



ARTÍCULO ESPECIAL

Glicación de proteínas mitocondriales, estrés oxidativo y envejecimiento

Alba Naudí, Mariona Jové, Victoria Ayala, Manuel Portero-Otín y Reinald Pamplona*

Departamento de Medicina Experimental, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), Universidad de Lleida, Lleida, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 21 de enero de 2010

Aceptado el 3 de febrero de 2010

On-line el 26 de marzo de 2010

Palabras clave:

Productos de glicación avanzada

Dicarbonilos

Glicación

Mitocondria

RESUMEN

Las proteínas mitocondriales pueden ser modificadas por reacciones de glicación inducidas por compuestos dicarbonilo procedentes del metabolismo tales como el glioxal y el metilglioxal. Estas modificaciones provocan cambios estructurales y funcionales en las proteínas implicadas. La modificación del proteoma mitocondrial por estos compuestos dicarbonilo puede inducir disfunción mitocondrial y acentuar un estado de estrés oxidativo. Así, estas modificaciones químicas podrían jugar un papel clave en el proceso fisiológico de envejecimiento y patologías asociadas a la edad, donde se han evidenciado tanto defectos de la actividad mitocondrial como incrementos de compuestos dicarbonilo. Identificar las proteínas mitocondriales específicamente modificadas, aseverar los cambios funcionales derivados y sus implicaciones constituyen líneas de investigación que tendrán su desarrollo en los próximos años.

© 2010 SEGG. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Glycation of mitochondrial proteins, oxidative stress and aging

ABSTRACT

Mitochondrial proteins can be modified by glycation reactions from endogenous dicarbonyl compounds such as physiologically generated methylglyoxal and glyoxal. This modification could cause structural and functional changes in the proteins. Consequently, dicarbonyl attack of the mitochondrial proteome may be an event leading to mitochondrial dysfunction and thus, to oxidative stress. These protein chemical modifications can play an important role in the physiological aging process and age-associated diseases, where both mitochondrial defects and increased dicarbonyl concentrations have been found. Future research should address the functional changes in mitochondrial proteins that are the targets for dicarbonyl glycation.

© 2010 SEGG. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Advanced glycation end-product (AGE)

Dicarbonyl

Glycation

Mitochondria

Introducción

Los estudios experimentales basados en mutaciones que afectan la longevidad de organismos diversos tales como levaduras, nemátodos (*Caenorhabditis elegans*), moscas (*Drosophila melanogaster*) y ratones, demuestran que la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) y, por extensión, el estrés oxidativo, juega un papel causal clave en el proceso de envejecimiento¹.

En este contexto, en un estudio reciente² se describía un nuevo mecanismo capaz de regular la producción mitocondrial de ROS y la longevidad en *C. elegans*: la progresiva modificación de proteínas mitocondriales por metilglioxal (MG), un metabolito dicarbonilo derivado de glicólisis. Los autores de dicho estudio constataron que la sobreexpresión del gen para la glioxalasa 1 (Glo1) en el nemátodo *C. elegans* inducía un aumento de la longevidad. Por el contrario, el silenciamiento de Glo1 reducía

dicha longevidad. Glo1 es otro ejemplo de un «vitagene», un gen que cuando se manipula para cambiar su expresión induce un cambio en la longevidad³. Glo1 es una enzima dependiente de glutatión (GSH) que cataliza el metabolismo de compuestos dicarbonilo reactivos tales como MG y glioxal⁴ previniendo, de este modo, la modificación química de proteínas mediada por dichos compuestos (glicación) (fig. 1). Observaron, asimismo, que las proteínas mitocondriales eran dianas prioritarias de la glicación por dicarbonilos constatándose, además, que un aumento en la glicación de proteínas mitocondriales se asociaba con un aumento de la formación de ROS y un incremento de la lesión del proteoma por procesos oxidativos y nitrosativos. En dicho estudio también se demostró que el proceso de envejecimiento fisiológico de *C. elegans* inducía un declive de la expresión de Glo1 y un aumento de la generación de ROS de origen mitocondrial. La sobreexpresión de Glo1 en *C. elegans* disminuía la glicación por dicarbonilos de las proteínas mitocondriales, así como la formación de ROS, los marcadores de glicación por dicarbonilos del proteoma y también los marcadores de lesión oxidativa y nitrosativa (metionina

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: reinald.pamplona@mex.udl.cat (R. Pamplona).

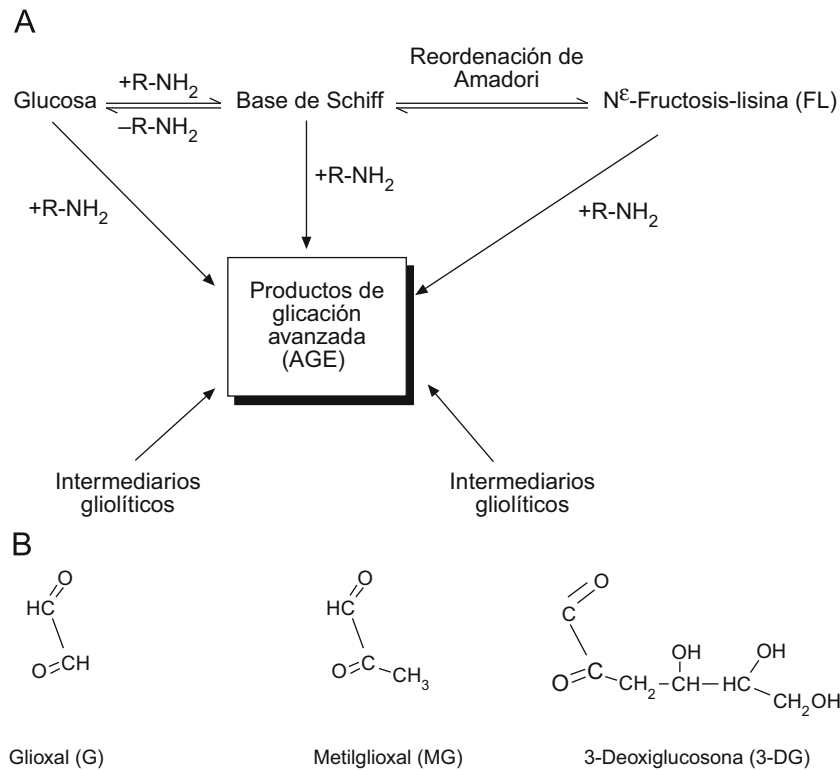


Figura 1. Principales rutas de formación de productos AGE en los sistemas fisiológicos y sus principales metabolitos dicarbonilo precusores. A) Formación de productos de glicación inicial y AGE a partir de glucosa y productos intermediarios gliolíticos y de peroxidación lipídica. B) Compuestos dicarbonilo reactivos generados fisiológicamente.

sulfóxido y 3-nitrotirosina, respectivamente), con un aumento concomitante de la longevidad. Esto indicaba, por primera vez, que la glicación por dicarbonilos podría ser una lesión crítica del proteoma mitocondrial que podría disparar la producción de ROS y la lesión oxidativa durante el proceso de envejecimiento.

Glicación de proteínas

La glicación es una de las principales causas de modificación química (lesión) espontánea de proteínas celulares y extracelulares en los sistemas fisiológicos, afectando a un 0,1–0,2% del total de residuos de lisina y arginina^{5,6}. La glicación por glucosa y otros monosacáridos está dirigida principalmente a grupos amino de residuos de lisina y aminoácidos N-terminales de proteínas, así como residuos de arginina y cisteína^{7,8}.

Para unas condiciones de reactividad dada (temperatura, concentración de sustratos y accesibilidad a los grupos químicos reactivos de los aminoácidos, entre otros), uno de los principales factores que regula el estado basal de lesión es la vida media proteica, o en otras palabras, su tasa de recambio. Para algunas proteínas con un recambio limitado o nulo, tales como las del cristalino, el grado de extensión de la glicación proteica puede llegar a ser hasta 10 veces superior⁹. La mayoría de las proteínas mitocondriales son, sin embargo, de vida corta, con unas tasas de recambio que van de 10–30 min a 3–5 días¹⁰. El «control de calidad» del proteoma mitocondrial implica a proteasas mitocondriales, que conducen a la liberación de péptidos desde la mitocondria¹¹, ubiquitilación y proteólisis de la membrana externa, fisión y fusión mitocondrial, y finalmente autofagia de las mitocondrias lesionadas (mitofagia)¹².

Los productos o compuestos derivados de la fase inicial de glicación se forman en reacciones espontáneas no enzimáticas de monosacáridos con proteínas (fig. 1A). La glucosa entraría en la

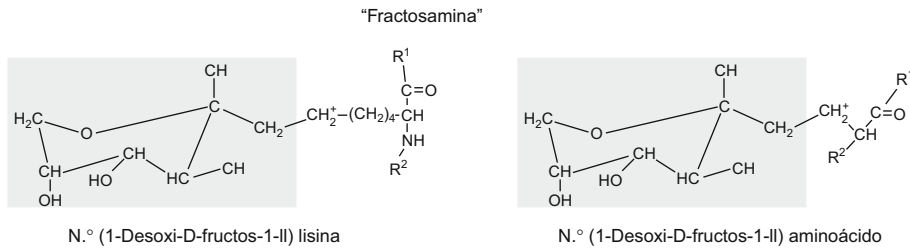
mitocondria a través del transportador de membrana GLUT1 (transportador de glucosa 1), que también transporta vitamina C al interior de la mitocondria.¹³ Dada la baja reactividad de la glucosa per se, los agentes glicantes más importantes a considerar para la lesión por glicación del proteoma mitocondrial son compuestos dicarbonilo reactivos tales como glixal, MG y 3-deoxiglucosona (fig. 1B).

Los compuestos dicarbonilo se forman endógenamente por peroxidación lipídica y degradación de intermediarios gliolíticos y proteínas glicadas. Estos compuestos dicarbonilo son potentes agentes glicantes, entre 200–50.000 veces más reactivos que la glucosa. No obstante, las concentraciones fisiológicas de dicarbonilos típicamente son del orden de 10.000–50.000 veces inferior que la de glucosa. Aún así, los compuestos dicarbonilos continúan siendo, en los sistemas fisiológicos, los precursores más importantes y determinantes de la formación de los denominados productos de glicación avanzada (AGE).

Estadios iniciales de los productos de glicación y AGE

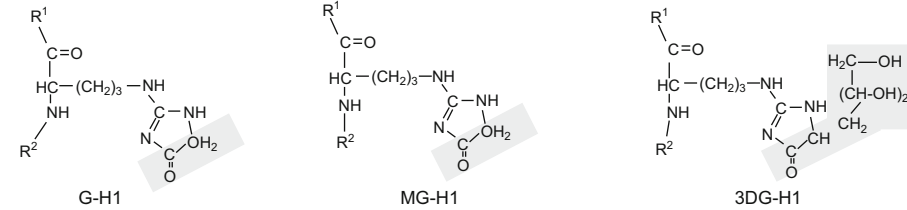
Los aductos (entendido como compuestos químicos originados por combinación directa de dos especies químicas que mantienen en aquel su respectiva ordenación atómica) de glicación originados por glucosa y otros monosacáridos se denominan aductos de glicación de estadios iniciales (fig. 1). El producto de glicación predominante es la N ϵ -fructosil-lisina (FL). La base de Schiff y aductos FL pueden degradarse lentamente en posteriores reacciones avanzadas dando lugar a la formación de numerosos y diferentes aductos de glicación. A estos aductos, de carácter final e irreversible, se les conoce colectivamente como AGE. Sin embargo, los compuestos dicarbonilo (derivados del metabolismo) reaccionan directamente con las proteínas para formar también AGE. Los estudios mediante espectrometría de masas demuestran que

Aduetos de glicación inicial

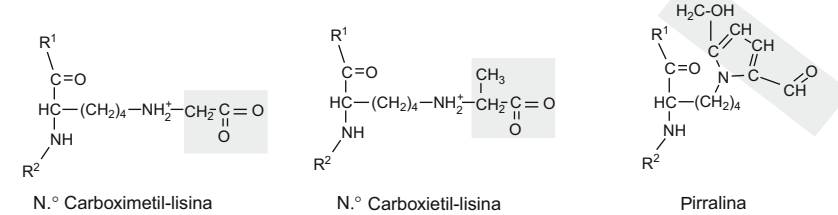


Aduetos de glicación avanzada (AFEs)

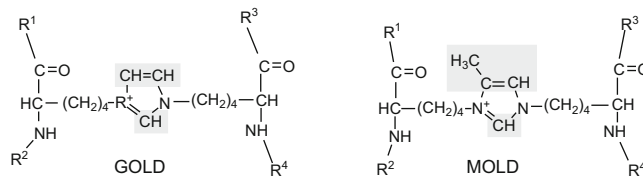
Hidroimidazolonas



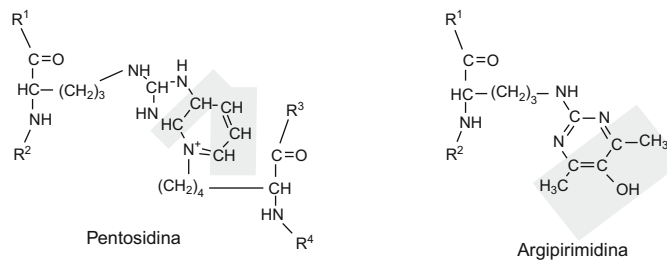
Aduetos derivados de lisina



Entrecruzamientos AGE de lisinas



Entrecruzamientos AGE fluorescentes



Otros

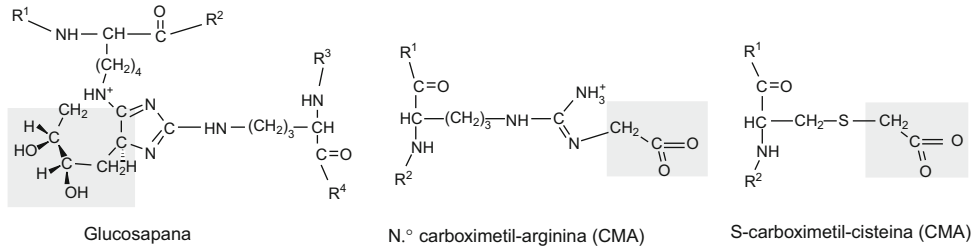


Figura 2. Estructura química de productos de glicación inicial y AGE detectados in vivo.

entre los AGE cuantitativamente importantes se cuentan las hidroimidazolonas derivadas de residuos de arginina modificados por glioxal, MG y 3-deoxiglucosona: G-H1 (N^{β} -[5-hidro-4-imidazolón-

2-il]ornitina), MG-H1 (N^{β} -[5-hidro-5-metil-4-imidazolón-2-il]-ornitina) y 3-deoxiglucosona-H (N^{β} -[5-hidro-5-2,3,4-trihidrobutil-4-imidazolón-2-il]ornitina e isómeros estructuralmente relacionados).

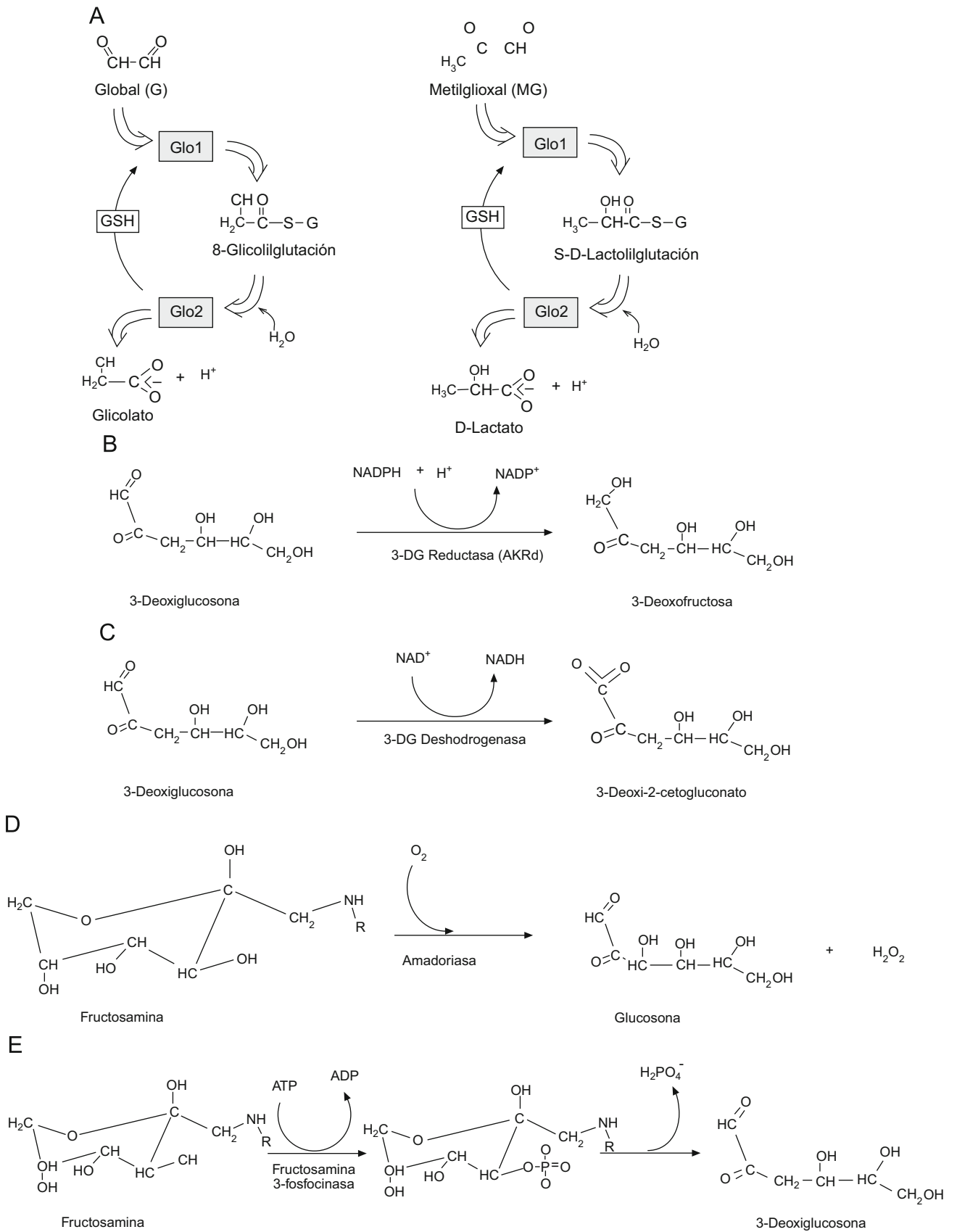


Figura 3. Principales defensas enzimáticas contra la glicación de proteínas.

Otros AGE ampliamente estudiados e importantes comprenden CML (*N*^ε-carboximetil-lisina) y CEL (*N*^ε-carboxietil-lisina), y los compuestos entrecruzados bis-lisil GOLD (derivado de glicoxal) y MOLD (derivado de MG), y los compuestos AGE que también generan entrecruzamientos pentosidina y glucosapana^{6,13-18}. Otros compuestos AGE y derivados relacionados de importancia emergente son CMC (*S*-carboximetil-cisteína)¹⁹, CMA (*N*^ε-carboximetilarginina)²⁰ y ornitina²¹, este último generado como producto de degradación de hidroimidazolonas (fig. 2).

Defensas enzimáticas contra la glicación

Existe un conjunto diverso de enzimas que previenen o reparan la glicación de proteínas en los sistemas fisiológicos^{22,23}. Este mecanismo de defensa involucra actividades enzimáticas que evitan la formación de los aductos de glicación y también aquellas que «reparan» los lugares de glicación inicial. Entre las primeras se enumerarían Glo1, aldo-ceto reductasas y aldehído deshidrogenasa cuyas actividades mantienen dentro de los límites

fisiológicos las concentraciones de dicarbonilos reactivos que se comportan como agentes glicantes^{24,25}; y entre las segundas se contaría con amadoriasas y fructosamina 3-fosfoquinonas, que catalizan la eliminación de residuos FL y aductos libres (fig. 3)²⁶⁻²⁸.

La detección de los aductos de glicación en proteínas, aminofosfolípidos y ácidos nucleicos¹⁸, y el reducido grado de modificación existente en condiciones fisiológicas, nos indican que la defensa enzimática contra la glicación limita el impacto de la lesión a las macromoléculas biológicas, pero que se trata de una defensa imperfecta. Así, en algunos estados patológicos (p. ej.: diabetes, insuficiencia renal crónica y enfermedades neurodegenerativas, entre muchas otras), estos mecanismos de defensa son desbordados, y las concentraciones de los aductos de glicación aumentan. Cabe postular que la progresiva pérdida de expresión de enzimas de defensa contra la glicación podría ser clave en el incremento de glicación de proteínas detectado durante el proceso de envejecimiento.

In vivo, el contenido en productos AGE difiere dependiendo de las características de la/s proteína/s (composición en aminoácidos,

Tabla 1

Niveles de *N*^ε-fructosil-lisina en diferentes proteínas y tejidos de mamífero y en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas*

	Concentración/contenido	Método	Ref.
<i>Albúmina</i>			
Humano	250–500 pmol/mg	RIA	48
+Diabetes	400–1500 pmol/mg		
Humano	3–7 nmol/mg	ELISA	49
+Diabetes	7–24 nmol/mg		
<i>Proteínas plasma</i>			
Humano	1,1 ± 1,6 nmol/mg	HPLC	50
<i>Líquido peritoneal</i>			
Humano	1,2 ± 2,1 nmol/mg	HPLC	50
<i>Lipoproteínas de baja densidad (LDL)</i>			
Humano	0,76–0,80 mmol/mol lisina	GC/MS	51
<i>Proteínas del cristalino</i>			
Humano	0,5–2,0 mmol/mol lisina (no cambia con la edad)	GC/MS	52
Perro	100 ± 20 pmol/mg	HPLC	53
+Diabetes (moderada)	510 ± 620 pmol/mg		
+Diabetes (severa)	2.250 ± 680 pmol/mg		
<i>Colágeno de la piel</i>			
Humano	2,5–5,0 mmol/mol lisina	GC/MS	54
+Diabético (tipo I)	5–25 mmol/mol lisina (cambios mínimos con la edad)		
Humano	400 ± 100 pmol/mg	HPLC	55,56
+Diabetes (tipo I)	920 ± 250 pmol/mg		
+Diabetes (terapia intensiva)	600 ± 75 pmol/mg		
Rata (Brown-Norway)	1,7–2,1 mmol/mol lisina	GC/MS	57
+Restricción dietaria	1,2–1,4 mmol/mol lisina		
Rata (Fischer 344)	290–450 pmol/mg	HPLC	58
+Restricción dietaria	290–350 pmol/mg		
Ratón (C57BL)	100–500 pmol/mg	HPLC	58
+Restricción dietaria	100–350 pmol/mg		
<i>Hemoglobina</i>			
Humano	50,7 ± 6,2 μmol/l	HMF-TBA	59
<i>Proteínas de riñón</i>			
Rata (Sprague-Dawley)	0,25 ± 0,08 mmol/mol lisina	GC/MS	60
+Diabetes	2,90 ± 0,18 mmol/mol lisina		
<i>Proteínas de hígado</i>			
Rata (Sprague-Dawley)	0,52 ± 0,07 mmol/mol lisina	GC/MS	60
+Diabetes	2,59 ± 0,09 mmol/mol lisina		
<i>Aminofosfolípidos de hígado</i>			
Rata	3,43 ± 0,5 pmol HMF/μmol fosfolípidos	HPLC	61
+Diabetes	9,01 ± 1,90 pmol HMF/μmol fosfolípidos		

ELISA: enzyme linked immunoabsorbent assay; GC/MS: gas chromatography/mass spectrometry; HMF-TBA: hydroxymethylfurfural-thiobarbituric acid method; HPLC: high performance liquid chromatography; RIA: radioimmunoassay.

* Adaptado de la literatura.

estructura tridimensional, tasa de recambio, etc.), su localización tisular y el tipo de AGE. Así, se han descrito niveles relativamente elevados de FL (0,1–10 mmol/mol de aminoácido modificado) y MG-H1 (0,1–15 mmol/mol aminoácido modificado), un contenido menor de CML, CEL y CMC (0,05–6 mmol/mol lisina) y cantidades traza de GOLD y MOLD (0,001–0,002 mmol/mol lisina). Las concentraciones más elevadas de FL e hidroimidazolonas han sido descritas en proteínas de cristalino y colágeno de piel de personas de edad avanzada. El contenido de los demás compuestos AGE, sin llegar a los niveles de los anteriores, se han descrito que aumentan con la edad en proteínas de cristalino, matriz extracelular y proteínas de diversos tejidos y especies (tablas 1–3)¹⁸.

La dilucidación de la importancia fisiológica de la glicación de proteínas está actualmente siendo motivo de una intensa actividad científica. No obstante, se han descrito algunos efectos particularmente perjudiciales que afectan a la estructura y función proteica (tabla 4). Así, cabe destacar los efectos nocivos originados por la presencia de entrecruzamientos intra e interproteína que confieren resistencia a la proteólisis; así como los efectos perjudiciales derivados de la modificación de aminoácidos localizados específicamente en aquellos lugares que determinan interacciones proteína-proteína, sustrato-enzima o incluso proteína-ADN, este último especialmente relevante para factores de transcripción.

Especial mención requiere la modificación potencial de los aminoácidos cisteína y metionina. Cisteína y metionina son los únicos aminoácidos que contienen grupos funcionales (grupos

sulfhidrido) que pueden oxidarse de forma reversible bajo diferentes condiciones fisiológicas. Estos grupos químicos se describen como «interruptores» porque su oxidación reversible proporciona un medio de control de la estructura y función proteica. Los grupos sulfhidrido (-SH) de cisteína y metionina pueden sufrir numerosas modificaciones oxidativas, siendo la más estudiada la oxidación reversible de tiol a disulfuro. Cambios en el estado de oxidación/reducción (redox) de tiol/disulfuro afectan la conformación de la proteína, la actividad enzimática, la actividad de transportadores, la unión de ligando a su receptor, las interacciones proteína-proteína, las interacciones proteína-ADN, el tráfico de proteínas y la degradación de las mismas²⁹. Dado que estas propiedades estructurales y funcionales están reguladas por reacciones de carácter reversible, cabe plantearse qué sucedería si dichas modificaciones fueran irreversibles, como es el caso en la formación del compuesto de glicación CMC.

Glicación de proteínas mitocondriales

La modificación de proteínas por productos AGE a nivel mitocondrial ha sido detectada por inmunoensayo y por GC-MS. El inmunoensayo de AGE adolece del problema de caracterización incompleta del epítipo reconocido por los anticuerpos. Así, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 6D12 utilizado para cuantificar el producto de glicación avanzada CML en proteínas de mitocondria de

Tabla 2

Niveles de productos AGE en diferentes proteínas y tejidos de mamífero y en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas*

Muestra	Concentración	Método	Ref.
N^o-carboximetil-lisina			
Proteínas séricas humano	73,2 ± 16,9 pmol/mg	HPLC	62
+Hemodiálisis F8	308,8 ± 94,0 pmol/mg		
+Hemodiálisis F80	275,5 ± 79,1 pmol/mg		
+Diálisis peritoneal	284,5 ± 98,2 pmol/mg		
LDL humano	0,034–0,06 mmol/mol lisina	GC/MS	51
+LDL oxidada	0,67–10,9 mmol/mol lisina		
Colágeno piel humano	0–1,5 mmol/mol lisina (0–80 años)	GC/MS	54
+Diabetes (tipo I)	0,5–2,0 mmol/mol lisina (20–80 años)		
Colágeno piel rata	0,07–0,13 mmol/mol lisina	GC/MS	57
+Restricción dietaria	0,08–0,10 mmol/mol lisina (aumenta de 0–30 meses)		
Proteínas cristalino humano	1,0–8,0 mmol/mol lisina (aumenta de 1–100 años)	GC/MS	52
Colágeno tendón rata	7 ± 2 pmol/mg	HPLC	63
+Diabetes	35 ± 7 pmol/mg		
Mitocondria corazón rata	1.700 μmol/mol lisina	GC/MS	64,65
+Restricción calórica	1.400 μmol/mol lisina		
Mitocondria corazón paloma	1.370 μmol/mol lisina		
Mitocondria músculo esquelético ratón	3.408 μmol/mol lisina	GC/MS	66
Hígado rata, cobaya, cerdo, perro, toro, caballo	700–1.600 μmol/mol lisina	GC/MS	67,69
Músculo esquelético rata	500 μmol/mol lisina	GC/MS	68
Músculo esquelético paloma	780 μmol/mol lisina		
N^o-carboxietil-lisina			
Mitocondria corazón rata	575 μmol/mol lisina	GC/MS	65
+Restricción dietaria	480 μmol/mol lisina		
Mitocondria músculo esquelético ratón	1.459 μmol/mol lisina	GC/MS	66
Músculo esquelético rata	250 μmol/mol lisina	GC/MS	68
Músculo esquelético paloma	700 μmol/mol lisina		
S-carboximetil-cisteína			
Músculo esquelético rata	0,018 ± 0,003 mmol/mol lisina	GC/MS	70
+Diabetes	0,025 ± 0,003 mmol/mol lisina		
Proteínas plasma humano	24,25 ± 10,26 μg/l	LC/MS	71
+Diabetes	55,73 ± 29,43 μg/l		
Mitocondria hígado rata	131,50 ± 7,75 μmol/mol lisina	GC/MS	72
S-carboxietil-cisteína			
Proteínas plasma humano	262,8 ± 132,02 μg/l	LC/MS	71
+Diabetes	521,47 ± 239,13 μg/l		

GC/MS: gas chromatography/mass spectrometry; HPLC: high performance liquid chromatography; LC/MS: liquid chromatography/mass spectrometry.

* Adaptado de la literatura.

Tabla 3
Niveles de los productos AGE pentosidina y pirralina en diferentes proteínas y tejidos de mamífero y en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas*

Muestra	Concentración	Método	Ref.
Pentosidina			
Proteínas plasma humano	0,3–1,6 pmol/mg	HPLC	73
+Diabetes	0,5–4,8 pmol/mg		
+Insuficiencia renal	5–55 pmol/mg		
Hemolisado humano	0,09–0,21 pmol/mg	HPLC	73
+Diabetes	0,05–0,22 pmol/mg		
+Insuficiencia renal	0,2–1,5 pmol/mg		
Orina humano (pentosidina libre)	3–7 uM	HPLC	74
+Diabetes	5–20 uM		
Orina humano (pentosidina total)	4,2 ± 1,4 umol/mol creatinina	HPLC	74
+Diabetes	8,8 ± 4,3 umol/mol creatinina		
Proteínas líquido peritoneal humano	7,7 ± 2,7 pmol/mg	HPLC	50
Colágeno piel musaraña	0–8 pmol/mg (0–3 años)	HPLC	75
Colágeno piel rata	0–3 pmol/mg (0–24 meses)		
+Restricción calórica	0–2 pmol/mg (0–24 meses)		
Colágeno piel toro	0–30 pmol/mg (0–14 años)		
Colágeno piel cerdo	0–20 pmol/mg (0–14 años)		
Colágeno piel mono Rhesus	2–12 pmol/mg (0–25 años)		
Colágeno piel mono Squirrel	0–18 pmol/mg (0–25 años)		
Colágeno piel humano	0–100 pmol/mg (0–100 años)		
Colágeno piel rata	2–5 umol/mol lisina	GC/MS	57
+Restricción dietaria	1,8–2,7 umol/mol lisina (de 10–30 meses)		
Colágeno cartílago humano	0–80 mmol/mol colágena (de 0–80 años)	HPLC	76
Colágeno duramadre humano	25–225 pmol/mg (0–80 años)	HPLC	77
Cristalino humano fracción soluble	0–0,6 pmol/mg	HPLC	77
Cristalino humano fracción insoluble	1–1,5 pmol/mg		
Cristalino brunesciente	Aumentado (2–5 veces)		
+Diabetes	Aumentado (1,5–2,5 veces)		
Cristalino perro fracción insoluble	1,2 ± 0,3 pmol/mg	HPLC	53,56
+Diabetes moderadas	1,3 ± 2,7 pmol/mg		
+Diabetes severa	15,5 ± 16,1 pmol/mg		
Colágeno tendón cola rata 6 meses	1,24 ± 0,22 pmol/mg	HPLC	75
Colágeno tendón cola rata 18 meses	2,48 ± 0,60 pmol/mg		
Colágeno pulmón rata	40–120 pmol/mg colágena (3–25 meses)	HPLC	78
Pirralina			
Albumina humano	20–40 pmol/mg	ELISA	79
+Diabetes	30–60 pmol/mg		
Proteínas plasma humano	115 ± 36 uM	ELISA	80
+Diabetes	211 ± 103 uM		
Proteínas plasma rata	194 ± 79 uM	ELISA	80
+Diabetes	627 ± 189 uM		
Proteínas plasma humano	12,8 ± 5,6 pmol/mg	HPLC	81
+Diabetes	21,6 ± 9,6 pmol/mg		
Cristalino humano (50–70 años)	30,9 ± 10,2 pmol/mg	HPLC	82
+Cataratas	48,4 ± 12,6 pmol/mg		
+Diabetes	28,4 ± 15,3 pmol/mg		
Orina humano	1,21 ± 0,40 µg/mg creatinina	HPLC	83
+Diabetes	1,37 ± 0,6 µg/mg creatinina (rango 0,24–4,01)		

ELISA: enzyme linked immunoabsorbent assay; GC/MS: gas chromatography/mass spectrometry; HPLC: high performance liquid chromatography.

* Adaptado de la literatura.

Tabla 4
Efectos de la modificación proteica por productos AGE sobre las propiedades físico-químicas y biológicas

<ul style="list-style-type: none"> ● La formación de AGE tiene lugar sobre proteínas, aminofosfolípidos y ácidos nucleicos ● La modificación por AGE es irreversible ● Su formación en proteínas confiere resistencia a la proteólisis ● Los productos AGE pueden dar lugar a la formación de entrecruzamientos inter e intramoleculares ● Su formación sobre los lípidos induce su oxidación ● Los AGE pueden reaccionar-atrapar radicales libres 	<ul style="list-style-type: none"> ● Alteraciones de la movilidad electroforética por cambios en la carga de las cadenas laterales ● Alteración de la solubilidad y tendencia a la formación de agregados y productos de elevado peso molecular ● Aletración de la estabilidad térmica ● Cambios conformacionales y distorsiones estructurales ● Pérdidas funcionales ● Alteración en las interacciones proteína-proteína, ligando-proteína, proteína-AND
--	---

AGE: productos de glicación avanzada.

hígado de rata^{30,31} detecta tanto CML como CEL con diferentes afinidades (el último con mayor afinidad que el primero³²) y no puede ser utilizado con la intención de cuantificar el contenido

proteico en productos AGE específicos. Cabe recordar que el recurso técnico que pasa por la utilización de proteína de leche deshidratada, u otras proteínas de origen animal, para la supresión de las uniones

Tabla 5

Efecto de la restricción calórica, proteica y de metionina en los productos de glicación derivados de metilglicoxal y glicoxal (CML, CEL y CMC) de diferentes tejidos de rata

Órgano	Tipo de restricción dietaria (%)	Duración de la restricción dietaria	Efecto sobre los productos AGE	Ref.
Mitocondria hígado	8,5% RC	7 semanas	↓	84
Mitocondria hígado	25% RC	7 semanas	↓	84
Mitocondria corazón	40% RC	4 meses	↓	85
Mitocondria corazón	40% CR	1 año	↓	86
Mitocondria hígado	40% RC	4–24 meses	↓	87
Hígado	40% RC	6 semanas	↓	88
Hígado	40% RP	7 semanas	↓	89
Mitocondria hígado	40% RMet	7 semanas	↓	90
Mitocondria hígado	80% RMet	7 semanas	↓	90,91
Mitocondria corazón	80% RMet	7 semanas	↓	91
Cerebro	80% RMet	7 semanas	↓	92

RC: restricción calórica; RMet: restricción de metionina; RP: restricción proteica.

Tabla 6

Proteínas mitocondriales susceptibles a la modificación por productos AGE y oxidación de grupos tiol

Proteínas mitocondriales modificadas por AGE	AGE	Proteínas mitocondriales susceptibles a la oxidación de grupos tiol
Enoil-CoA hidratasa mitocondrial	MG-H1	Enoil-CoA hidratasa, cadena corta 1, mitocondrial
Complejo III, «core protein 1»		Complejo III, «core protein 1»
NADH-ubiquinona oxireductasa subunidad 30 kDa complejo I		Acil-CoA deshidrogenasa
F1-ATPasa, cadena G		Carnitina acetiltransferasa
Flavoproteína subunidad beta		Acil-CoA tioesterasa mitocondrial 2
Citocromo c1, complejo III		Proteína trifuncional mitocondrial, subunidad alfa
Glutamato deshidrogenasa	CML/CEL	Propionil-CoA carboxilasa, cadena alfa
		Piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 2

AGE: productos de glicación avanzada; CEL: *Nε*-carboxietil-lisina; CML: *Nε*-carboximetil-lisina.

no específicas, genera probablemente interferencias dado que constituyen por sí mismas una rica fuente de CML y otros compuestos AGE³³. No obstante, cabe indicar que la inmunohistoquímica de tejidos con 6D12 y otros anticuerpos anti-AGE como el 1F6 y el 2A2 todos ellos muestran inmunoreactividad compatible con reactividad mitocondrial en tejidos humanos³⁴.

Las estimaciones de las concentraciones de AGE en proteínas mitocondriales con métodos analíticos más precisos provienen de los estudios utilizando análisis de dilución isotópica/GC-MS (tablas 1–3). En dichos trabajos se detectaron y cuantificaron 1–2 mmol de CML/mol de lisina en proteínas mitocondriales de corazón de rata; por el contrario, el contenido de CML determinado por inmunoensayo con el anticuerpo 6D12 sobreestimaba aproximadamente 10 veces dicho contenido respecto al estudio mencionado anteriormente. El contenido del aducto CEL en proteínas mitocondriales era aproximadamente de 0,5 mmol/mol de lisina, y el de CMC era del orden de 0,1–0,2 mmol/mol de lisina. El contenido en proteínas mitocondriales de estos compuestos, CML, CEL y CMC, disminuían con la restricción calórica (tabla 5).

Respecto a otros AGE, como los derivados de arginina, la cuantificación del contenido de productos AGE en proteínas mitocondriales mediante técnicas de inmunotransferencia se han llevado a cabo con uno de los mejores anticuerpos monoclonales caracterizados contra productos AGE: el anticuerpo monoclonal 1H7G5 que reconoce MG-H1, la hidroimidazolona derivada de MG³⁵. La detección y cuantificación con este anticuerpo demostró la presencia de dicho AGE en proteínas mitocondriales de *C. elegans* y una disminución de la concentración de este compuesto en *C. elegans* transgénicos sobreexpresores de Glo1¹. Utilizando la misma técnica, también se demostró la presencia de MG-H1 en proteínas de mitocondrias aisladas del cortex renal de rata, estando aumentado el mismo por la diabetes³⁶.

La identidad de proteínas específicas modificadas por productos AGE han sido tan solo establecidas por inmunoreactividad con anticuerpos anti-AGE, no habiendo sido corroboradas dichas modificaciones mediante análisis de espectrometría de masas. Así, se ha sugerido que la glutamato deshidrogenasa es una diana de la modificación por productos AGE mediante inmunodetección con el anticuerpo 6D12³⁷. Otras proteínas mitocondriales identificadas por esta técnica y susceptibles de ser modificadas por MG³⁶ se ofrecen en la tabla 6.

Efecto de los compuestos carbonilo generados fisiológicamente sobre la función mitocondrial

Para demostrar que la modificación por AGE del proteoma mitocondrial puede conducir a alteraciones en la función mitocondrial cabe recordar que la incubación de mitocondrias de riñón de rata con MG (10–200 μM) durante tan solo 5 min a 24 °C produce una disminución concentración-dependiente de la respiración en estado 3, un aumento y posterior disminución de la respiración en estado 4 y una disminución del coeficiente de control respiratorio³⁸. Estos efectos observados en un período de incubación tan corto probablemente son debidos a modificaciones que afectan a grupos cisteinil-tiol³⁹. Así, grupos tiol reactivos ubicados en la superficie de la proteína se encuentran en péptidos de los complejos mitocondriales I, II y IV⁴⁰, y se han identificado proteínas con grupos tiol potencialmente susceptibles a la modificación (Tabla 6)⁴¹. En condiciones fisiológicas, la concentración intracelular de MG es de aproximadamente 2–4 μM.⁴² Se estima que aproximadamente un 25% del MG está ligado reversiblemente a GSH y un 50% a tioles proteicos (asumiendo una concentración intracelular de GSH y tioles proteicos de 3 y 6 mM, respectivamente⁴³, y una constante de disociación tiol/MG de 3 mM³). No está claro si a concentraciones fisiológicas de MG

existe un efecto agudo sobre la respiración mitocondrial, y de existir se trataría de un efecto modesto de disminución de la respiración en estado 3. Considerando los niveles basales de los diferentes productos AGE detectados y cuantificados a nivel tisular, y especialmente a nivel mitocondrial, y las consecuencias estructurales y funcionales que la modificación de proteínas por productos AGE conlleva, es más que probable que parte de los cambios fisiológicos asociados a la edad, así como en diferentes situaciones patológicas, sean debidos a la modificación irreversible por productos AGE de grupos tiol mitocondriales.

Modificación por dicarbonilos del proteoma mitocondrial

Existen estimaciones que indican que el proteoma mitocondrial está constituido por unas, aproximadamente, 1.500 proteínas. De entre ellas, solo 13 proteínas implicadas en la cadena respiratoria-fosforilación oxidativa son codificadas por el genoma mitocondrial; el resto son proteínas nucleares, sintetizadas en el citosol e importadas a la mitocondria⁴⁴. A día de hoy, 7 son las proteínas que se han sugerido como potenciales dianas susceptibles de formación de productos AGE (tabla 6). Se desconocen, sin embargo, las consecuencias de un incremento del grado de modificación por MG y/o glioxal de dichas proteínas mitocondriales. Enoil-CoA hidratasa está implicada en la β -oxidación de ácidos grasos. La «core protein I» del complejo III es susceptible a la S-carboximetilación y su modificación inhibe la actividad de la cadena de transporte electrónico⁴⁵. Otras dianas de la modificación por compuestos dicarbonilo son diferentes subunidades del complejo I y la F₁-ATPasa. La flavoproteína subunidad- β también estaba sujeta a modificación por glicación. Se sabe que la modificación de un único residuo de arginina impide la transferencia electrónica⁴⁶. Por último, citocromo c₁ forma parte del complejo citocromo bc₁ del complejo III, una proteína citocromo tipo-c de 30 kDa que se une a la membrana y que funciona como una proteína donante de electrones a la citocromo c⁴⁷. Los resultados de los diferentes experimentos de incubación de glioxal y MG con mitocondrias aisladas y la aparente facilidad de difusión de dichos dicarbonilos apoyan el mecanismo postulado: la modificación del proteoma mitocondrial por dicarbonilos derivados del metabolismo contribuiría al deterioro de la función mitocondrial durante el proceso de envejecimiento y patologías asociadas.

Conclusión

La modificación de proteínas por compuestos dicarbonilo y la detoxificación mediada por el sistema glioxalasa son factores que modulan el estado basal de estrés oxidativo celular y la actividad mitocondrial. Dichos efectos se traducen en la capacidad de modificar la longevidad de una especie. Asimismo, la capacidad potencial de generar una disfunción mitocondrial se puede traducir, en determinadas circunstancias, en unas condiciones de estrés oxidativo que puede subyacer en la aparición y progresión de diferentes patologías asociadas a la edad. La caracterización de las dianas proteicas de modificación por compuestos dicarbonilo, en especial referidas al proteoma mitocondrial, y sus implicaciones funcionales constituye uno de los retos actuales prioritarios.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Las investigaciones llevadas a cabo por los autores de este trabajo han sido subvencionadas por ayudas de I+D del Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2009-11879/BFI), el Ministerio de Sanidad y Consumo (RD06/0013/0012) y la Generalitat de Catalunya (2009SGR735) a RP.

Este trabajo ha recibido el Premio Pañella Casas otorgado por la SEGG.

Bibliografía

- Guarente L. Mitochondria. A nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell*. 2008;132:171–6.
- Morcos M, Du X, Pfisterer F, Hutter H, Sayed AA, Thornalley P, et al. Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2008;7:260–9.
- Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, Panebianco M, Calafato S, Puleo E, et al. Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochem Res*. 2007;32:757–73.
- Thornalley PJ. The glyoxalase system in health and disease. *Mol Aspects Med*. 1993;14:287–371.
- Thornalley PJ. The clinical significance of glycation. *Clin Lab*. 1999;45:263–73.
- Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babaei-Jadidi R, et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J*. 2003;375:581–92.
- Thornalley PJ. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann NY Acad Sci*. 2005;1043:111–7.
- Thorpe SR, Baynes JW. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids*. 2003;25:275–81.
- Ahmed N, Thornalley PJ, Dawczynski J, Franke S, Strobel J, Stein G, et al. Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Invest Ophthalmol Visual Sci*. 2003;44:5287–92.
- Bota DA, Davies KJA. Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders. *Mitochondrion*. 2001;1:33–49.
- Augustin S, Nolden M, Muller S, Hardt O, Arnold I, Langer T. Characterization of peptides released from mitochondria: evidence for constant proteolysis and peptide efflux. *J Biol Chem*. 2005;280:2691–9.
- Tatsuta T, Langer T. Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J*. 2008;27:306–14.
- KC S, Cárcamo JM, Golde DW. Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucosa transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury. *FASEB J*. 2005;19:1657–67.
- Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CA, Thornalley PJ. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N^ε-carboxymethyllysine- and N^ε-(1-carboxylethyl)lysine-modified albumin. *Biochem J*. 2002;364:1–14.
- Thorpe SR, Baynes JW. CML: a brief history. *Int Congr Ser*. 2002;1245:91–9.
- Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix: implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem*. 1989;264:21597–602.
- Biemel KM, Friedl DA, Lederer MO. Identification and quantification of major Maillard cross-links in human serum albumin and lens protein: evidence for glucosepane as the dominant compound. *J Biol Chem*. 2002;277:24907–15.
- Portero-Otin M, Pamplona R. Is endogenous oxidative protein damage involved in the aging process? En: Pietzsch J, editor. *Protein Oxidation and Disease*. Kerala, India: Research Signpost; 2006.
- Zeng J, Davies MJ. Evidence for the formation of adducts and S-(carboxymethyl)cysteine on reaction of α -dicarbonyl compounds with thiol groups on amino acids, peptides, and proteins. *Chem Res Toxicol*. 2005;18:1232–41.
- Odani H, Iijima K, Nakata M, Miyata S, Kusunoki H, Yasuda Y, et al. Identification of N ω -carboxymethylarginine, a new advanced glycation end-product in serum proteins of diabetic patients: possibility of a new marker of aging and diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;285:1232–6.
- Sell DR, Monnier VM. Conversion of arginine into ornithine by advanced glycation in senescent human collagen and lens crystallins. *J Biol Chem*. 2004;279:54173–84.
- Monnier VM, Sell DR, Nagaraj RH, Miyata S. Mechanisms of protection against damage mediated by the Maillard reaction in aging. *Gerontology*. 1991;37:152–65.
- Thornalley PJ. Glyoxalase I – structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans*. 2003;31:1343–8.
- Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, Beisswenger PJ, Thorpe SR, Onorato J, et al. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest*. 1998;101:1142–7.

25. Suzuki K, Koh YH, Mizuno H, Hamaoko R, Taniguchi N. Overexpression of aldehyde reductase protects PC12 cells from the cytotoxicity of methylglyoxal or 3-deoxyglucosone. *J Biochem (Tokyo)*. 1998;123:353–7.
26. Takahashi M, Pischetsrieder M, Monnier VM. Isolation, purification, and characterization of amadoriase isoenzymes (fructosyl amine-oxygen oxidoreductase EC 1.5.3) from *Aspergillus* sp. *J Biol Chem*. 1997;272:3437–43.
27. Delpierre G, Rider MH, Collard F, Stroobant V, Vanstapel F, Santos H, et al. Identification, cloning, and heterologous expression of a mammalian fructosamine-3-kinase. *Diabetes*. 2000;49:1627–34.
28. Szwergold BS, Howell S, Beisswenger PJ. Human fructosamine-3-kinase: purification, sequencing, substrate specificity, and evidence of activity *in vivo*. *Diabetes*. 2001;50:2139–47.
29. Kemp M, Go YM, Jones DP. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med*. 2008;44:921–37.
30. Bakala H, Delaval E, Hamelin M, Bismuth J, Borot-Laloi C, Corman B, et al. Changes in rat liver mitochondria with aging: Lon protease-like reactivity and N^ε-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. *Eur J Biochem*. 2003;270:2295–302.
31. Alikhani ZB, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem*. 2005;280:12087–95.
32. Koito W, Araki T, Horiuchi S, Nagai R. Conventional antibody against N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML) shows cross-reaction to N^ε-(carboxyethyl)lysine (CEL): immunochemical quantification of CML with a specific antibody. *J Biochem (Tokyo)*. 2004;136:831–7.
33. Drusch S, Faist V, Erbersdobler H. Determination of N^ε-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chem*. 1999;65:547–53.
34. Ling X, Sakashita N, Takeya M, Nagai R, Horiuchi S, Takahashi K. Immunohistochemical distribution and subcellular localization of three distinct specific molecular structures of advanced glycation end products in human tissues. *Lab Invest*. 1998;78:1591–606.
35. Giardino I, Thornalley PJ, Edelstein D, Brownlee M. Generation and characterisation of an antibody against AGEs that induce endothelial dysfunction. *Diabetes*. 1998;47:A123.
36. Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, Ozdemir AM, Kern TS, Szewda LI, et al. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289:F420–30.
37. Hamelin M, Mary J, Vostry M, Friguet B, Bakala H. Glycation damage targets glutamate dehydrogenase in the rat liver mitochondrial matrix during aging. *Eur J Biochem*. 2007;274:5949–61.
38. Rosca MG, Monnier VM, Szewda LI, Weiss MF. Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283:F52–9.
39. Lo TWC, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions: a kinetic and mechanistic study with N_ε-acetylarginine, N_ε-acetylcysteine, and N_ε-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem*. 1994;269:32299–305.
40. Lin TK, Hughes G, Muratovska A, Blaikie FH, Brookes PS, Darley-Usmar V, et al. Specific modification of mitochondrial protein thiols in response to oxidative stress: a proteomic approach. *J Biol Chem*. 2002;277:17048–56.
41. Hurd TR, Prime TA, Harbour ME, Lilley KS, Murphy MP. Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: implications for mitochondrial redox signaling. *J Biol Chem*. 2007;282:22040–51.
42. Dobler D, Ahmed N, Song LJ, Eboigbodin KE, Thornalley PJ. Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by RGD and GFOGER motif modification. *Diabetes*. 2006;55:1961–9.
43. Mistry P, Merazga Y, Spargo DJ, Riley PA, McBrien DCH. The effects of cisplatin on the concentration of protein thiols and glutathione in the rat kidney. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1991;28:277–82.
44. Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S, et al. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotech*. 2003;21:281–6.
45. Gellerfors P, Lunden M, Nelson BD. Evidence for a function of core protein in complex III from beef-heart mitochondria. *Eur J Biochem*. 1976;67:463–8.
46. Parker AR. A single arginine residue is required for the interaction of the electron transferring flavoprotein (ETF) with three of its dehydrogenase partners. *Mol Cell Biochem*. 2003;254:91–100.
47. Xia D, Yu CA, Kim H, Xian JZ, Kachurin AM, Zhang L, et al. Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science*. 1997;277:60–6.
48. Nakayama H, Taneda S, Manda N, Aoki S, Komori K, Kuroda Y, et al. Radioimmunoassay for nonenzymatically glycosylated protein in human serum. *Clin Chim Acta*. 1986;158:293–9.
49. Nakayama H, Makita Z, Kato M, Taneda S, Yoshida H, Yanagisawa K, et al. Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for non-enzymatically glycosylated serum protein. *J Immunol Methods*. 1987;99:95–100.
50. Friedlander MA, Wu YC, Elgavish A, Monnier VM. Early and advanced glycosylation end products. Kinetics of formation and clearance in peritoneal dialysis. *J Clin Invest*. 1996;97:728–35.
51. Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, N-epsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem*. 1996;271:9982–6.
52. Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR, Baynes JW. Oxidation of glycosylated proteins: age-dependent accumulation of N-epsilon-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochemistry*. 1989;28:9464–8.
53. Nagaraj RH, Kern TS, Sell DR, Fogarty J, Engerman RL, Monnier VM. Evidence of a glycemic threshold for the formation of pentosidine in diabetic dog lens but not in collagen. *Diabetes*. 1996;45:587–94.
54. Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, et al. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest*. 1993;91:2463–9.
55. Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. *Arch Biochem Biophys*. 2003;419:1–15.
56. Lyons TJ, Bailie KE, Dyer DG, Dunn JA, Baynes JW. Decrease in skin collagen glycation with improved glycemic control in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1991;87:1910–5.
57. Cefalu WT, Bell-Farrow AD, Wang ZQ, Sonntag WE, Fu MX, Baynes JW, et al. Caloric restriction decreases age-dependent accumulation of the glycoxidation products, N-epsilon-(carboxymethyl)lysine and pentosidine, in rat skin collagen. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1995;50:B337–41.
58. Sell DR. Ageing promotes the increase of early glycation Amadori product as assessed by epsilon-N-(2-furoylmethyl)-L-lysine (furosine) levels in rodent skin collagen. The relationship to dietary restriction and glycoxidation. *Mech Ageing Dev*. 1997;95:81–99.
59. Prat J, Pamplona R, Sorribas A, Martin S, Viñallonga M, Segura R. Correlation of plasma lipid fractions with colorimetrically determined glycosylated hemoglobin in a nondiabetic population. *Metabolism*. 1989;38:1147–53.
60. Portero-Otín M, Pamplona R, Ruiz MC, Cabiscol E, Prat J, Bellmunt MJ. Diabetes induces an impairment in the proteolytic activity against oxidized proteins and a heterogeneous effect in nonenzymatic protein modifications in the cytosol of rat liver and kidney. *Diabetes*. 1999;48:2215–20.
61. Pamplona R, Bellmunt MJ, Portero M, Riba D, Prat J. Chromatographic evidence for Amadori product formation in rat liver aminophospholipids. *Life Sci*. 1995;57:873–9.
62. Friedlander MA, Hricik DE. Optimizing end-stage renal disease therapy for the patient with diabetes mellitus. *Semin Nephrol*. 1997;17:331–45.
63. Elgavish A, Glomb M, Friedlander M, Monnier VM. Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by high glucose *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*. 1996;271:12964–71.
64. Pamplona R, Portero-Otín M, Requena JR, Thorpe SR, Herrero A, Barja G. A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech Ageing Dev*. 1999;106:283–96.
65. Pamplona R, Portero-Otín M, Requena J, Gredilla R, Barja G. Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls. *Mech Ageing Dev*. 2002;123:1437–46.
66. Brand MD, Pamplona R, Portero-Otín M, Requena JR, Roebuck SJ, Buckingham JA, et al. Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. *Biochem J*. 2002;368:597–603.
67. 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 A Biol Sci Med Sci*. 2000;55:B286–91.
68. Portero-Otín M, Requena JR, Bellmunt MJ, Ayala V, Pamplona R. Protein nonenzymatic modifications and proteasome activity in skeletal muscle from the short-lived rat and long-lived pigeon. *Exp Gerontol*. 2004;39:1527–35.
69. Pamplona R, Requena JR, Portero-Otín M, Prat J, Thorpe SR, Bellmunt MJ. Carboxymethylated phosphatidylethanolamine in mitochondrial membranes of mammals—evidence for intracellular lipid glycoxidation. *Eur J Biochem*. 1998;255:685–9.
70. Altr N, Carson JA, Alderson NL, Wang Y, Nagai R, Henle T, et al. Chemical modification of muscle protein in diabetes. *Arch Biochem Biophys*. 2004;425:200–6.
71. Mostafa AA, Randell EW, Vasdev SC, Gill VD, Han Y, Gadag V, et al. Plasma protein advanced glycation end products, carboxymethyl cysteine, and carboxyethyl cysteine, are elevated and related to nephropathy in patients with diabetes. *Mol Cell Biochem*. 2007;302:35–42.
72. Naudí A, Jove M, Portero-Otín M, Pamplona R. Formación de S-(Carboximethyl)cisteína *in vivo*. Efecto de la restricción dietaria. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2008;43:32.
73. Odetti P, Fogarty J, Sell DR, Monnier VM. Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes*. 1992;41:153–9.
74. Takahashi M, Kushida K, Kawana K, Ishihara C, Denda M, Inoue T, et al. Quantification of the cross-link pentosidine in serum from normal and uremic subjects. *Clin Chem*. 1993;39:2162–5.
75. Sell DR, Lane MA, Johnson WA, Masoro EJ, Mock OB, Reiser KM, et al. Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:485–90.

76. Uchiyama A, Ohishi T, Takahashi M, Kushida K, Inoue T, Fujie M, et al. Fluorophores from aging human articular cartilage. *J Biochem.* 1991;110:714–8.
77. Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem.* 1989;264:21597–602.
78. Bellmunt MJ, Portero M, Pamplona R, Cosso L, Odetti P, Prat J. Evidence for the Maillard reaction in rat lung collagen and its relationship with solubility and age. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1272:53–60.
79. Hayase F, Nagaraj RH, Miyata S, Njoroge FG, Monnier VM. Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during maillard reaction in vivo. *J Biol Chem.* 1989;264:3758–64.
80. Miyata S, Monnier V. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline. *J Clin Invest.* 1992;89:1102–12.
81. Portero-Otín M, Nagaraj RH, Monnier VM. Chromatographic evidence for pyrraline formation during protein glycation in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1247:74–80.
82. Nagaraj RH, Sady C. The presence of a glucose-derived Maillard reaction product in the human lens. *FEBS Lett.* 1996;382:234–8.
83. Portero-Otín M, Pamplona R, Bellmunt MJ, Bergua M, Nagaraj RH, Prat J. Urinary pyrraline as a biochemical marker of non-oxidative Maillard reactions in vivo. *Life Sci.* 1997;60:279–87.
84. Gómez J, Caro P, Naudí A, Portero-Otín M, Pamplona R, Barja G. Effect of 8.5% and 25% caloric restriction on mitochondrial free radical production and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology.* 2007;8:555–66.
85. Pamplona R, Portero-Otín M, Requena JR, Gredilla R, Barja G. Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls. *Mech Ageing Dev.* 2002;123:1437–46.
86. Pamplona R, Portero-Otín M, Bellmunt MJ, Gredilla R, Barja G. Aging increases Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and caloric restriction decreases Nepsilon-(carboxyethyl)lysine and Nepsilon-(malondialdehyde)lysine in rat heart mitochondrial proteins. *Free Radic Res.* 2002;36:47–54.
87. Lambert AJ, Portero-Otín M, Pamplona R, Merry BJ. Effect of aging and caloric restriction on specific markers of protein oxidative damage and membrane peroxidizability in rat liver mitochondria. *Mech Ageing Dev.* 2004;125:529–38.
88. Sanz A, Gredilla R, Pamplona R, Portero-Otín M, Vara E, Tresguerres JA, et al. Effect of insulin and growth hormone on rat heart and liver oxidative stress in control and caloric restricted animals. *Biogerontology.* 2005;6:15–26.
89. 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 A Biol Sci Med Sci.* 2007;62:352–60.
90. Caro P, Gómez J, López-Torres M, Sánchez I, Naudí A, Jové M, et al. Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology.* 2008;9:183–96.
91. 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.
92. Naudí A, Caro P, Jové M, Gómez J, Boada J, Ayala V, et al. Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation Res.* 2007;10:473–84.