muchas afecciones y distintas causas de muerte prematura debido a su capacidad para disminuir el estrés oxidativo global.

Aunque los antioxidantes tisulares endógenos no determinan la velocidad del envejecimiento, su correlación negativa con la longevidad máxima nos indica que la tasa de generación endógena de radicales libres en los tejidos in vivo debe de ser menor en las especies animales longevas que en las de vida corta<sup>6,18</sup>. Si además de unos valores bajos de antioxidantes endógenos los animales longevidos tuviesen también tasas altas de producción de ROS, no serían capaces de hacer frente al daño oxidativo y se perdería el equilibrio del estrés oxidativo y la homeostasis. La estrategia de disminuir la generación de mitROS en lugar de aumentar los antioxidantes o los valores de reparación parece constituir una forma mejor de aumentar la longevidad durante la evolución. Sería muy ineficiente generar cantidades grandes de ROS para intentar neutralizarlos luego, antes de que alcancen dianas importantes como el ADN, o aun peor, intentar reparar el ADN después de haberlo dañado seriamente. Esto es todavía más cierto teniendo en cuenta: a) el elevado coste energético de mantener constantemente valores altos de antioxidantes o macromoléculas reparadoras en los tejidos de los animales longevidos; b) la capacidad de inducir transitoriamente esas moléculas protectoras cuando sea necesario, tanto en animales longevidos como en los de vida corta; c) la extrema cercanía o incluso el contacto entre las fuentes principales de ROS y las dianas macromoleculares de mayor importancia para el envejecimiento, como es el caso del ADNmt. En lugar de eso, disminuir la generación de ROS cerca de su principal diana relacionada con el envejecimiento (el ADNmt) hace descender su daño de modo mucho más eficaz y con un coste mucho menor. De hecho, todas las investigaciones realizadas hasta la fecha sobre este tema han encontrado que la tasa de generación de mitROS es menor en los tejidos de los animales longevidos que en los de vida corta<sup>3,5,6,18,28-32</sup>. Esto se da en todos los tipos de vertebrados homeotermos longevidos, independientemente del valor de su consumo de oxígeno por unidad de peso corporal (que es menor en animales de gran tamaño corporal que en los de pequeño tamaño) y explica por qué los antioxidantes tisulares correlacionan negativamente con el MLSP entre especies (los animales longevidos tienen menores valores constitutivos de antioxidantes tisulares porque su tasa de generación de ROS es baja).

Los estudios realizados en aves (animales homeotermos excepcionalmente longevidos) son especialmente ilustrativos ya que, al igual que ocurre en el caso de los murciélagos y los primates, viven mucho más tiempo que los mamíferos en general de peso corporal o tasa metabólica

similar, lo cual contradice la teoría de la velocidad de vida (*rate of living*) del envejecimiento. A pesar de sus altas tasas de consumo de oxígeno, las tres especies de aves estudiadas hasta la fecha, pertenecientes a diferentes familias (periquitos, canarios y palomas, con MLSP de 21, 24 y 35 años, respectivamente) muestran tasas menores de generación de mitROS que ratones y ratas (con MLSP de 3,5 o 4 años)<sup>5,29-33</sup>. En muchos casos esto es posible porque el porcentaje del flujo electrónico total en la cadena respiratoria dirigido a la producción de ROS (el porcentaje de fuga de radicales libres [%FRL]) es menor en el caso de las aves. Su cadena respiratoria transporta los electrones de forma más eficiente en lo que se refiere a evitar la fuga univalente hacia el oxígeno en puntos de la cadena situados corriente arriba respecto a la citocromo oxidasa. También se han descrito tasas menores de generación de mitROS en cerebro humano comparado con el de la rata<sup>34</sup>. Los primates (y especialmente los humanos) y los murciélagos también viven más de lo que se espera a partir de su tamaño corporal y su tasa metabólica. Así pues, las aves pequeñas y los mamíferos de gran tamaño tienen producción baja de ROS y envejecimiento lento, mientras que la tasa metabólica es baja en los mamíferos de gran tamaño pero es alta en las aves pequeñas. Es decir, la correlación entre tasa de generación de mitROS y MLSP es mejor que entre tasa metabólica y MLSP.

El hecho de que distintas especies animales tengan distintos valores de FRL en la cadena respiratoria mitocondrial indica que el porcentaje de electrones dirigidos a la generación de ROS no es fijo sino que puede regularse en cada especie, que es lo que cabe esperar de un parámetro que controle la tasa de envejecimiento endógeno. Estudios realizados en otros tipos de modelos biológicos, incluidos los invertebrados<sup>35</sup>, hongos<sup>36</sup> y células en cultivo<sup>37</sup>, también apoyan el papel de la generación de mitROS en el control del envejecimiento. Por otra parte, en la mayoría de los estudios comparados realizados la diferencia en producción de mitROS entre especies suele ser menor que la diferencia de MLSP<sup>5,29-31</sup>. Esto estaría de acuerdo con la idea ampliamente extendida de que existe más de un factor principal causante del envejecimiento.

También se ha estudiado el sitio en la cadena respiratoria en donde la generación de ROS es menor en las especies longevas. La producción mitocondrial de ROS se ha atribuido clásicamente a la ubisemiquinona del complejo III<sup>38</sup>. Sin embargo, de acuerdo con investigaciones iniciales en partículas submitocondriales<sup>39,40</sup>, el complejo I también contiene un generador de ROS importante<sup>29,30,34,41-45</sup>, lo cual hoy día ya se considera aceptado como parte de los conocimientos fundamentales sobre la cadena respiratoria<sup>46</sup>. Además, los estudios disponibles indican que el complejo respiratorio causante de la menor generación de ROS de los animales longevidos es el complejo I<sup>29-31,33</sup>. En cuanto a la identidad del generador de ROS dentro del complejo I, se han propuesto el mononucleótido de flavina<sup>34,47</sup>, la ubisemiquinona<sup>43,44</sup> o los centros hierrosulfurados<sup>41,42,48</sup>. Tan-

to la flavina como los centros FeS se localizan en el dominio hidrofílico del complejo I dirigido hacia la matriz mitocondrial, que es el compartimento en el que se sitúa el ADNmt. Por el contrario, los ROS generados en el complejo III parecen dirigirse fundamentalmente al lado citosólico<sup>33</sup>, aunque algunos estudios sugieren que parte de la generación de ROS podría también tener lugar en dirección a la matriz mitocondrial<sup>49</sup>.

## DAÑO OXIDATIVO AL ADN EN DISTINTAS ESPECIES

Los antioxidantes tisulares contribuyen a controlar los ROS in vivo. Constituyen la primera línea de defensa para mantener la homeostasis celular del estrés oxidativo. Pero la neutralización y la eliminación de los ROS por los antioxidantes no son eficaces al 100%. Siempre existe un cierto nivel de daño oxidativo a macromoléculas, incluso en animales sanos. Este daño oxidativo afecta a los lípidos, las proteínas y el ADN celular. Aunque los ROS pueden dañar todos estos tipos de macromoléculas, el daño al ADN ha de tener importancia crucial para el envejecimiento porque puede dar lugar a la pérdida o la alteración permanente de la información genética. Los ROS pueden atacar al ADN directamente a las bases o al esqueleto azúcar-fosfato, produciendo muchos tipos diferentes de modificaciones de las purinas y pirimidinas, como el marcador de daño oxidativo al ADN más comúnmente utilizado 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), así como roturas de simple o doble cadena y mutaciones somáticas. Aunque se han descrito aumentos en el daño oxidativo al ADN con la edad en algunos estudios<sup>50-53</sup> y otros no los han encontrado<sup>53,54</sup>, el ataque oxidativo continuado al ADN a lo largo de toda la vida puede tener una consecuencia más importante a largo plazo debido a la capacidad de los ROS para producir mutaciones en el ADN. Así, más que el daño oxidativo al ADN, lo que se acumularía con la edad serían las mutaciones en éste.

Ha de existir una compensación general entre la producción y eliminación de ROS, tanto en los animales de vida corta como en los longevos que permita la homeostasis tisular y, por lo tanto, la supervivencia en ambos casos. La tasa de recambio celular de ROS debe ser alta en el primer tipo de animales y baja en el segundo. Si las especies de vida corta tienen alta producción de ROS y valores altos de antioxidantes, mientras que las de vida larga tienen baja producción de ROS y valores bajos de antioxidantes, se podría alcanzar un equilibrio similar en ambos casos. Pero esto no es exactamente así porque en los animales de vida corta las altas tasas de producción de ROS darían lugar a una mayor concentración local de ROS en los sitios cercanos a su lugar de formación. En esos sitios, la fuente de ROS y sus dianas están tan próximas que los antioxidantes no podrían interceptar de forma efectiva a los ROS antes de que alcancen a sus dianas. La concentración local de ROS cerca de dianas relevantes para el envejecimiento (co-

mo el ADNmt), que están situadas cerca de los sitios de generación de ROS (la membrana mitocondrial interna) o incluso en contacto con ellos, debe de ser menor en las especies longevas debido a su menor tasa de producción de ROS. Esto daría lugar a menor daño oxidativo en el estado estacionario y a una menor acumulación de mutaciones somáticas en el ADNmt, lo que desembocaría en un envejecimiento lento<sup>6</sup>. En apoyo de esta idea, se ha encontrado que los niveles de 8-oxodG en el ADNmt de corazón y cerebro correlacionan negativamente con el MLSP en los mamíferos<sup>9</sup>, lo cual está también de acuerdo con la menor excreción urinaria de 8-oxo-7,8-dihidroguanina en los mamíferos longevos comparados con los de vida corta<sup>55</sup>. Las aves (muy longevas) también tienen menos daño oxidativo en su ADNmt que los roedores (de vida corta) de tamaño corporal similar<sup>56</sup>. De acuerdo con esto, también se ha observado que la tasa de acumulación de mutaciones en el ADNmt con la edad es más lenta en los humanos que en los ratones<sup>57</sup>. Además, la concentración de 8-oxodG es alrededor de 10 veces mayor en el ADNmt que en el ADN nuclear en el corazón y el cerebro de las 11 especies de mamíferos o aves estudiadas<sup>9,56</sup>. Es interesante que también se observa una diferencia de alrededor de 10 veces a favor del ADNmt cuando se comparan las mutaciones espontáneas en los dos tipos de ADN<sup>58</sup>. Por otra parte, la 8-oxodG en el ADN nuclear no correlaciona con el MLSP<sup>9</sup>. Aunque las mitocondrias parecen no tener algunas formas de reparación del ADN, como la de dímeros de pirimidina, se sabe que su capacidad para reparar la 8-oxodG es similar o incluso mayor que la presente en el núcleo<sup>59</sup>. Los datos disponibles sugieren que tanto el ataque por ROS como la reparación del ADN son mayores en las especies de vida corta que en las longevas, y que son también mayores en el ADNmt que en el ADN nuclear en todas las especies<sup>60</sup> de acuerdo con la localización del ADNmt muy cerca del sitio de producción de ROS en las mitocondrias. La mayor tasa de producción de mitROS en los animales de vida corta puede ser una causa importante de su acumulación más rápida de mutaciones en el ADNmt durante el envejecimiento<sup>57</sup>. Se producen mutaciones en el ADNmt durante el envejecimiento de los tejidos posmitóticos, tanto mutaciones puntuales como deleciones grandes, y pueden alcanzar valores altos en individuos viejos<sup>61,62,63</sup>. El ADNmt mutado se expande clonalmente hasta predominar durante el envejecimiento en las células mutadas, lo que tiene consecuencias negativas para la funcionalidad celular.

## RESTRICCIÓN CALÓRICA, ESTRÉS OXIDATIVO Y ENVEJECIMIENTO

Los estudios comparados realizados hasta la fecha en distintas especies sugieren una relación causa-efecto entre la tasa de generación de mitROS y la velocidad de envejecimiento, pero hacen falta estudios experimentales que

confirman este hecho. La RC es la manipulación experimental mejor conocida que es capaz de reducir la tasa de envejecimiento, aumentando las longevidades media y máxima y que da lugar a efectos beneficiosos sobre el estado general de salud en roedores de laboratorio, en otros animales, e incluso en primates, como el hombre<sup>64</sup>. Los cambios fisiológicos inducidos por la RC en roedores de laboratorio han sido ampliamente descritos en la literatura científica e incluyen reducción del tamaño corporal, descenso de la temperatura corporal, así como descensos en los valores plasmáticos de hormona de crecimiento y de factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1). Además, los animales restringidos presentan valores de glucosa y de insulina en plasma más bajos, junto con una sensibilidad a la insulina mayor que los animales controlados alimentados ad libitum. Se han descrito también retrasos en la maduración sexual y descensos en la fertilidad. Las modificaciones en la vía de señalización de la insulina/IGF-1 tienen un interés especial al ser un sistema muy conservado que ha sido propuesto como regulador de la longevidad en una gran variedad de especies desde los nematodos a los mamíferos<sup>65</sup>.

Un número creciente de trabajos apoya la hipótesis de que la RC actuaría, al menos en parte, haciendo descender los valores de estrés oxidativo<sup>2,10</sup>. Los estudios que han analizado los cambios en los valores de antioxidantes de animales sometidos a RC son inconsistentes y no pueden explicar los aumentos de MLSP observados<sup>66</sup>. Por esta razón, muchos trabajos se han centrado en los efectos de la RC sobre la tasa de producción de mitROS<sup>7,8,10,66-68</sup>. Estos estudios, que normalmente utilizan una RC del 40%, demuestran que la RC a largo plazo hace descender significativamente la tasa de generación de mitROS en los diferentes tejidos de rata estudiados<sup>10,66-68</sup> (tabla 1), mientras que en el caso de la RC a corto plazo los descensos sólo se han descrito en algunos tejidos<sup>7,8,10</sup>. La RC aplicada durante 6-7 semanas fue suficiente para disminuir la tasa de producción de mitROS, así como los valores de 8-oxodG del ADN mitocondrial y el ADN nuclear del hígado de rata<sup>7</sup>. Además, en todos los tejidos estudiados hasta la fecha (corazón, hígado y cerebro) el descenso en la producción de mitROS de las ratas restringidas tiene lugar específicamente en el complejo I mitocondrial, sin que se vea modificado el consumo de oxígeno mitocondrial y se da junto con un descenso de la fuga porcentual de radicales libres, %FRL (porcentaje del flujo electrónico total en la cadena respiratoria dirigido a la producción de ROS), lo que indica que las mitocondrias de los animales restringidos son más eficientes en evitar la producción de ROS por unidad de flujo electrónico<sup>7,10,67-69</sup>. Se ha descrito este mismo tipo de cambios al comparar especies muy longevas con especies poco longevas, lo cual sugiere que podrían tratarse de un mecanismo altamente conservado para aumentar el MLSP, tanto dentro de una especie así como entre especies.

El descenso en la tasa de generación de mitROS en los animales sometidos a RC va acompañado también de des-

**Tabla 1.** Resumen de los efectos de la restricción calórica (RC), de proteínas (RP) y de metionina (MetR) sobre el estrés oxidativo y la longevidad máxima (MLSP)

	RC (40%)	RP (40%)	MetR (40 y 80%)
MitROS	↓ (cx I)	↓ (cx I)	↓ (cx I and III)*
MitVO <sub>2</sub>	=	=	=
FRL	↓	↓	↓
Ox. mtADN	↓	↓	↓
Ox. proteínas	↓	↓	↓
MLSP	↑ ↑	↑	↑

MitROS: producción mitocondrial de ROS; MitVO<sub>2</sub>: consumo de oxígeno mitocondrial; FRL: fuga de radicales libres (% del flujo electrónico total en la cadena respiratoria dirigido a la producción de ROS); Ox. mtADN: daño oxidativo al ADN mitocondrial (8-oxodG); Ox. proteínas: marcadores específicos de oxidación, lipoxidación y glucooxidación de proteínas; cx I: complejo I mitocondrial; cx III: complejo III mitocondrial. ↑: aumento; ↓: descenso.

\*El efecto de la MetR fue más importante en la producción de ROS del complejo I que sobre la del complejo III, tanto según la magnitud de los descensos como según el número de tejidos afectados.

censo significativos de los valores de 8-oxodG, únicamente en el ADN mitocondrial en unos casos, o tanto en el ADN nuclear como en el ADN mitocondrial en otros, en función del tejido estudiado<sup>7,8,10,67-69</sup>, así como de descensos del daño por oxidación, glucooxidación y lipooxidación de proteínas mitocondriales de corazón<sup>70</sup> (tabla 1). Por otro lado, la reparación de 8-oxodG en el ADN mitocondrial mediante la vía de reparación por escisión de bases (BER) no aumenta o incluso desciende durante la RC<sup>71</sup>. De hecho, la tasa de generación de mitROS, los valores de 8-oxodG en el ADNmt y la reparación de 8-oxodG mediante la escisión de bases mitocondrial descienden de forma similar durante la RC al 40%, y los descensos tienen una magnitud aproximada de un 30-40%. De forma paralela a lo que ocurría con los valores de antioxidantes tisulares en animales muy longevidos, la reparación de 8-oxodG mitocondrial es más baja en roedores sometidos a RC probablemente porque su tasa de producción de mitROS es también más baja que la de animales alimentados ad libitum. Tanto los sistemas de antioxidantes endógenos como de reparación de ADNmt pueden inducirse temporalmente cuando es necesario, reduciendo así el coste energético global. Disminuir la tasa de generación de mitROS es más barato y más eficaz que mantener continuamente unos valores altos de antioxidantes y de sistemas de reparación. Todos estos hechos sugieren que reducir la tasa de generación de mitROS es un mecanismo altamente conservado desarrollado durante la evolución y compartido, tanto por especies longevas como por animales sometidos a RC para disminuir el daño oxidativo a lípidos, proteínas y especialmente al ADNmt y, por tanto, para disminuir las mutaciones en el ADNmt y la tasa de envejecimiento<sup>3,4,8-10</sup>. En algunos trabajos recientes se han observado aumentos en la biogénesis mitocondrial y

en la eficacia bioenergética mitocondrial<sup>72,73</sup>, descensos en los valores celulares de ROS<sup>73</sup> y ausencia de cambios, o incluso aumentos de consumo de oxígeno<sup>72,74-76</sup> en modelos de RC en distintas especies, tales como mamíferos, nematodos y levaduras.

## RESTRICCIÓN PROTEICA, RESTRICCIÓN DE METIONINA Y ENVEJECIMIENTO

El efecto positivo de la RC aumentando el MLSP se ha atribuido normalmente al descenso en la ingesta de calorías más que a descensos específicos de componentes concretos de la dieta. Estudios recientes llevados a cabo en *Drosophila melanogaster* ponen en cuestión este hecho clásicamente admitido<sup>77,78</sup> y apuntan a componentes particulares de la dieta como causa de los cambios descritos. Se han realizado distintos trabajos para intentar aclarar cuál es el componente de la dieta responsable del descenso en el estrés oxidativo mitocondrial observado durante la RC. La restricción de hidratos de carbono o de lípidos en la dieta no parece modificar la longevidad de roedores, mientras que los estudios realizados con RP en la dieta han mostrado aumentos de MLSP en casi la totalidad de los casos. De un total de 18 estudios de supervivencia a largo plazo tras RP en ratas y ratones, 16 de ellos presentan incrementos de MLSP<sup>13</sup>, aunque la magnitud de los incrementos fue aproximadamente un 50% de la que normalmente se describe en estudios de RC.

Por otro lado, se ha comprobado que la restricción isocalórica de metionina en la dieta de ratas y ratones conlleva incrementos de MLSP sin que haya una RC paralela de rata<sup>79-81</sup>. Por tanto, los trabajos disponibles sugieren que la restricción de la ingesta de metionina podría ser la causa de todo el efecto de la RP, incrementando el MLSP mientras que la RP (y de metionina) sólo sería responsable de un 50% del efecto de aumento de la longevidad producido por la RC. Este efecto significativo pero más moderado de la RP y de la restricción de metionina de aumento de la longevidad, comparado con el producido por la RC, estaría de acuerdo con la idea de que el envejecimiento es debido a más de una única causa. Estudios recientes en *Drosophila melanogaster* también apoyan la idea de que el efecto de la RC aumenta la longevidad, independientemente de las calorías ingeridas<sup>77,78</sup>. La reducción de la cantidad de caseína en dieta de un 4 a un 2% y de un 2 a un 1% o un 0,5% aumenta la longevidad de *Drosophila melanogaster*<sup>78</sup>.

## ESTRÉS Y DAÑO OXIDATIVO DURANTE LA RESTRICCIÓN PROTEICA Y PAPEL DE LA METIONINA

El efecto de la RP sobre la generación de mitROS se ha estudiado recientemente. Se ha comprobado que una RP

del 40% es capaz de disminuir la producción de mitROS específicamente del complejo I de la cadena mitocondrial, reduce los valores de FRL, así como los valores de 8-oxodG en el ADN mitocondrial<sup>11</sup> (tabla 1), y también disminuye marcadores específicos de modificación oxidativa en proteínas, la insaturación de ácidos grasos y el contenido de complejo I<sup>82</sup> en las mitocondrias de hígado de rata; estos resultados son muy parecidos a los que produce la RC<sup>70</sup>. En lo que se refiere a los otros dos principales componentes energéticos de la dieta, ni la restricción de lípidos<sup>83</sup> ni la de hidratos de carbono<sup>84</sup> modifica la producción de mitROS o el daño oxidativo al ADN mitocondrial en el hígado de rata, lo cual concuerda también con su ausencia de efecto sobre la longevidad. Por tanto, las proteínas resultan ser los componentes de la dieta causantes de los descensos observados en la producción de mitROS y en el daño oxidativo, y por ello también probablemente de parte del incremento de MLSP, que se produce mediante el tratamiento de RC. Al ser la restricción de metionina la responsable del efecto de aumento de longevidad que produce la RP, era necesario estudiar el efecto de esa restricción de metionina sobre parámetros relacionados con el estrés oxidativo, concretamente con la producción de mitROS y el daño oxidativo, ya que en este campo sólo se habían descrito cambios en los valores de glutatión reducido (GSH) en sangre<sup>80</sup>. Los resultados obtenidos muestran que una restricción isocalórica de metionina del 80% (con sustitución de glutamato en la dieta) hace descender la producción de mitROS (principalmente en el complejo I), %FRL, los valores de 8-oxodG en ADN mitocondrial, el contenido de complejo I, los marcadores de daño oxidativo a proteínas y el grado de insaturación de los ácidos grasos en las mitocondrias de hígado y corazón de rata<sup>85</sup>. Estos datos resultan ser muy parecidos a los descritos en modelos de RC y RP, con la única diferencia de que los valores del consumo de oxígeno mitocondrial aumentaron en el caso de la restricción de metionina. Sin embargo, experimentos adicionales con restricción isocalórica de metionina al 40 y al 80% en ratas, pero sin sustitución de metionina por glutamato en la dieta, también muestran descensos en la producción de mitROS y el %FRL sin cambios en el consumo de oxígeno mitocondrial, lo que sugiere que la restricción de metionina es la responsable del 100% del descenso en la generación de mitROS y el estrés oxidativo que tiene lugar durante la RP al 40% y la RC al 40%, y, probablemente, de todo el efecto de incremento de longevidad que produce la RP y parte del producido por la RC.

Hay otros estudios que también apuntan a la implicación de la metionina en el proceso de envejecimiento y longevidad. Se ha descubierto recientemente que el contenido de metionina de las proteínas de los tejidos muestra una fuerte correlación inversa con el MLSP en mamíferos<sup>15</sup>. El contenido en metionina de las proteínas es también más bajo en tejidos de aves de gran longevidad que en mamíferos de vida corta, cuando se comparan especies

con un tamaño corporal similar<sup>13</sup>. Por lo tanto, el contenido en metionina de las proteínas es menor cuanto mayor es el MLSP de una especie. Por otro lado, se sabe que un exceso de metionina en la dieta es capaz de dañar distintos órganos vitales y de aumentar el estrés oxidativo de los tejidos con efectos negativos similares a los observados en ratas alimentadas con dietas con alto contenido en proteínas<sup>13</sup>. Por el contrario, estudios recientes muestran que la restricción de metionina no sólo incrementa la longevidad de roedores, sino que también produce una serie de efectos beneficiosos como lentificar el desarrollo de cataratas, minimizar cambios relacionados con la edad en células T o disminuir los valores de glucosa, IGF-1 e insulina en plasma de ratones<sup>81</sup>. La restricción de metionina también disminuye la masa de grasa visceral alrededor de un 40%, los valores de insulina e IGF-1 en plasma, así como la respuesta a glucosa de la insulina, y evita los aumentos de colesterol y triglicéridos en sangre de rata con la edad<sup>86</sup>. El descenso de la masa de grasa visceral apunta a que este cambio, característico de los animales sometidos a RC, quizá no se deba necesariamente al descenso en la ingesta de calorías.

El descenso en la generación de mitROS durante la restricción de metionina, RP y RC puede tener lugar mediante varios mecanismos diferentes. Estas tres manipulaciones de la dieta hacen descender la cantidad de complejo I y IV<sup>11,82,85</sup> en las mitocondrias de rata. El acusado descenso de la concentración de complejo I podría explicar la bajada en la actividad del complejo I detectada en RC<sup>87</sup> y podría ser causa en parte de la menor generación de mitROS durante la RC. Este descenso de la generación de mitROS durante la RC, RP y restricción de metionina podría estar relacionado también con otros mecanismos. La metionina en la dieta puede ser perjudicial debido a su conversión in vivo en homocisteína. La homocisteína tiene un grupo tiólico libre, que puede ser oxidado lo cual conduce a la formación de puentes disulfuro con proteínas. Cuando se añade glutatión oxidado (GSSG) al complejo I mitocondrial, aumenta su tasa de generación de radical superóxido<sup>88</sup>. Este efecto del GSSG podría explicar la correlación directa descrita entre la relación GSSG/GSH y los valores de 8-oxodG en ADN mitocondrial en distintos tejidos de ratones viejos<sup>52</sup>. Por lo tanto, la producción de mitROS podría estar regulada también por agentes con grupos tiólicos como es el caso de la homocisteína, lo que proporciona otro posible mecanismo molecular para explicar los efectos de la restricción y de la suplementación de metionina sobre el estrés oxidativo mitocondrial, el daño oxidativo en los tejidos y la longevidad. Además, el descenso del %FRL podría ser el resultado de una respuesta regulada y no un efecto directo de un metabolito de la metionina. Se sabe que la metionina es una fuente de grupos metilo para diferentes reacciones celulares. Por lo tanto, los cambios en el grado de metilación del ADN podrían ser también una causa, al menos parcial, de los cambios en el valor de expresión de muchos genes que se sabe que ocurren durante la RC<sup>64</sup>. Es

evidente la necesidad de seguir investigando en profundidad los mecanismos moleculares responsables del descenso de producción de mitROS y estrés oxidativo que tiene lugar durante la RC y de metionina.

En resumen, el análisis exhaustivo de la bibliografía disponible indica que el descenso en la tasa de generación de mitROS y del daño oxidativo al ADNmt que se observa durante la RC se debe a la RP, no a la restricción de otros componentes de la dieta, como los lípidos o los hidratos de carbono. Además, la restricción de metionina es capaz de explicar tanto el efecto de la RC como de la RP sobre estos parámetros. La restricción de metionina sería la causa del descenso en la generación de mitROS y en el daño oxidativo al ADNmt. Por otro lado, los tres tipos de manipulaciones de la dieta, RC, RP y de metionina, son capaces de aumentar la longevidad máxima, pero con intensidades diferentes (mayor en la calórica), haciendo, por tanto, que descienda la tasa de envejecimiento y la incidencia de enfermedades degenerativas y de enfermedades asociadas con la edad. Es importante resaltar que las especies longevas y los animales sometidos a RC comparan tasas bajas de generación endógena de daño oxidativo. La metionina desempeña un papel clave disminuyendo la generación de ROS durante la RC y probablemente también esté implicada en reducir la susceptibilidad a la oxidación de las proteínas de especies longevas. Además, y completando este cuadro, las especies longevas presentan lípidos de membrana menos sensibles al estrés oxidativo debido a un menor grado de insaturación de sus ácidos grasos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Harman D. The biological clock: the mitochondria. *J Am Geriatr Soc.* 1972;20:145-7.
2. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 1996;273:59-63.
3. Barja G. Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Rev.* 2004;79:235-51.
4. Barja G. Free radicals and aging. *Trends in Neurosci.* 2004;27:595-600.
5. Barja G, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M. Low mitochondrial free radical production per unit O<sub>2</sub> consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Rad Res.* 1994;21:317-28.
6. Barja G, Cadenas S, Rojas C, López-Torres M, Pérez-Campo R. A decrease of free radical production near critical targets as a cause of maximum longevity. *Comp Biochem Physiol.* 1994;108B:501-12.
7. Gredilla R, Barja G, López-Torres M. Effect of short-term caloric restriction on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria, and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembr.* 2001;33:279-87.
8. Gredilla R, Barja G. The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology.* 2005;146:3713-7.
9. Barja G, Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.* 2000;14:312-8.
10. Gredilla R, Sanz A, López-Torres M, Barja G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J.* 2001;15:1589-91.

11. Sanz A, Caro P, Barja G. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J Bioenerg Biomembr*. 2004;36:545-52.
12. Pamplona R, Portero-Otín M, Riba D, Requena JR, Thorpe SR, López-Torres M, et al. Low fatty acid unsaturation: A mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *J Gerontol*. 2000;55:B286-91.
13. Pamplona R, Barja G. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: The protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757:496-508.
14. Pamplona R, Barja G, Portero-Otín M. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span. A homeoviscous-longevity adaptation? *Ann NY Acad Sci*. 2002;959:475-90.
15. Ruiz MC, Ayala V, Portero-Otín M, Requena JR, Barja G, Pamplona R. Protein methionine content and MDA-lysine adducts are inversely related to maximum life span in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev*. 2005;126:1106-14.
16. Barja de Quiroga G, López-Torres M, Pérez-Campo R. Relationship between antioxidants, lipid peroxidation and aging. En: Emerit I, Chance B, editors. *Free Radicals and Aging*. Basel: Birkhäuser; 1992. p. 109-23.
17. Benzi CD, Moretti A. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Rad Biol Med*. 1995;12:77-101.
18. López-Torres M, Pérez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G. Maximum life span in vertebrates: correlation with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and basal and maximum aerobic capacity. *Mech Ageing Dev*. 1993;70:177-99.
19. López-Torres M, Pérez-Campo R, Cadenas S, Rojas C, Barja G. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol B*. 1998;168:149-58.
20. Harris SB, Weindruch R, Smith GS, Mickey MR, Walford RL. Dietary restriction alone and in combination with oral ethoxyquin/2-mercaptoethylamine in mice. *J Gerontol*. 1990;45:B141-7.
21. López-Torres M, Pérez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G. Simultaneous induction of SOD, glutathione reductase, GSH and ascorbate in liver and kidney correlates with survival throughout the lifespan. *Free Rad Biol Med*. 1993;15:133-42.
22. Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JAC, Hawkins R, Van Duijn W, Verspaget HW, et al. Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Dis*. 2000;7:623-43.
23. Huang TT, Carlsson EJ, Gillespie AM, Shi Y, Epstein CJ. Ubiquitous expression of Cu/Zn superoxide dismutase does not extend lifespan in mice. *J Gerontol*. 2000;55A:B5-9.
24. Mockett RJ, Sohal RS, Orr WC. Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hypoxia but not in normoxia. *FASEB J*. 1999;13:1733-42.
25. Schriener SE, Linford NL, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Edmond M, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*. 2005;308:1909-11.
26. Muller FL, Mele J, Van Remmen V, Richardson A. Proving the in vivo relevance of oxidative stress in aging using knockout and transgenic mice. En: Von Zglinicki T, editor. *Aging at Molecular Level*. Boston: Kluwer; 2003. p. 131-44.
27. Sanz A, Pamplona R, Barja G. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:582-99.
28. Ku HH, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad Biol Med*. 1993;15:621-7.
29. Barja G, Herrero A. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain non-synaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J Bioenerg Biomembr*. 1998;30:235-43.
30. Herrero A, Barja G. Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev*. 1997;98:95-111.
31. Herrero A, Barja G. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved. *Mech Ageing Dev*. 1998;103:133-46.
32. Ku HH, Sohal RS. Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and antioxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential. *Mech Ageing Dev*. 1993;72:67-76.
33. St Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the respiratory chain. *J Biol Chem*. 2002;277:44784-90.
34. Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. Characterization of superoxide producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem*. 2004;279:4127-135.
35. Hekimi S, Guarente L. Genetics and the specificity of the aging process. *Science*. 2003;299:1351-4.
36. Krause F, Scheckhuber CQ, Werner A, Rexroth S, Reifschneider NH, Dencher NA, et al. Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *J Biol Chem*. 2004;279:26453-61.
37. Stroikin Y, Dalen H, Brunk UT, Terman A. Testing the "garbage" accumulation theory of ageing: mitotic activity protects cells from death induced by inhibition of autophagy. *Bioogerontol*. 2005;6:39-47.
38. Boveris A, Cadenas E, Stoppani AOM. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 1976;156:435-44.
39. Takeshige K, Minakami S. NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NAD-ubiquinone reductase preparation. *Biochem J*. 1979;180:129-35.
40. Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*. 1980;191:421-7.
41. Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, et al. The site of production of superoxide radical in mitochondrial complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulphur cluster N2. *FEBS Lett*. 2001;505:364-8.
42. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)+ oxidation-reduction state. *Biochem J*. 2002;368:545-53.
43. Lambert AJ, Brand MD. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem*. 2004;279:39414-20.
44. Ohnishi T, Johnson JE Jr, Yano T, Lobrutto R, Widger WR. Thermodynamic and EPR studies of slowly relaxing ubisemiquinone species in the isolated bovine heart complex I. *FEBS Lett*. 2005;579:500-6.
45. Chen Q, Chen YR, Chen CL, Zhang L, Green-Church KB, Zweier JL. Superoxide production by NADH dehydrogenase induces self-inactivation with specific protein radical formation. *J Biol Chem*. 2005;280:37339-48.
46. Lehninger AL. *Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York: Freeman and Co.; 2005. p. 721-2.
47. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*. 2002;80:780-7.
48. Herrero A, Barja G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the Complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 2000;32:609-15.
49. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 2004;279:49064-73.
50. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *PNAS*. 1990;87:4533-7.
51. Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol*. 1993;34:609-16.
52. Asunción JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardó FV, et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J*. 1996;10:333-8.
53. Herrero A, Barja G. Effect of aging on mitochondrial and nuclear DNA oxidative damage in the heart and brain throughout the life-span of the rat. *J Amer Aging Assoc*. 2001;24:45-50.



54. Hirano T, Yamaguchi R, Asami S, Iwamoto N, Kasai H. 8-hydroxyguanine levels in nuclear DNA and its repair in rat organs associated with age. *J Gerontol.* 1996;51A:B303-7.
55. Foksinski M, Rozalski R, Guz J, Ruzsowska B, Sztukowska P, Ptowarski M, et al. Urinary excretion of DNA repair products correlates with metabolic rates as well as with maximum life spans of different mammalian species. *Free Rad Biol Med.* 2004;37:1449-54.
56. Herrero A, Barja G. 8-oxodeoxyguanosine levels in heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of two mammals and three birds in relation to their different rates of aging. *Aging Clin Exp Res.* 1999;11:294-300.
57. Wang E, Wong A, Cortpassi G. The rate of mitochondrial mutagenesis is faster in mice than in humans. *Mut Res.* 1997;377:157-66.
58. Blanchard JL, Lynch M. Organellar genes. Why do they end up in the nucleus? *Trends in Genetics.* 2000;16:315-20.
59. Bohr VA. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Rad Biol Med.* 2002;32:804-12.
60. Barja G. The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging Clin Exp Res.* 2000;12:342-55.
61. Crott JW, Choi SW, Branda RF, Mason JB. Accumulation of mitochondrial DNA deletions is age, tissue, and folate-dependent in rats. *Mut Res.* 2005;570:63-70.
62. Kraysberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nature Genetics.* 2006;38:518-20.
63. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, et al. Premature aging in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature.* 2004;429:417-23.
64. Weindruch R. Caloric restriction: life span extension and retardation of brain aging. *Clin Neurosci Res.* 2003;2:279-84.
65. Gems D, Partridge L. Insulin IGF-1 signaling and ageing: seeing the bigger picture. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11:287-92.
66. Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev.* 1994;74:121-33.
67. López-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Rad Biol Med.* 2002;32:882-9.
68. Sanz A, Caro P, Ibáñez J, Gómez J, Gredilla R, Barja G. 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.* 2005;37:83-90.
69. Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, et al. Effect of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Amer J Physiol.* 2003;284:R474-80.
70. Pamplona R, Portero-Otín M, Requena J, Gredilla R, Barja G. 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.* 2002;123:1437-46.
71. Stuart JA, Karahalil B, Hogue BA, Souza-Pinto NC, Bohr VA. Mitochondrial and nuclear DNA base excision repair are affected differently by caloric restriction. *FASEB J.* 2004;18:595-7.
72. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science.* 2005;310:314-7.
73. López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *PNAS.* 2006;103:1768-73.
74. Braeckman BP, Houthoofd K, Vanfleteren JR. Assessing metabolic activity in aging *Caenorhabditis elegans*: concepts and controversies. *Aging Cell.* 2002;1:82-8.
75. Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Cullota VC, et al. Caloric restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* life span by increasing respiration. *Nature.* 2002;418:344-8.
76. Yen K, Mastitis JW, Mobbs CV. Lifespan is not determined by metabolic rate: evidence from fishes and *C. elegans*. *Exp Gerontol.* 2004;39:3947-9.
77. Mair W, Piper MDW, Partridge L. Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLOS Biology.* 2005;3:1305-11.
78. Min KJ, Tatar M. Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev.* 2006;127:643-6.
79. Orentreich N, Matias JR, DeFelice A, Zimmerman JA. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr.* 1993;123:269-74.
80. Richie JP Jr, Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy V, Orentreich N, Zimmerman JA. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J.* 1994;8:1302-7.
81. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R. 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.* 2005;4:119-25.
82. Ayala V, Naudí A, Sanz A, Caro P, Portero-Otín M, Barja G, et al. Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *J Gerontol.* 2007;62A:352-60.
83. Sanz A, Caro P, Barja G. Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. *Ann New York Acad Sci.* 2006;1067:200-9.
84. Sanz A, Gómez J, Caro P, Barja G. Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J Bioenerg Biomembr.* 2006;38:327-33.
85. Sanz A, Caro P, Ayala V, Portero-Otín M, Pamplona R, Barja G. Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J.* 2006;20:1064-73.
86. Malloy VL, Krajcik RA, Bailey SJ, Hristopoulos G, Plummer JD, Orentreich N. Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell.* 2006;5:305-14.
87. Hepple RT, Baker DJ, McConkey M, Murynka T, Norris R. Caloric restriction protects mitochondrial function with age in skeletal and cardiac muscles. *Rejuven Res.* 2006;9:219-22.
88. Taylor ER, Hurrell F, Shannon RJ, Lin TK, Hirst J, Murphy MP. Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *J Biol Chem.* 2003;278:19603-10.