



Universitat de Lleida

MECANISMES D'ACCIÓ DE DIFERENTS TIPUS
D'INTERVENCIIONS NUTRICIONALS SOBRE L'ESTRÈS OXIDATIU
I LES SEVES IMPLICACIONS EN EL PROCÉS FISIOLÒGIC DE
L'ENVELLIMENT

ALBA NAUDÍ I FARRÉ

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

DISCUSSIÓ

26. L'EFECTE DE LES INTERVENCIIONS NUTRICIONALS SOBRE EL DANY OXIDATIU ENDOGEN

La reducció de la ingesta de calories sense malnutrició és una de les intervencions nutricionals més consistents la qual incrementa la vida mitja i la longevitat màxima de diferents espècies, des dels invertebrats fins als primats. Existeixen diferents estudis en rosegadors, principalment rata i ratolí, els quals demostren que una restricció calòrica disminueix la generació de ROS mitocondrial i el dany oxidatiu endogen en diferents teixits, com en fetge, cor, cervell, múscul esquelètic i ronyó. Aquesta disminució s'observa sempre en una restricció a llarg termini (mínim un any) i depenent del teixit a curt o mig termini (de 6 setmanes a 6 mesos) (Pamplona, Barja 2006, Gredilla, Barja 2005). Per tal de determinar els possibles mecanismes pels quals la restricció calòrica produeix aquest efecte s'han realitzat diferents experiments variant la composició de la dieta. En referència als tres components bàsics d'aquesta, els carbohidrats, els lípids i les proteïnes, només aquestes últimes han demostrat produir un efecte beneficiós. És a dir, una restricció proteica del 40% independentment de la disminució de calories és capaç de disminuir la producció mitocondrial de ROS en fetge de rata (Sanz, Caro & Barja 2004), efecte que no s'ha vist reproduït ni per una restricció lipídica (Sanz et al. 2006a) ni de carbohidrats (Sanz et al. 2006b) en fetge de rata. Els nostres resultats de la disminució del dany oxidatiu observat en fetge de rata en l'experiment de restricció proteica va en el sentit esperat, ja que el fet que existeixi una menor producció d'espècies reactives d'oxigen i per tant, d'estrès oxidatiu, fa que les macromolècules cel·lulars es vegin menys danyades; tant a nivell de l'ADN mitocondrial com del dany oxidatiu proteic directe o el derivat de glicò i lipoxidació. A més a més, estudis previs també han demostrat una disminució en el contingut de carbonils proteics en fetge de rata com també una disminució de la peroxidació lipídica en ronyó de rata (Youngman, Park & Ames 1992).

La restricció de metionina a més a més de l'efecte positiu en l'augment de la longevitat en rates i ratolins (Richie et al. 1994, Zimmerman et al. 2003), retarda molts canvis associats a l'envelliment i malalties neurodegeneratives en rosegadors i reproduïx diferents canvis típics d'una restricció calòrica. La RMet en rates disminueix la massa de greix visceral, els nivells d'insulina en plasma, el factor de creixement insulínic del tipus 1 (IGF-1, de l'anglès, *insulin-like growth factor 1*) i la resposta de la insulina a la glucosa, i evita al 100% un increment de triglicèrids en sang i parcialment,

un 75%, els nivells de colesterol, en rates velles (Malloy et al. 2006). En ratolins, la RMet disminueix el desenvolupament de cataractes, minva els canvis associats amb l'envelliment relacionats amb la funció immune i també els nivells de glucosa en sèrum, d'insulina, del factor de creixement insulínic del tipus 1 (IGF-1, de l'anglès, *insulin-like growth factor 1*) i de T4 (Miller et al. 2005). En fetge d'ovelles, la RMet també disminueix l'expressió gènica del factor de creixement insulínic del tipus 1 (IGF-1, de l'anglès, *insulin-like growth factor 1*) en resposta a l'hormona del creixement (GH, de l'anglès, *growth hormone*) (Stubbs et al. 2002). Altres estudis recents també mostren que la RMet pot parar la divisió de cèl·lules cancerígenes (Pavillard et al. 2006) i inhibeix la carcinògenes de colon (Kominou et al. 2006).

Fins al moment, però, no s'havia estudiat els efectes de la restricció de metionina sobre el dany oxidatiu endogen molecular. Estudis previs demostren que tant si s'aplica la intervenció nutricional realitzada prèviament, on la disminució de la metionina va ser compensada per un augment de glutamat (Miller et al. 2005, Richie et al. 1994) (on es demostra un augment de la longevitat màxima), com si es restringeix la metionina compensant amb una aportació de tots els components de la dieta sense augmentar cap component en concret, que en ambdós casos es dona una disminució de la producció mitocondrial de ROS en el fetge de les rates (Sanz et al. 2006, Caro et al. 2008). L'única diferència existent al comparar les dos intervencions és que les mitocondries de fetge de les rates sotmeses a restricció de metionina suplementades amb glutamat mostren un consum d'oxigen superior a les rates control, paràmetre que es mostra invariable en l'experiment on no hi ha una aportació extra de glutamat. En l'experiment de restricció al 40 i 80% de metionina en fetge trobem una disminució del dany oxidatiu endogen tant del dany a l'ADN mitocondrial, com també dels cinc marcadors específics del dany oxidatiu proteic. Aquesta disminució va en el mateix sentit que el produït en el fetge de les rates sotmeses a RMet amb l'aportació de glutamat (Sanz et al. 2006). Amb això estem dient que l'aportació de glutamat solament es nota en el consum d'oxigen i tots els altres paràmetres disminueixen, demostrant el fet que la RMet disminueix la velocitat d'envelliment disminuint aquests paràmetres en fetge de rates. Per tant, la disminució del dany a l'ADN mitocondrial en els dos grups experimentals de RMet, en 40 i 80% va en concordança amb la disminució de la producció de ROS observat en RMet. Estudis previs mostren l'estreta relació entre els canvis en la producció de ROS mitocondrials i els nivells de 8-oxodG en ADN mitocondrial en RC, RP i RMet80% i quan comparem espècies animals de

diferents longevitats (Pamplona, Barja 2006, Barja 2004b). Aquesta correspondència podria ser deguda a la proximitat de l'ADN mitocondrial amb els llocs de la generació dels ROS, especialment els que estan encarats a la matriu mitocondrial (Figura 3). A part de la restricció proteica (Sanz, Caro & Barja 2004) i la restricció de metionina (Sanz et al. 2006), com ja s'ha comentat, la restricció calòrica al 40% (Gredilla et al. 2001) també disminueixen la generació de ROS mitocondrial i els nivells de 8-oxodG en ADN mitocondrial en una quantitat similar en fetge de rata. Per contra, els dos estudis de restricció lipídica (Sanz et al. 2006a) i de carbohidrats (Sanz et al. 2006b, Pamplona et al. 2002a) que no disminueixen la producció de ROS, tampoc mostren disminució dels nivells de 8-oxodG. En relació a la modificació oxidativa proteica, s'han trobat disminucions significatives en els marcadors SAG, SAAA, CEL, CML i MDAL i CMC, aquesta última només s'ha quantificat en l'experiment de RMet 40-80%. Aquesta disminució en l'oxidació proteica directa (SAG i SAAA), en la derivada de glicoxidació (CEL, CML i CMC) i de lipoxidació (CML, MDAL i CMC) concorda amb la minvada producció de ROS observat en MetR al 40 i al 80%. La disminució d'aquests marcadors d'oxidació proteica s'han trobat també disminuïts en una restricció calòrica del 40% (Pamplona et al. 2002a, Pamplona et al. 2002b).

La CMC requereix una menció especial. La modificació de cisteïna per carboximetilació és mostra per primera vegada com un biomarcador de la glicació i lipoxidació avançada *in vivo*. Fins al moment, la investigació de la formació d'aquests biomarcadors s'ha centrat en les modificacions químiques del grup α -amino del N-terminal, del grup ϵ -amino de la lisina i del grup guanidino de l'arginina dels residus proteics. Tanmateix, el grup sulfidril de les proteïnes intracel·lulars és més nucleofílic, per tant, més reactiu que els grups amino o guanidino. Aquest fet explica que s'observi el producte de la modificació química de la cisteïna com a resultat de les reaccions intracel·lulars derivades de les reaccions de Maillard (Figura 25). A més a més, basant-nos en la seva estructura química (Figura 28), la CMC és un tioèter, no un tioèster, adducte que no és reversible a les reaccions de transesterificació amb glutatió o altres tiols cel·lulars. Amb tot això, podem considerar la CMC mitocondrial com un producte final de glicació i lipoxidació irreversible i estable.

Els efectes perjudicials de l'envelliment es manifesten millor en teixits postmitòtics, on les cèl·lules danyades irreversiblement o les cèl·lules perdudes no poden ser substituïdes per mitosis de les sanes. Entre aquests teixits, el cervell és el més

important, degut al seu paper central en l'homeòstasi de l'organisme. En aquest sentit, la restricció de metionina demostra una disminució dels paràmetres del dany oxidatiu endogen, tant a nivell de l'ADN mitocondrial, com dels marcadors de dany oxidatiu proteic directe (SAG, SAAA), els de glicoxidació (CEL, CML) i lipoxidació (CML, MDAL) en cervell de rata. Aquest fet evidencia una disminució de dany oxidatiu proteic produït possiblement per la disminució de la generació de ROS observat en la RMet en fetge, ja que en cervell de rates en aquestes condicions no s'ha calculat. Aquests resultats, conjuntament amb els resultats de la disminució del dany oxidatiu proteic en fetge de rata tant en una restricció al 40% com al 80%, suporten la idea de que la disminució en la ingesta de metionina és responsable per la disminució de l'estrès oxidatiu mitocondrial observat en RC.

En concordança amb els resultats que demostren que no existeixen diferències en la producció mitocondrial de ROS en l'experiment de RAAs (Caro et al. 2009a), tampoc hi ha variació en els nivells de 8-oxo-dG, suggerint així que l'aminoàcid responsable de la reducció de ROS mitocondrial produït per la RP, és la metionina. A priori, en absència de canvi en la producció mitocondrial de ROS en el grup de RAAs tampoc esperàriem canvi en els marcadors d'oxidació proteica, però no ha estat així. Veiem que la disminució de tots els aminoàcids excepte la metionina també indueixen efectes de protecció en les proteïnes mitocondrials, de la mateixa manera que es veuen disminuïts per al intervenció de RMet i RP. Donat el fet que en aquesta intervenció no hi ha reducció en la producció de ROS (Caro et al. 2009a), la disminució dels marcadors de lesió pot ser atribuïble a un increment de la degradació de les proteïnes modificades en lloc d'una menor formació de les modificacions oxidatives de les mateixes. Per altra banda, els marcadors específics de lipoxidació, CML i MDAL poden veure's disminuïts per la disminució de la insaturació dels àcids grassos i de l'índex de peroxidizabilitat observat a partir de la composició dels àcids grassos. De totes maneres, però, no ho explica tot ja que els altres tres marcadors de lesió analitzats (SAG, SAAA, CEL) que no depenen de la peroxidació també disminueixen. El mateix podríem dir en l'experiment de restricció proteica en fetge com en el de restricció de metionina en cervell i fetge. En els tres experiments existeix una disminució de tots els marcadors de dany oxidatiu, entre ells, els específics de lipoxidació, i això va acompanyat d'una disminució de la insaturació dels àcids grassos, per tant de la susceptibilitat d'aquests a ser oxidats. Fet que podria explicar en part la disminució dels

marcadors específics, però no de tots els marcadors de dany oxidatiu proteic ja que els altres tres (SAG, SAAA i CEL) no provenen de la lipoxidació.

Per tant, sembla que la disminució de la producció de ROS induïda per la RP i la RMet condueixen a una disminució generalitzada de l'oxidació, glicoxidació i lipoxidació de les proteïnes mitocondrials, i la restricció de tots els aminoàcids excepte la metionina també produeix el mateix efecte de protecció a l'oxidació proteica, però per altres mecanismes que no és la disminució de la producció de ROS. De totes maneres i independentment del mecanisme molecular involucrat, l'efecte generalitzat de la disminució de la lesió oxidativa proteica induïda per la disminució de tots els aminoàcids excepte la metionina poden contribuir a la disminució de la velocitat d'envelliment que produeix una restricció calòrica.

L'experiment de suplementació en metionina ens mostra un augment del dany oxidatiu a l'ADN mitocondrial en el fetge dels animals, ara bé, els marcadors d'oxidació proteica no es veuen modificats per aquesta intervenció nutricional en el fetge dels animals. Aquest augment del dany de l'ADN mitocondrial es pot explicar per un augment de la generació mitocondrial de ROS observat en fetge (Gomez et al. 2009). S'observa també que aquests paràmetres es troben invariants en el cor d'aquests animals. La metionina és un aminoàcid essencial el qual s'acostuma a ingerir en les proteïnes de la dieta. La seva absorció és altament eficient, entra en el plasma i circula fins que és utilitzat pels diferents teixits. El fetge, però, juga un paper important en el metabolisme de la metionina i utilitza gran part dels aminoàcids sulfurats del portal sanguini. A diferència de l'augment de dany oxidatiu a l'ADN mitocondrial, la suplementació de metionina no fa variar cap dels marcadors específics de dany oxidatiu proteic en fetge. L'augment dels nivells de 8-oxodG és podria explicar per la proximitat física de l'ADN mitocondrial a la cadena de transport electrònica, ara bé, l'absència de diferències en les quantitats dels marcadors de lesió, tot i haver-hi un augment de la producció de ROS, sembla no mostrar cap paral·lelisme. L'increment de l'estrès oxidatiu induït per la suplementació en metionina, com s'ha evidenciat en altres experiments previs i situacions fisiològiques (Lopez-Torres et al. 1993, Gomez-Cabrera, Domenech & Vina 2008) (per exemple en exercici moderat, que equival a entrenament crònic), produeixen una sobrerregulació dels enzims antioxidants endògens com la SOD, la glutatió peroxidasa o la catalasa i també del no enzimàtics, com el glutatió reduït, conduint a una aparent resposta adaptativa a la ingesta crònica de una dieta amb alt

contingut de metionina; fet que podria explicar l'absència dels canvis observats en SAG, SAAA, CEL, CML i MDAL en aquest experiment de MetS en fetge. Diferents autors han descrit increments en enzims antioxidants en una suplementació de metionina (Mori, Hirayama 2000, Toborek et al. 1996, Seneviratne et al. 1999, Park et al. 2008) encara que en altres estudis les activitats dels enzims antioxidants no han canviat (Stefanello et al. 2005). De totes maneres, en aquest experiment en que no han trobat diferències en les activitats dels enzims antioxidants la metionina s'ha administrat *in vitro* en homogenats d'hipocamp de cervell de rata i, per tant, no s'ha pogut donar una compensació adaptativa. En alguns casos, però, les induccions adaptatives dels enzims antioxidants després d'una suplementació en metionina es perden després d'un llarg temps (6 mesos) i aquesta pèrdua correlaciona amb l'increment de la peroxidació lipídica mesurada amb les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric (Mori, Hirayama 2000), correlació que no s'observa quan les induccions es donen temporalment. Alternativament, la falta de canvis en els marcadors d'oxidació proteica podrien ser degudes a una sobrerregulació compensatòria dels sistemes catabòlics involucrats en la reparació de les proteïnes danyades.

27. L'EFECTE DE LES INTERVENCIIONS NUTRICIONALS EN LA COMPOSICIÓ EN ÀCIDS GRASSOS

Entre els marcadors de dany oxidatiu proteic, hem mirat tres que són derivats de lipoxidació, la CML, CMC i especialment el MDAL. Donat el fet que la peroxidació lipídica augmenta exponencialment en funció dels dobles enllaços presents en la molècula d'àcid gras (Holman 1954), hem mesurat la composició en àcids grassos en les intervencions nutricionals realitzades i totes elles efectuen canvis significatius en el grau d'insaturació dels àcids grassos i en conseqüència, en la susceptibilitat a ser oxidats.

Els canvis en la composició dels àcids grassos produïts per la RP es mereix una menció especial. En una restricció calòrica típica del 40%, la quantitat d'aliment ingerit és un 40% menys, conseqüentment, la ingesta de proteïnes també disminueix en un 40%. Per tant, si una RP canvia la insaturació dels àcids grassos, tal i com s'evidencia en els resultats presents, en principi s'hauria d'observar canvis similars en experiments de RC. En referència a això, estudis previs van demostrar canvis qualitativament similars a aquests, encara que quantitativament en un menor grau, en la composició

dels àcids grassos de les mitocòndries hepàtiques de rates sotmeses a 28 mesos de restricció calòrica, fet que no succeeix quan la restricció és de 18 o 6 mesos (Lambert et al. 2004), com és el cas dels resultats presents. El fet que el nostre experiment en RP s'hagi aplicat durant 7 setmanes no sembla motiu per observar aquestes diferències, però hi poden haver influït altres factors. Quan comparem experiments de restriccions dietètiques en general s'ha de tenir en compte diversos factors que poden modular la intensitat dels canvis en la composició dels àcids grassos, com la soca de l'animal, la font de la proteïna ingerida, el temps del tractament experimental i el teixit o l'òrgan examinat. Comparant el treball previ de RC (Lambert et al. 2004) i els nostres resultats de RP alguns d'aquests factors hi són presents. En el treball de CR utilitzen rates Brown-Norway a diferència de les rates utilitzades per tots els experiments realitzats en aquesta tesi, les rates Wistar. Una altra diferència és el procediment de l'aplicació de la intervenció nutricional, en el cas de l'experiment de RC, als animals del grup de RC se'ls hi va limitar l'accés al menjar per tal de que el pes corporal d'aquests fos entre un 50-55% dels animals del grup control, els quals menjaven *ad libitum*. Ara bé, l'accés al menjar de les rates del grup *ad libitum* estava limitat per un període de 5 hores, de 22'00 a les 3'00 h, per tal de sincronitzar les rates del grup control al mateix cicle que les rates del grup de RC, en lloc de donar lliure accés al menjar les 24 h, com és el cas del nostre experiment de RP. A més a més, un experiment del nostre grup, posterior al de restricció proteica, demostra que una restricció calòrica de baixa intensitat, de 8,5% i 25%, disminueix el nombre dels dobles enllaços i la peroxidabilitat dels àcids grassos de les mitocòndries de fetge de rates, en aquest cas, però, les variables experimentals han estat més acotades ja que s'ha utilitzat la mateixa soca dels animals, rates Wistar i el període i tipus d'alimentació ha estat el mateix, 7 setmanes de tractament i 24 h d'accés al menjar (resultats no presentats en aquesta tesi, publicats en (Gomez et al. 2007)). De totes maneres és important ressaltar el fet que existeixen altres estudis de RC (Ramsey et al. 2004, Hulbert 2005, Tamburini et al. 2004, Yu 2005) on s'ha demostrat una disminució de la insaturació dels àcids grassos de duració i magnitud similar als nostres resultats, i aquests canvis són principalment, com en el nostre cas, deguts a una disminució dels àcids grassos poliinsaturats, l'àcid docosahexaenoic (22:6n-3) i l'àcid araquidònic (20:4n-6), i un increment dels àcids grassos amb un grau d'insaturació baix, com l'àcid oleic (18:1n-9) i el linolènic (18:3n-3).

La disminució de la insaturació dels àcids grassos i per tant un augment a la protecció de l'oxidació d'aquests, com era d'esperar, també s'ha observat en l'experiment de restricció de metionina tant en el fetge, efecte però més marcat en la RMet del 80%, com en cervell dels animals. Aquesta disminució es deguda a gairebé els mateixos canvis que els observats en RP. En fetge existeix una marcada disminució de l'àcid araquidònic (20:4n-6) acompanyat d'un augment de l'àcid linoleic (18:2n-6), el quals es troben dins de al mateixa ruta biosintètica (Figura 58). En cervell, aquest efecte és degut a més canvis, ja que a part de la disminució de l'araquidònic, també disminueixen l'àcid adrènic (22:4n-6) i el docosahexaenoic (22:6n-3), i a més a més de l'augment del linoleic es produeix un augment de l'oleic (18:1n-9) i dels dos àcids docosapentaenoics el ω -6 (22:5n-6) i el ω -3 (22:5n-3). S'ha de tenir en compte que el cervell és un teixit que conté un alt contingut en greixos, un 60%, i que d'aquests el 20% són àcids grassos essencials ω -3 i ω -6. Aquest fet s'observa clarament si comparem els valors mitjans en composició dels àcids ω -3 i ω -6 principals, és a dir, l'araquidònic i el docosahexaenoic. Aquests es troben aproximadament en un 2 i 4% en fetge, respectivament, en canvi, en cervell l'araquidònic casi es duplica (3,5%) i el docosahexaenoic és triplica (14%) (Taula 16 i Taula 17). Sorprenentment, aquests són també els principals àcids grassos que varien en el mateix sentit quan comparem els mamífers longeus amb els no longeus (Hulbert et al. 2007, Pamplona 2008, Pamplona, Barja & Portero-Otin 2002). Aquestes diferències confereixen a les membranes dels animals longeus una resistència superior a la peroxidació lipídica sense alterar la fluïdesa i microviscositat, propietats fonamentals de les membranes lipídiques cel·lulars, i conseqüentment un menor dany a les macromolècules derivat de la lipoxidació.

A més a més de la restricció proteica i de metionina, veiem que la restricció de tots els aminoàcids excepte la metionina, com també la suplementació de metionina indueixen el mateix tipus de canvi en la insaturació dels àcids grassos que s'assembla al que es dona en animals longeus. Concretament la disminució de la insaturació dels àcids grassos en el grup de RAAs(-Met) es deu a la variació de només dos àcids grassos, ja anomenats, els quals estan dins de la mateixa ruta biosintètica. Els animals sotmesos a restricció en aminoàcids mostren una disminució de l'àcid araquidònic (20:4n-6), àcid gras poliinsaturat, i un increment del seu precursor menys saturat, l'àcid linoleic (18:2n-6), sense mostrar canvis en la quantitat total dels àcids grassos saturats i insaturats. Tot i que la disminució de l'índex de dobles enllaços (IDE) és

petit, d'un 3%, el seu efecte en la peroxidació lipídica pot ser molt més important ja que es coneix que l'increment del nombre de dobles enllaços i la peroxidació lipídica no segueixen una relació lineal, sinó més bé, exponencial (Holman 1954).

En l'experiment de suplementació de metionina, l'anàlisi dels índexs d'insaturació de membrana, tant l'IDE com l'IP, es mostren disminuïts en el grup de suplementació de metionina en el fetge dels animals, tot i trobar un augment en la producció de ROS mitocondrial i una absència de canvi dels marcadors d'oxidació proteica en el fetge dels animals. A priori, doncs, aquesta davallada sembla contradictòria. Una explicació podria ser que la disminució de la insaturació dels àcids grassos del fetge fos una conseqüència de l'increment de la producció de ROS. És a dir, els àcids grassos i concretament els poliinsaturats, són les macromolècules més susceptibles de patir un atac dels radicals lliures, per tant si hi ha un augment de ROS, augmenta la lipoxidació i fa que aquests disminueixin. Aquesta però, no és una explicació única ja que no tots els àcids grassos poliinsaturats disminueixen, sinó que només alguns. Alternativament, existeixen diversos estudis que demostren alteracions en la biosíntesi i el metabolisme lipídic després d'una suplementació en metionina. Aquestes alteracions observades poden ser una disminució dels triglicèrids hepàtics (Mori, Hirayama 2000, Park et al. 2008), una disminució dels nivells de HDL-colesterol en plasma (Velez-Carrasco et al. 2008) o l'augment de la biosíntesi hepàtica i l'absorció de colesterol i dels triglicèrids atribuïbles als alts nivells d'homocisteïna, ja que aquesta indueix l'estrès del reticle endoplasmàtic (Werstuck et al. 2001). Per tant, l'estrès de reticle induït per l'augment de l'homocisteïna comporta una desregulació de les vies biosintètiques del colesterol i els triglicèrids, activant l'expressió de gens relacionats amb la biosíntesi dels lípids els quals poden jugar un paper important en l'associació dels nivells elevats d'homocisteïna amb l'arteriosclerosi i la malaltia arterial coronària. En el nostre estudi, la disminució del grau d'insaturació hepàtic podria representar una adaptació i compensar, almenys en part, l'increment de la producció de ROS en el fetge.

En general, el canvi composicional observat en tots els experiments, el qual comporta una disminució de la insaturació dels àcids grassos en fetge en totes les intervencions com també en cervell de RMet, es produït per una disminució dels àcids grassos poliinsaturats i acompanyat de l'augment dels seus precursors saturats, com seria el cas del 20:4n-6 i el seu precursor 18:2n-6, representatiu en tots els experiments. Aquesta disminució es podria atribuir a una disminució de l'activitat dels

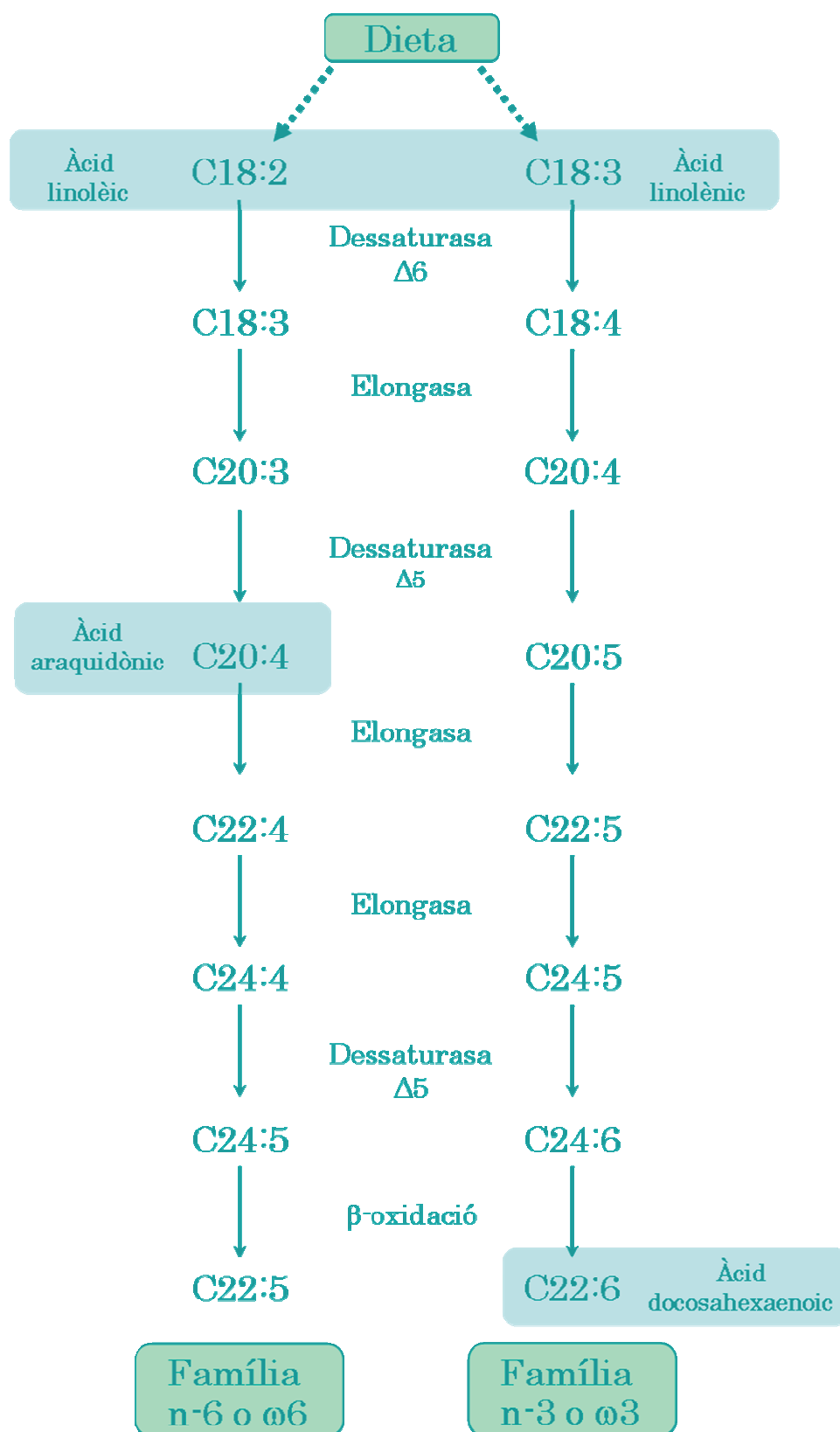


Figura 58 Biosíntesi dels àcids grassos de cadena llarga en els mamífers.

La família d'àcids grassos de les sèries n-3 i n-6 només poden ser sintetitzades a partir dels seus precursors obtinguts a partir de la dieta. Les elongases són enzims que catalitzen el primer pas de l'elongació dels àcids grassos. Les dessaturases són enzims que catalitzen la introducció d'un doble enllaç en una posició específica de la cadena de l'àcid gras. Δ indica la posició on l'àcid gras es introduït, comptant des del C1 del àcid. "n" és el nombre de carbonis de l'àcid gras (Guillou et al. 2010).

enzims desaturases Δ -5 i Δ -6, enzims principals en la ruta biosintètica dels àcids poliinsaturats essencials els quals són necessaris per a la incorporació d'un nou doble enllaç en els àcids grassos d'aquesta ruta (Guillou et al. 2010). Particularment, en cervell, aquests enzims es troben augmentats en condicions fisiològiques normals, en comparació amb el fetge (Cho, Nakamura & Clarke 1999a, Cho, Nakamura & Clarke 1999b) (Figura 58).

La restricció de metionina mimetitza els canvis induïts per la RC i la RP disminuint la sensibilitat de les membranes mitocondrial a la peroxidació lipídica. Aquesta disminució observada també en l'experiment de RAAs(-Met), acompanyat de la disminució de la producció mitocondrial de ROS, incrementa també la longevitat durant una restricció calòrica, la qual inclou una restricció en aminoàcids. Una suplementació en metionina de curt termini, com la que s'ha realitzat, sembla que compensa la sensibilitat mitocondrial de les membranes a la lipoxidació, seria necessari però, realitzar altres experiments a llarg termini per a conèixer bé els seus efectes en la composició d'àcids grassos.

28.L'EFECTE DE LES INTERVENCIIONS NUTRICIONALS EN LA QUANTITAT DE LES PROTEÏNES DELS COMPLEXES MITOCONDRIALS I AIF

En relació a un dels possibles mecanismes responsables de la disminució de la producció de ROS mitocondrial, efecte que condueix a una disminució del dany molecular endogen tant en RC, observat en treballs previs, com en RP i RMet, demostrat en els nostres treballs, s'ha estudiat els possibles efectes de les variacions en les quantitats dels generadors de ROS de la cadena de transport electrònic mitocondrial. Es ben conegut que dins d'aquests, només dos dels quatre complexos multiproteics són els responsables de la producció de ROS mitocondrial, el complex I (Genova et al. 2001, Barja, Herrero 1998) i el complex III (Boveris, Cadenas & Stoppani 1976). D'acord amb la nostra hipòtesi, en base als resultats previs obtinguts per diferents autors de la disminució de les activitats del complex I i III en ratolí (Desai et al. 1996) i en rosegadors (de Grey 2001) produïda per la RC, trobem disminuïdes les concentracions estimades dels complexos I i III en les intervencions de RP, RMet, en les situacions estudiades. D'acord amb aquest fet, les concentracions dels complexos responsables de la producció de ROS no es veuen afectades per la intervenció de RAAs(-Met) ni per la de SMet, on la producció de ROS no varia (Caro et al. 2009a), o

augmenta (Gomez et al. 2009), respectivament. Ara bé, la disminució en la producció de ROS sembla ser deguda a diferents factors a part de la disminució dels complexos I i III, ja que no existeix una relació directament proporcional entre la disminució de producció de ROS pels complexos responsables i la quantitat de complexos. Per tant, la restricció proteica i de metionina indueixen altres canvis qualitius a part de la reducció de ROS. Aquests inclouen la disminució del grau de reducció dels generadors de ROS de la cadena de transport mitocondrial o l'increment del seu potencial redox, canvis que estan d'acord amb els baixos valors de fuga de radicals lliures que es troba en RP (Sanz, Caro & Barja 2004) i RMet en fetge (Caro et al. 2008) com també en treballs previs de restriccions dietètiques (Gredilla, Barja & Lopez-Torres 2001, Gredilla et al. 2001).

En fetge de les rates en RMet al 40 i 80% , també és troben minvades les quantitats dels altres dos complexos, CII i CIV, els quals no són responsables de la producció de ROS mitocondrial. A més a més, la minvada quantitat dels quatre complexos de la cadena respiratòria en els dos graus de RMet estudiats en fetge són paral·lels als resultats obtinguts en *Caenorhabditis elegans* (Dillin et al. 2002, Curran, Ruvkun 2007, Lee et al. 2003). En aquests experiments s'alimentava els cucs amb diferents ARN d'interferència específics per a les subunitats dels complexos mitocondrials. Aquestes investigacions mostren que la inactivació dels gens que codifiquen per les subunitats de qualsevol dels quatre complexos mitocondrials en l'animal adult incrementen la longevitat dels cucs. Per tant, els dos tipus de manipulació que amplien la longevitat màxima, la RMet en fetge de rata i la inactivació dels ARNi en cucs tenen en comú una marcada disminució de la quantitat dels quatre complexos mitocondrials. Cal dir que la davallada dels complexos II i IV no s'observa en RMet en cervell de rates, això es podria explicar pel fet que es tracta d'un teixit diferent i possiblement el tractament de 7 setmanes de RMet no sigui suficient per a produir canvis, o que el mecanisme en cervell sigui diferent. A més, podem dir que la redistribució mitocondrial en la quantitat de complexos no afecta a les funcions de l'òrganul, com podria ser la producció d'ATP ($10,15 \pm 0,86$ en front $10,14 \pm 1,26$ nmols d'ATP/mg proteïna en grup control respecte grup RMet80%) , la qual és manté constant en cervell dels animals (dades no presentades en la tesi, publicades a (Naudí et al. 2007a) , i també s'ha demostrat en RC (Lopez-Lluch et al. 2006).

La intervenció de suplementació de metionina en fetge de rata, respecte a les quantitats dels complexos mitocondrials, només mostra un augment d'una de les subunitats del complex III i un descens en la subunitat del CIV, respecte al grup control. En un primer moment, l'augment del CIII és podria associar a l'augment de la generació de ROS mitocondrial observat en aquests animals. Ara bé, aquest augment mitocondrial de ROS en fetge, és degut al complex I i no al III, ja que només augmenta quan el substrat és el piruvat/malat –substrat específic del complex I- i no quan el substrat és succinat –substrat del complex II- i s'hi afegeix rotenona (inhibidor del complex I) (Gomez et al. 2009). Aquesta diferència fa pensar en el fet que existeixin altres mecanismes responsables de l'augment de la producció de ROS pel complex I, de la mateixa manera que poden haver altres mecanismes responsables de la disminució de ROS en RMet que la disminució dels complexos I i III. La disminució del complex IV deguda a la suplementació en metionina podria produir un major grau de reducció electrònic de la cadena de transport, fet que podria explicar l'augment de la producció de ROS produïda pel complex I.

Un mecanisme alternatiu que podria regular la producció de ROS del complex I, en la suplementació de metionina, es tracta de les modificacions post-translacional de les subunitats d'aquest complex. S'ha proposat la glutatilonització reversible de les subunitats del complex I com un mecanisme alternatiu el qual regula la producció de ROS pel complex I. S'ha descrit que la producció de ROS pel complex I mitocondrial incrementa en resposta a l'oxidació de la quantitat de glutatió mitocondrial. L'addició del glutatió oxidat (GSSG) al complex I mitocondrial fa que aquest augmenti la seva producció del radical superòxid, reaccionant els grups tiols de les subunitats del complex I amb el GSSG i formant disulfurs mixtes glutatió-proteïna (Taylor et al. 2003). El mateix podria succeir en la suplementació en metionina, intervenció que faria augmentar els nivells d'homocisteïna, el qual conté un grup tiol capaç de formar enllaços disulfur amb aminoàcids sulfurats (Cys, Met) de les subunitats del complex I.

La proteïna AIF pot estar també involucrada en la minvada concentració del complex I en la restricció de metionina. S'ha descrit que, a part de les funcions apoptòtiques de l'AIF, aquesta sembla ser necessària per a l'oxidació fosforilativa mitocondrial. En particular, s'ha trobat que cèl·lules deficientes en AIF mostren un baix contingut de complex I (Vahsen et al. 2004), assenyalant AIF en el paper de biogènesi o manteniment d'aquest complex multiproteic. I ratolins Hq (veure apartat 2.4.3), amb

l'expressió reduïda d'AIF, mostren també una expressió reduïda de les subunitats del complex I. Per tant és possible que la disminució observada en AIF en els grups de 40 i 80% de RMet en fetge pugui contribuir a la disminució del contingut del complex I. Ara bé, en cervell, la RMet no disminueix significativament la quantitat d'AIF, aquest fet pot suggerir que la disminució de complex I no només depèn de la proteïna AIF, tot i que aquesta mostra una tendència a disminuir (Figura 48), a més s'ha descrit que existeix una expressió diferencial de la quantitat d'AIF segons les regions del cervell (escorça frontal, estriat i hipocamp) en rates velles (Yu et al. 2009). En aquest sentit, en cervell de les rates de restricció de metionina s'ha trobat un augment de la cardiolipina (Naudí et al. 2007a), un fosfolípid específic de la mitocondria, el qual s'ha demostrat que juga un paper important en la bioenergètica mitocondrial optimitzant l'activitat de moltes proteïnes de la membrana mitocondrial interna, especialment els complexos mitocondrials i dins d'aquests, el CI i IV; i es troba disminuïda en l'envelliment en rates (Paradies et al. 2010). A més a més, un treball recent (Chinta et al. 2009) demostra que no hi ha diferència en la producció de ROS mitocondrial en cervell dels ratolins Hq (veure apartat 2.4.3) en comparació als seus controls tot i que aquests ratolins presenten una disminució d'AIF i de l'activitat del complex I. Això suggereix que AIF no modula directament la producció de ROS, i segons els seus resultats, tampoc ho és el complex I en el cervell d'aquesta soca de ratolins. En un primer moment és contradictori amb els nostres resultats de que el complex I és responsable de la producció de ROS, però això explicaria que, com observem amb els nostres resultats, la reducció de generació de ROS no és només degut a la disminució del complex I.

En l'estudi de RAAs, AIF disminueix un 18% en el grup de RAAs, però la quantitat del complex I no es veu afectada. Aquest fet pot indicar que aquest nivell de disminució en l'AIF no és suficient per a limitar la biogènesi del complex I. Per altra banda, en referència a les funcions proapoptòtiques d'AIF, aquests resultats suggereixen que la restricció d'aminoàcids excepte la metionina poden contribuir a l'augment de la protecció del teixit a l'apoptosi a través d'una disminució moderada de l'AIF, la qual no compromet la funció de la cadena de transport electrònic. La intervenció de suplementació de metionina no modifica els nivells d'AIF, fet que és consistent amb l'absència de canvis en el contingut del complex I.

29. L'EFECTE DE LA RESTRICCIÓ I SUPLEMENTACIÓ DE METIONINA EN LES PROTEÏNES RELACIONADES AMB LA BIOGÈNESI MITOCONDRIAL EN CERVELL DE RATA

Dins de la complexa xarxa que regula i abraça a la biogènesi mitocondrial, el cofactor PGC1 α és el seu centre i màxim coordinador. L'activitat de PGC1 α pot modular-se per diferents tipus de senyals tant metabòlics, com nutricionals o factors ambientals (per exemple, a través de modificacions transcripcionals o post-transcripcionals) i conseqüentment afecta a la biogènesi mitocondrial (Figura 18).

Entre els possibles moduladors de PGC1 α , hem estimat la concentració de SIRT1 en cervell de RMet40% i SMet, com també en fetge dels animals de RAAs. Els gens Sir2 (de l'anglès, silent information regulator 2) de llevat, de mosca (*Drosophila melanogaster*) i de cuc (*Caenorhabditis elegans*) codifiquen per les desacetilases d'histones dependents de NAD⁺ i tenen un paper en la determinació de la longevitat i la resposta a la restricció calòrica (Rogina, Helfand 2004, Chen, Guarente 2007). En els mamífers, les sirtuïnes 1-7 són homòlogues a les proteïnes Sir2, SIRT1 és el membre de la família de les sirtuïnes que presenta la més alta homologia amb Sir2 i és considerada el seu ortòleg^j (Frye 2000). SIRT1 pot desacetilar histones i altres proteïnes (Vaquero et al. 2004). Estudis recents suggereixen que SIRT1, com el Sir2 en llevat i invertebrats, està involucrat en la inducció de l'augment de la longevitat mitjançant una restricció calòrica en mamífers, la qual augmenta els nivells de SIRT1 (Boily et al. 2008). De fet, però, no s'ha estudiat mai quin dels components de la dieta són responsables de l'augment de les sirtuïnes durant la restricció calòrica. No és coneix si l'efecte de la longevitat observat per la RMet en rosegadors pot ser regulat per SIRT1 i existeixen pocs treballs en els que s'hagi estudiat els nivells d'aquesta sirtuïna en cervell, tot i que un treball recent demostra que hi ha un augment de SIRT1 en el còrtex temporal de monos Squirrel (*Saimiri sciureus*) sotmesos a una RC del 30% (Qin et al. 2006). Ara bé, els nostres resultats en cervell de rata no mostren cap canvi en cap sentit d'aquesta sirtuïna ni per una restricció ni per una suplementació de metionina, això pot suggerir que la part de l'augment de la longevitat en CR produït per la restricció de metionina no està regulat per la sirtuïna SIRT1 o que és necessari explorar les diferents parts del cervell per saber si succeeix el mateix que en els monos

^j Gens ortòlegs: dit dels gens homòlegs que pertanyen a espècies diferents i que tenen un avantpassat comú.

Squirrel. En canvi, en fetge dels animals sotmesos a restricció de tots els aminoàcids excepte la metionina es mostra un increment de SIRT1 del 26%. Aquest fet mostra que no és necessari disminuir la ingesta calòrica per a induir la SIRT1 en fetge, i indica que aquesta intervenció nutricional té la capacitat de produir aquest canvi en la sirtuïna 1. Això no elimina la possibilitat de que altres constituents de la dieta també puguin estar involucrats en un augment de SIRT1 durant la restricció calòrica.

Estudis recents mostren una interacció directa de SIRT1 amb PGC1 α , desacetilant-lo. Cicles d'acetilació i desacetilació sembla que es donen en el fetge de mamífers durant els estats d'ingesta o dejuni (Rodgers et al. 2005). Per tant, l'increment de SIRT1 pot contribuir a l'increment de l'activitat de PGC1 α i conseqüentment, de la transcripció de gens mitocondrials i de la biogènesi mitocondrial durant la restricció calòrica. Ara bé, en l'experiment de RAAs no s'observen canvis en PGC1 α i tampoc en el contingut dels complexos de la cadena de transport electrònic mitocondrial tot i l'augment de SIRT1. En l'experiment de RMet40% en cervell de rata no hi ha canvis ni en SIRT1 ni en PGC1 α , per contra, i curiosament, en cervell de SMet, SIRT1 no mostra canvis significatius i en canvi, els nivells de PGC1 α disminueixen en un 50% en el grup suplementat en metionina.

Com ja hem dit, existeixen diferents fenòmens reguladors de PGC1 α a nivell molecular (Lopez-Lluch et al. 2008) que poden ser responsables d'aquestes aparents discrepàncies. Per una banda, la desacetilació de PGC1 α produït per SIRT1 pot ser simplista i no tenir en compte altres modificacions possibles de PGC1 α com la fosforilació o la metilació (Rodgers et al. 2008) entre les quals també n'hi ha que inhibeixen la seva activitat, com l'acetilació de PGC1 α mitjançant el complex GCN5 acetiltransferasa, el qual s'ha demostrat que reprimeix l'expressió de PGC1 α en fetge (Lerin et al. 2006) i també en múscul esquelètic (Kelly et al. 2009), i podria ser una explicació de la disminució de PGC1 α produït per una suplementació de metionina en SMet. A més a més, mentre que l'activació de SIRT1 desacetila PGC1 α , també disminueix l'activitat transcripcional de PGC1 α i el consum d'oxigen cel·lular en un 25% (Nemoto, Fergusson & Finkel 2005). Això últim explicaria el cas de l'augment de SIRT1 i l'absència de canvi de PGC1 α en fetge de restricció en aminoàcids.

La inducció de PGC1 α s'ha associat a l'activació d'un gran nombre de factors de transcripció els quals regulen la biogènesi mitocondrial i la respiració per reduir el dany

oxidatiu endogen, a part de les respostes al fred específiques del teixit, el dejuni o l'exercici (Lopez-Lluch et al. 2006). Estudis previs han demostrat un increment en la biogènesi mitocondrial durant una restricció calòrica (Nisoli et al. 2005), però el que no es coneix es quin dels components de la dieta és el responsable.

NRF-1 és un factor transcripcional intermediari el qual estimula la síntesis de mTFA amb l'efecte final d'activar la duplicació de les molècules d'ADN mitocondrials. En el cervell de les rates sotmeses a restricció de metionina del 40%, es mostra una disminució significativa de NRF-1, el qual no sembla estar mediat per PGC1 α ja que aquest no varia, com tampoc sembla que aquesta disminució inhibeixi a mTFA, ja que aquesta es mostra significativament augmentada. Aquest fet fa pensar en l'existència d'una o més vies que modulen mTFA i/o NRF-1. Recentment s'ha descrit una interacció entre la biogènesi mitocondrial i l'estrès oxidatiu. Piantadosi i col.laboradors (Piantadosi et al. 2008) relaciona el factor de transcripció Nrf2 (de l'anglès, *NF-E2-related factor 2*) amb el factor NRF-1 de biogènesi. Nrf2 es mostra com un factor de transcripció crític per la protecció de les substàncies electròfiles, inflamació i toxicitat química (Wakabayashi et al. 2004) oferint la possibilitat que aquest pugui connectar la biogènesi mitocondrial amb les defenses antioxidants i a xenobiòtics mitjançant un mecanisme redox basat amb el CO (Piantadosi et al. 2008). Nrf2 protegeix en contra dels tòxics i carcinogènics, en part, activant la fase II dels gens detoxificants (Wakabayashi et al. 2004, Rushmore, Pickett 1990, Kwak et al. 2003) i aquest també intervé en la inducció de CO mitjançant l'enzim limitant per la biosíntesis del glutatió (Li et al. 2007). Piantadosi i col.laboradors descriuen una via de regulació de la biogènesi mitocondrial a través de Nrf2. Segons ells, les substàncies electròfiles promouen l'expressió gènica de Nrf2, el qual en el nucli ocupa les posicions ARE (de l'anglès, *antioxidant response element*) en els promotors gènics que codifiquen per NRF-1 i altres proteïnes antioxidants com HO-1 i SOD2, facilitant així la transcripció i traducció de NRF-1. La fosforilació de NRF-1 facilitada per AKT fa que NRF-1 es transloqui al nucli i activi els gens necessaris per la biogènesi mitocondrial, entre aquests mTFA. Curiosament, s'han trobat llocs d'unió funcionals de NRF-1 en els promotors de més de 100 gens involucrats en la regulació del transcriptosoma mitocondrial, en els complexos de la cadena de transport mitocondrial, en la biosíntesi del grup hemo i en la importació i síntesi de proteïnes mitocondrials (Scarpulla 2008, Kelly, Scarpulla 2004).

Ara bé, la restricció de metionina al 40% en cervell, sabem que disminueix la producció de ROS i la lesió endògena (Caro et al. 2009b), fet que redueix les substàncies electròfiles, ja siguin ROS o intermediaris de segona generació (apartat 3.1). Si Nrf2 s'activa en resposta a les substàncies electròfiles i aquestes disminueixen, és lògica la tendència a la disminució dels nivells de proteïna Nrf2 observats en cervell de RMet40% (disminució del 20%, tot i que no és significatiu degut a la variabilitat entre animals), ja que quan Nrf2 no està actiu està unit a KEAP1 (de l'anglès, *kech-like ech-associated protein 1*) i es degrada mitjançant el proteasoma. Dos treballs encara més recents demostren una inducció de la SOD1 per la via Nrf2 en cardiomiòcits i cèl·lules vasculars (Dreger et al. 2009, Dreger et al. 2010). En sentit contrari, però no oposat, la tendència a la disminució observada en la quantitat de proteïna de Nrf2 va acompanyada de la disminució significativa de SOD1 en el cervell de les rates sotmeses a RMet40%. Aquesta disminució de la proteïna antioxidant SOD1, induïda per la disminució de l'activitat de Nrf2, suggereix una adaptació metabòlica del cervell de les rates, ja que amb menys dany necessiten menys antioxidants.

De fet, la tendència de la disminució dels nivells de Nrf2 citosòlics podrien explicar la disminució significativa (del 60%) dels nivells proteics de NRF-1, però en un primer moment, no expliquen l'augment significatiu observat en el factor mitocondrial mTFA. L'elevada quantitat de mTFA conjuntament amb l'augment del 20% (encara que no significatiu) del màxim coordinador d'aquesta, el PGC1, suggereixen un augment del nombre d'ADN mitocondrial i per tant de la biogènesi mitocondrial. És a dir, la restricció de metionina en cervell augmenta la biogènesi mitocondrial, augmentant significativament els nivells de PGC1 α en RMet80% i els nivells de mTFA en RMet40%, però no va acompanyat del augment de NRF-1. Això es pot explicar per l'existència de més factors respiratoris que poden estar implicats en aquest augment de la biogènesi, ja que l'anàlisi de PGC1 α , NRF-1, mTFA pot resultar lleugerament simplista si es considera el gran nombre de factors involucrats en aquesta gran xarxa de la biogènesi mitocondrial. Altres factor nuclears serien el NRF-2, el qual també indueix mTFA (Scarpulla 2008).

L'efecte de la suplementació de metionina sobre la biogènesi mitocondrial en cervell de rata sembla modificar només el seu màxim coordinador, el PGC1 α . La disminució espectacular del 50% de la expressió d'aquest cofactor suggereix una disminució de la biogènesi mitocondrial, tot i que no està acompanyada de cap altra

modificació de les proteïnes de biogènesi analitzades, com tampoc de la quantitat de les subunitats dels complexos mitocondrials analitzades, amb l'excepció del CIV, la qual disminueix significativament (dades no publicades). Per tant, en aquest sentit, seria necessària una més ampla exploració d'aquesta intervenció nutricional per poder demostrar la implicació que mostra sobre la biogènesi mitocondrial. Podria ser que el fet del període de la intervenció, 7 setmanes, sigui insuficient per notar possibles efectes en el cervell dels animals. Ara bé, el que suggereix aquesta gran reducció del cofactor PGC1 α i l'absència de canvi de les altres proteïnes (NRF-1, mTFA, Nrf2 i SOD1) és una readaptació metabòlica del cervell de les rates sotmeses a suplementació de metionina, els quals semblen no estar modulats pels paràmetres analitzats.

Les proteïnes desacobladores UCPs (de l'anglès, *uncoupling proteins*) s'ha descrit que produeixen diferents funcions en la mitocondria (Echtay 2007), entre elles, produir desacoblament i dissipant així la força protó motriu usada per l'ATP sintasa durant la fosforilació oxidativa (Echtay et al. 2002) i disminuït la producció de ROS. La proteïna desacobladora específica de teixit, la UCP4, s'ha descrit com a mitjancera entre el canvi en el metabolisme energètic i un increment de la resistència neuronal a l'estrès oxidatiu i metabòlic (Mattson, Magnus 2006). La sobrerregulació de la capacitat desacoblant de la mitocondria està descrit que és un efecte del PGC1 α (Puigserver et al. 1998). Per això (Perrone et al. 2010) analitza l'expressió de UCP1 en teixit adipós de rates sotmeses a una RMet del 80% i troba un increment significant de l'expressió gènica d'aquesta proteïna. Aquest resultat van en el mateix sentit que els nostres, ja que també trobem un augment de l'expressió proteica de la proteïna desacobladora UCP4 en cervell de rates sotmeses a RMet80%, tot i que la RMet del 40% sembla no ser suficient per a modificar l'expressió proteica de la proteïna desacobladora específica de cervell. Els nostres resultats de RMet80% en cervell, com els de Perrone i col·laboradors (Perrone et al. 2010) en teixit adipós, suggereixen una inducció potencial desacoblant de la mitocondria produïda per la reducció de metionina en la dieta. La suplementació de metionina, per contra, sembla produir un efecte contrari en la quantitat de UCP4 en cervell ja que aquesta disminueix en un 40%. Aquesta disminució suggereix una capacitat desacoblant minvada de la mitocondria, tot i que no sembla tenir molta repercussió ja que la producció mitocondrial de ROS en cervell de les rates suplementades no varia (dades no publicades).

30. L'EFECTE DE LA RESTRICCIÓ I SUPLEMENTACIÓ DE METIONINA EN LES PROTEÏNES RELACIONADES AMB L'ESTRÈS DE RETICLE ENDOPLASMÀTIC EN CERVELL DE RATA

En condicions fisiològiques normals, les proteïnes relacionades amb la resposta a les proteïnes malplegades o desplegadas (UPR, de l'anglès, *unfolded protein response*) fan la seva funció, amb l'edat, però, les funcions d'aquestes proteïnes es veuen alterades, ja sigui per l'oxidació de les mateixes o per la pèrdua d'activitat, alterant la UPR i creant així l'estrès del reticle endoplasmàtic (RE). L'exacerbació d'aquest estrès s'ha fet palès en el desenvolupament de nombroses patologies associades a l'envelliment, com la diabetis, l'arteriosclerosi i malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer, el Parkinson i l'Esclerosi Lateral Amiotròfica (Naidoo 2009), entre d'altres. Així, per exemple, en les malalties neurodegeneratives de Pick (PiD, del anglès, *pick disease*) i de grans argidòfils (AGD, del anglès, *argyrophilic grain disease*) (Ilieva et al. 2010b, Ilieva et al. 2010a) s'ha trobat recentment una alteració de les proteïnes xaperones i relacionades amb l'estrès de reticle. Ara bé, no tenim constància prèvia dels possibles efectes de les intervencions nutricionals que modulen l'envelliment en l'activitat o expressió d'aquestes proteïnes.

La restricció de metionina en cervell ens mostra un augment de l'expressió proteica de la xaperona clau reguladora del procés de UPR, la GRP78, com també de l'altra xaperona, la GRP94, la qual és la proteïna més abundant del RE (Argon, Simen 1999). Els nivells de GRP78 són crítics per al correcte plegament i pel control de qualitat proteic en el lumen del RE (apartat 7.1). Diferents estudis mostren una minvada expressió dels nivells d'aquesta proteïna associada a l'envelliment. Així, en l'hipocamp de rates Wistar d'edat avançada (23-26 mesos) comparades amb rates adultes joves (4-6 mesos) s'ha trobat una expressió gènica i proteica reduïda de GRP78 (Paz Gavilan et al. 2006). En còrtex cerebral de ratolí succeeix el mateix, una disminució del 30% de l'expressió proteica de GRP78 amb l'edat, comparant ratolins d'edat avançada (22-24 mesos) amb joves de 3 mesos d'edat (Naidoo et al. 2008). Aquesta disminució també s'observa en altres teixits, com ho demostra un estudi realitzat en múltiples òrgans de rata de diferents edats [recent nascudes (0-4 dies d'edat), joves (1 mes d'edat), adultes (6 mesos d'edat) i velles (més de 18 mesos d'edat)] en que l'expressió de la xaperona GRP78 en l'edat jove es troba augmentada respecte a l'edat avançada tant en còrtex, en cerebel, en pulmó, en fetge, en ronyó, en cor i en la melsa d'aquests

animals (Hussain, Ramaiah 2007). Un altre treball en fetge de rata demostra una disminució del 40% en els animals d'edat avançada de l'expressió de la xaperona GRP78 a intervals regulars de 21 dies fins a la mort (Erickson, Dunning & Holtzman 2006). Posteriorment Nuss i col·laboradors (Nuss et al. 2008) demostren un 20% de disminució en l'activitat d'ATPasa de la xaperona GRP78 en fetge de ratolins d'edat avançada (20-24 mesos) en comparació amb els joves (3 mesos d'edat). Un treball anterior a tots aquests, també mostra una marcada reducció del contingut proteic de GRP78 (un 50%) en fetge de ratolins d'edat avançada (24 mesos) comparat amb els joves (3 mesos d'edat) (Rabek, Boylston & Papaconstantinou 2003).

Amb l'envelliment també s'ha observat un declini de la proteïna isomerasa PDI, la qual és l'encarregada de plegar les proteïnes catalitzant la formació dels ponts disulfur i protegint així les cèl·lules del dany oxidatiu. Aquesta isomerasa s'ha trobat amb activitat reduïda en un 45% en fetge de ratolí d'edat avançada (20-24 mesos) comparat amb ratolins joves (3-5 mesos) (Nuss et al. 2008, Rabek, Boylston & Papaconstantinou 2003); com també en hipocamp de rata d'edat avançada (24-26 mesos) en relació al de rates joves (3-5 mesos) (Paz Gavilan et al. 2006). En el cervell de RMet, però, no es troba un augment significatiu com en el cas de les xaperones, tot i que sembla que té una tendència a l'augment dels seus nivells proteics. Ara bé, dins de la família de les tioredoxines, existeixen altres proteïnes diferents a la PDI també encarregades de realitzar aquesta funció, com les ERp57, ERp52, PDIR i P2 (Ferrari, Soling 1999). En aquest sentit, un estudi en fetge de rata demostra una disminució de ERp55 i ERp57, del 51% i 32% respectivament en les rates d'edat avançada (Erickson, Dunning & Holtzman 2006), per tant seria necessari explorar altres tipus de tioredoxines, pensant però que podrien estar augmentades com s'intueix en la proteïna PDI en RMet.

El descens de GRP78 i PDI amb l'edat pot ser en part, per l'efecte de l'estrès oxidatiu sobre aquestes proteïnes, ja que recentment s'ha trobat també un increment de l'oxidació de proteïnes clau residents al RE amb l'envelliment. GRP78, PDI es troben carbonilades en fetge de ratolí amb l'edat, compromentent el plegament proteic i la formació de ponts disulfur (Nuss et al. 2008, Rabek, Boylston & Papaconstantinou 2003).

L'augment de les xaperones GRP94 i GRP78 i PDI amb la RMet en cervell sembla revertir el declini, especialment de la màxima reguladora, la GRP78, observat tant a nivell transcripcional com proteic amb l'envelliment. Declini que irromp en l'homeòstasi del RE i en l'eficiència del plegament proteic.

Tot i la marcada inducció de la xaperona GRP78 en cervell de RMet, el factor ATF6 situat a la membrana del RE no mostra cap diferència en els seus nivells proteics. Aquest fet pot suggerir dos situacions: 1) que els nivells proteics alts de xaperones (GRP78 i 94) no vagin acompanyats de nivells alts de transcripció, ja que ATF6 activa la transcripció de les xaperones del RE (seria necessari experiments posteriors per esbrinar-ho) o, 2) que l'augment de les xaperones no està produït per la inducció d'ATF6, sinó per altres sensors de la resposta a les proteïnes malplegades (PERK o IRE), els quals no han estat analitzats en el nostre treball, però que seria bo realitzar-ho en un futur. Ara bé, amb els nostres resultats podem postular que la situació 1 és certa. Primerament hem observat una disminució significativa de la proteïna XBP1, la qual està induïda pel sensor IRE1. Aquesta disminució proteica pot suggerir que l'augment de les xaperones GRP78 i 94 estigui produït per una alta expressió de XBP1s en el nucli i per tant una baixa expressió proteica de la seva forma inactiva XBP1 en el citosol. Sugerint la via de IRE1 com la via augmentada en la RMet en cervell (Figura 17). Per altra banda, trobem augmentats els nivells del receptor transmembrana KDEL situat en l'aparell de Golgi i que reconeix la seqüència C-terminal de les xaperones GRP78, GRP94 i de la proteïna plegadora PDI, actuant de retrotransportador d'aquestes de l'aparell de Golgi al lumen del RE (Capitani, Sallesse 2009). Per tant, si aquest receptor també està augmentat, explicaria el fet que hi ha més transcripció de les xaperones (GRP78 i 94) i de la proteïna PDI.

Amb tot, els resultats de suplementació de metionina en cervell no mostren canvis significatius en cap de les proteïnes analitzades. Aquest fet dona més importància als resultats obtinguts en RMet, suggerint que amb una reducció del 40% en la ingesta de metionina, hi ha canvis metabòlics dels nivells de les proteïnes relacionades amb el plegament proteic i el control de qualitat d'aquestes. Segurament seria necessari aplicar el tractament de suplementació de metionina a més llarg termini i analitzar també altres òrgans per determinar els possibles canvis induït per l'augment de metionina. De totes maneres és necessari, però, realitzar molts més experiments en aquest sentit per a poder discernir si la resposta a les proteïnes desplegadas i l'estrès

de RE estan implicats en els mecanismes de l'alentiment del procés d'envelliment produït per la RMet, tot i que els nostres resultats semblen apuntar un efecte contrari a l'evidenciat en el procés d'envelliment i que podria ser beneficiós per a l'organisme.

31. L'EFECTE DE LA RESTRICCIÓ DE METIONINA SOBRE LA PROTEÒMICA EN MITOCÒNDRIA DE FETGE DE RATA

La restricció de metionina sembla que té efectes mimètics a la restricció calòrica, que la RMet pot explicar part de l'allargament de la longevitat que es dona en la RC (Pamplona, Barja 2006). En els nostres experiments hem demostrat que la restricció de metionina produeix un descens del dany oxidatiu endogen a nivell de l'ADN mitocondrial, com també del dany oxidatiu proteic. També hem trobat canvis en les proteïnes relacionades amb la biogènesi mitocondrial i el control de qualitat proteic de les proteïnes del reticle endoplasmàtic. Per tal d'aprofundir i intentar esbrinar els possibles mecanismes modificats en la restricció de metionina, el següent pas ha estat intentar discernir si existeixen diferències en el proteoma mitocondrial del fetge de les rates sotmeses a RMet80%.

En la literatura, segons ens consta, no existeix cap estudi en el qual hagin estudiat els efectes de la restricció de metionina sobre el proteoma mitocondrial de rata. Existeixen, però, alguns treballs en els que s'ha estudiat canvis en el proteoma produïts per la restricció calòrica com també per l'envelliment en rates. Chang i col·laboradors demostren canvis en el proteoma mitocondrial de fetge, cor i múscul esquelètic de rata amb l'envelliment i la RC en rates, (Chang et al. 2007) i un altre grup, Valle i col·laboradors, demostra canvis en l'expressió del perfil proteòmic en fetge de rata i en teixit adipós marró induïts per la restricció calòrica en rates Wistar (Valle et al. 2008b, Valle et al. 2008a). A més a més, també hi ha estudis en altres espècies, els quals demostren disminució del dany oxidatiu en el proteoma de llevat induïts per una RC (Reverter-Branchat et al. 2004). Els nostres resultats ens indiquen que l'expressió del perfil proteòmic de les mitocòndries de fetge de rata es troba modificat en el grup de RMet en comparació al grup control. Els processos biològics implicats són la β -oxidació dels àcids grassos, el cicle de la urea, el transport aniònic, la resposta antioxidant a l'estrès oxidatiu i la cadena de transport electrònic i la fosforilació oxidativa. De les proteïnes identificades, totes elles estan sobreexpressades en el grup de RMet 80%, excepte la 3-cetoacil-CoA tiolasa, la qual es troba més augmentada en el grup control.

La 3-cetoacil-CoA tiolasa és un enzim que catalitza l'últim pas de l'oxidació dels àcids grassos en el qual l'acetil-CoA s'allibera i es forma un èster de CoA amb dos àtoms de carboni menys. També s'ha identificat una altra proteïna involucrada en el metabolisme dels àcids grassos, la $\Delta^{3,5}$ - $\Delta^{2,4}$ -dienil CoA isomerasa, en aquest cas però, l'expressió proteica d'aquesta es troba augmentada en el grup de RMet. Aquesta proteïna pertany a la família de les enoil-CoA hidratases/isomerases; és un enzim auxiliar de la β -oxidació dels àcids grassos insaturats (Zhang et al. 2001), el qual catalitza la isomerització del 3-trans,5-cis-dienoil CoA a 2-trans,4-trans-dienoil CoA. Aquesta aparent discrepància en la disminució de la 3-cetoacil-CoA tiolasa i un augment de la $\Delta^{3,5}$ - $\Delta^{2,4}$ -dienil CoA isomerasa en la mitocondria hepàtica de les rates sotmeses podria explicar els canvis observats en la composició dels àcids grassos de les membranes lipídiques en fetge dels animals sotmesos a aquesta intervenció nutricional. Si la $\Delta^{3,5}$ - $\Delta^{2,4}$ -dienil CoA isomerasa es troba augmentada pot suggerir que es produeix més oxidació dels àcids grassos insaturats, concretament dels poliinsaturats. La disminució de la 3-cetoacil-CoA tiolasa podria explicar-se per una menor oxidació total del tots els àcids grassos en comparació a la oxidació dels poliinsaturats. Ara bé, caldria realitzar més experiments per a corroborar aquest fet.

Una de les altres proteïnes expressades diferencialment és la proteïna involucrada en el transport aniònic mitocondrial ubicada a la membrana mitocondrial externa, la Porina o proteïna de canal aniònic dependent de voltatge (Figura 3). Curiosament, en els nostres experiments d'immunotransferència, hem utilitzat la porina com a marcador de massa mitocondrial (Hanson et al. 2001), i en els resultats d'aquesta tècnica en les mateixes mostres, trobem també un augment significatiu de la quantitat d'aquesta proteïna (100 ± 13 i 172 ± 3 , grup control i RMet80%, respectivament; imatge de la immunotrasferència a la figura S2, annex I). Al considerar la porina com a marcadora de massa mitocondrial, si a mateixa quantitat de proteïna tenim més porina, podríem dir que també tenim més mitocondries. Un estudi recent sobre el recanvi proteic en fetge de ratolí demostra que la restricció calòrica accelera el recanvi mitocondrial, passant de 1,83 dies de vida mitja de la mitocondria a 1,16 dies després de 3 mesos de restricció dietètica (Miwa, Lawless & von Zglinicki 2008). Aquests resultats suggereixen un recanvi mitocondrial major induït per la restricció de metionina, de la mateixa manera que succeeix en restricció calòrica, originant mitocondries més eficients.

La catalasa és una de les altres proteïnes sobreexpressades en el proteoma del grup de RMet. Aquesta proteïna tal i com s'ha explicat en l'apartat 2.5.1, és un enzim antioxidant, encarregat d'eliminar el peròxid d'hidrogen (Figura 7). El fet que estigui augmentat va en el sentit contrari a l'esperat, ja que la restricció de metionina disminueix la producció mitocondrial de ROS, a més a més, la catalasa té una baixa afinitat pel peròxid d'hidrogen i només és actiu quan aquest es troba a altes concentracions. Aquesta proteïna es troba augmentada en mitocòndria de fetge de rata d'edat avançada en comparació a la rata jove (Chang et al. 2007). En aquesta línia, també es troba una altra proteïna relacionada amb la cadena de transport electrònic i la fosforilació oxidativa. En aquest mateix estudi troben que la subunitat γ de l'ATP sintasa està augmentada en la mateixa condició que la catalasa, i també en mitocòndria de fetge de rata d'edat avançada sotmesa a RC en relació a la rata jove (Chang et al. 2007). En RMet, hem trobat augmentada una altra subunitat de la mateixa proteïna, la subunitat d.

L'últim procés biològic implicat és el cicle de la urea. Hem identificat l'aspartat aminotransferasa. Aquesta és un enzim que juga un paper important en el metabolisme dels aminoàcids, és important per l'intercanvi de metabòlits entre la mitocòndria i el citosol, facilita l'absorció cel·lular dels àcids grassos de cadena llarga i catalitza la transformació del L-aspartat a L-glutamat. El fet que aquest enzim es trobi augmentat en el grup de RMet pot suggerir un augment del recanvi proteic i detoxificació metabòlica, fet que podria afavorir l'augment de longevitat observat en RMet. Amb tot, però, seria necessari més experiments per a corroborar-ho.

32.L'EFECTE DE LA RESTRICCIÓ I SUPLEMENTACIÓ DE METIONINA SOBRE LA QUANTITAT DELS SEUS METABÒLITS EN CERVELL DE RATA

Es coneix que canvis en la ingesta de metionina indueix canvis en els metabòlits d'aquest aminoàcid essencial, incloent SAM i SAH (Finkelstein, Martin 1986). En l'experiment de RAAs(-Met), no s'han trobat diferències entre aquests metabòlits, com tampoc en el potencial de metilació (SAM/SAH), fet atribuïble a la no variació de la metionina en els dos grups. Tampoc s'han trobat canvis en els nivells de metionina, SAM i SAH en cervell de les rates restringides en metionina, com en les relacions Met/SAM i SAM/SAH. Aquest fet corrobora la hipòtesi que una restricció de metionina no altera els canvis dels seus metabòlits, podent-se donar el cicle fisiològic normal. A

més a més està d'acord, tal i com veiem en els resultats d'anàlisi composicional d'aminoàcids en cervell de rates de RMet80% (Taula 14), que ni la restricció del 80%, com tampoc la del 40% produeixen canvis en els nivells de metionina en el teixit nerviós. Ara bé, no succeeix el mateix en el cervell de les rates sotmeses a la suplementació de metionina, on si que s'observen canvis en els seus metabòlits.

La suplementació de metionina pot ser perjudicial per l'augment d'ella mateixa o bé per l'increment en la concentració dels seus metabòlits, incloent SAM, SAH i homocisteïna (Regina et al. 1993). En el nostre experiment de suplementació de metionina en cervell es veuen augmentats els nivells de metionina i SAH, com també hem demostrat en altres dos òrgans, en fetge i en cor (Gomez et al. 2009) i s'ha demostrat que dietes altes en metionina o proteïna incrementen els nivells d'homocisteïna en plasma en rosegadors i humans (Velez-Carrasco et al. 2008, Verhoef et al. 2005), encara que altres estudis en ratolins, l'efecte aterogènic de l'excés de metionina no sembla estar relacionat amb un increment d'homocisteïna si no a un efecte tòxic directe de l'excés en si de metionina (Troen et al. 2003). S'ha proposat que l'increment d'homocisteïna en plasma induïda per una suplementació de metionina en la ingesta incrementa la producció de ROS i això fa que s'oxidin les LDL i es produeixi l'arteriosclerosi (Hidioglou et al. 2004). Els nivells d'homocisteïna en plasma incrementen amb l'edat en humans i representen un factor de risc per a patologies neurodegeneratives associades a l'envelliment i a l'estrès oxidatiu, com les malalties vasculares, l'arteriosclerosi, el deteriorament cognitiu, el Parkinson, l'Alzheimer, la demència, els accidents cerebrovasculars i la malaltia renal crònica (Ninomiya et al. 2004, Guo et al. 2008, Obeid, Herrmann 2006).

En els nostres anàlisis dels metabòlits de la metionina no hem estat capaços de detectar l'homocisteïna en teixit, segurament degut a alguna limitació del mètode que pretenem perfeccionar en el futur; ara bé, un estudi bioinformàtic molt recent demostra que els nivells de SAH correlacionen positivament amb els nivells d'homocisteïna en teixits de ratolí i d'humà. Aquest treball demostra per primera vegada un perfil d'expressió gènica de 8 metabòlits de l'homocisteïna i de 12 enzims metilants en 20 teixits d'humans i 19 de ratolí (Chen et al. 2010). En base amb aquests resultats, podem pensar que l'augment d'homocisteïna degut a un augment de metionina en la dieta no sol es veu en plasma, sinó que també succeeix en teixit, fet que suggereix un augment també d'homocisteïna en cervell de les rates SMet. En

cervell de rates Wistar d'edat avançada, la injecció d'homocisteïna incrementa significativament els nivells de marcadors inflamatoris en plasma i hipocamp i còrtex cerebral, suggerint que la inflamació pot estar associada, almenys en part, a les disfuncions neuronals i cardiovasculars observades en pacients homocistinúrics (da Cunha, Ferreira & Wyse 2010). A més a més, un estudi recent demostra un augment de l'estrès oxidatiu en els cervells dels fetus de rates embarassades les quals han estat suplementades en metionina, simulant la hiperhomocisteïnèmia dels humans. L'estrès oxidatiu dels fetus de les rates va acompanyat d'una elevada lipoxidació i fragmentació de l'ADN, la qual és senyal d'apoptosi, i una marcada disminució dels nivells de Bcl-2, el qual és un factor anti-apoptòtic (Koz et al. 2010). És a dir, la metionina i la regulació del seu cicle poden estar involucrats en diferents tipus de patologies. Un altre estudi recent en la població coreana mostra que els individus que posseeixen un dels dos polimorfismes específics de l'enzim MTHFR (Figura 15), enzim regulador important per a la remetilació d'homocisteïna a metionina, estan més predisposats a patir un infart cerebral (Han et al. 2010).

L'homocisteïna conté un grup tiol lliure (Figura 15) el qual pot ser oxidat i generar-se disulfurs mixtes en les proteïnes o bé ponts disulfur entre proteïnes diferents o subunitats diferents dins una mateixa proteïna. Per tant, l'homocisteïna pot ser la responsable de l'increment de la generació de ROS pel complex I de la mateixa manera que s'ha comentat per l'addició del GSSG (apartat 28). Així, la producció de ROS mitocondrial, específicament la producció de ROS pel complex I, pot ser regulada per agents tiòlics incloent l'homocisteïna, oferint així un altre mecanisme plausible per a explicar els efectes de la suplementació de metionina en l'estrès oxidatiu mitocondrial i el dany oxidatiu que se'n deriva. L'efecte mencionat sobre l'addició de GSSG és també interessant ja que pot explicar la correlació directa observada entre la relació GSSG/GSH i els nivells de 8-oxodG en ADN mitocondrial en teixits de ratolins d'edat avançada (de la Asuncion et al. 1996). Paral·lelament alguns estudis *in vitro* mostren un augment de la producció de ROS –estimat amb quimioluminescència mitjançant luminol– en mitocòndries de cor de rata quan aquestes es tracten amb homocisteïna (Chang et al. 2004); encara que aquests experiments s'haurien de repetir usant tècniques més específiques per a extreure conclusions firmes.

Canvis en la metilació de l'ADN podrien ser l'origen parcial de les variacions en l'expressió gènica descrites després d'una suplementació de metionina degut al fet que

la metionina és una donadora de grups metil, concretament el seu metabòlit directe, la S-adenosilmetionina (SAM) (Park et al. 2008, Fukagawa, Galbraith 2004). En el nostre cas, el potencial de metilació (SAM/SAH) en el cervell de les rates sotmeses a restricció no varia, per contra, però, en SMet mostra una disminució del 20%, tot i que no és significativa per la gran variabilitat. Aquesta disminució del potencial de metilació ve donada per uns nivells de SAH superiors als de SAM (Figura 57). Això pot suggerir un consum de SAM en les reaccions de metilació, portant a una hipermetilació de l'ADN, fet que no és beneficiós per a l'organisme (Waterland 2006). Recentment s'ha demostrat que una metilació excessiva podria ser un factor desencadenant clau de la malaltia de Parkinson ja que quan s'injecta SAM en cervell de rata indueix canvis com els associats a aquesta patologia neurodegenerativa (Lee et al. 2008). Per altra banda, en cervell de ratolins transgènics APP que desenvolupen la malaltia d'Alzheimer, es troba una disminució de SAM amb l'edat en els cervells del grup control i una disminució de SAH en els dos grups. El fet que SAM no disminueixi en cervell dels ratolins transgènics amb l'edat suggereix que sigui per una menor demanda endògena produïda per la neurodegeneració, és a dir, en aquest cas per una hipometilació (Hooijmans et al. 2009). A més a més, s'han trobat diferències en els increments de SAM en les diferents regions del sistema nerviós central després de l'administració oral de metionina en rates, fet que reflecteix diferències regionals del metabolisme de la metionina, possiblement en l'activitat de l'enzim metionina adenosiltransferasa (Young, Shalchi 2005). Després de l'administració oral de metionina, aquesta s'absorbeix en el tracte gastrointestinal i passa pel fetge abans d'entrar a la circulació general. Per tant, per a qualsevol dosi de suplementació de metionina, s'esperen nivells de metionina més elevats en fetge que no pas en cervell, fet que s'observa en els nostres resultats en els valors de metionina en cervell i fetge de SMet (Figura 57 i (Gomez et al. 2009), respectivament).

33.SUMARI

Esbrinar quins són els factors que causen la disminució dels ROS i el dany oxidatiu a les macromolècules cel·lulars, les quals incrementen la longevitat a l'aplicar una RC és un camí prometedor per descobrir alguns dels mecanismes fonamentals de l'envelliment en els mamífers. Fins fa poc es creia que era la reducció de les calories *per se* les causants de l'augment de la longevitat. Els estudis de longevitat realitzats en rates i ratolins sotmesos a restricció proteica i de metionina demostren que és possible augmentar la longevitat, simulant un 50% de l'efecte de la restricció calòrica clàssica (40% RC) (Pamplona, Barja 2006). Els resultats dels nostres experiments demostren que, tal i com hipotetitzàvem, tant la restricció proteica com la restricció de metionina disminueixen la lesió molecular endògena. Existeix també una reorganització de la composició en àcids grassos de les membranes (en el mateix sentit que en les espècies longeves, reduint els àcids grassos altament insaturats i augmentant els de baix nombre d'insaturacions) i un augment de la biogènesi mitocondrial i del control de qualitat proteic. Tots aquests efectes no s'observen quan reduïm tots els aminoàcids excepte la metionina, com tampoc quan es produeix una suplementació de metionina. Tot i que, en relació a la suplementació de metionina, seria necessari corroborar-ho amb una intervenció a més llarg termini i realitzar un estudi multi-òrgan. Tot aquests resultats situen i confirmen el fet que la metionina juga un paper clau determinant en el mecanisme o mecanismes pels quals es modula la longevitat de les espècies (i si més no, dels rosegadors), el qual potencialment es podria extrapolar als humans.

Actualment la població occidental consumeix de 3 a 4 vegades els nivells de proteïna recomanats (0,5-0,75 g/kg de pes corporal per dia). Concretament, la metionina, aminoàcid essencial que s'ingereix bàsicament amb les proteïnes de la dieta, també es consumeix en excés. Segons les evidències disponibles (Stipanuk 2004, Fukagawa, Galbraith 2004, Young, Borgonha 2000, Campbell et al. 1994) la ingesta mitjana de metionina per homes i dones als Estats Units d'Amèrica és de 2,3 g/dia (15,4 mmol/dia) i 1,6 g/dia (10,7 mmol/dia), respectivament. El requeriment estimat de metionina en adults es situa entre el 5 i el 13 mg/kg per dia. Fent el càlcul ens surt que se'n consumeix de 2 a 3 vegades el requeriment essencial. L'absorció dels productes proteics a través de l'epiteli intestinal és altament eficient (95-99%) i que els humans adults permaneixen en un balanç de sofre equilibrat, és a dir, la quantitat

d'aminoàcids sulfurats que es catabolitzen per dia és essencialment igual a el que s'ingereix per dia.

La restricció calòrica en humans, tot i que resulta una intervenció possible en alguns individus, com ho demostren alguns estudis (Meyer et al. 2006, McCarty 2003), pot resultar poc viable en general. Els diferents motius són: 1) la forta dificultat pels humans per a modificar els hàbits nutricionals adquirits; 2) l'alt risc de malnutrició, i 3) la possible disminució de la resistència a les condicions actuals de vida estressant, sent aquests dos últims motius més rellevants en el cas dels infants o dels individus d'edat avançada (Pamplona, Barja 2006). Tanmateix, pot resultar molt més practicable una disminució de les proteïnes, i encara més, de la metionina. Un exemple seria els individus vegans, la dieta dels quals es relativament pobre en metionina (McCarty, Barroso-Aranda & Contreras 2009) (cal tenir present, però, que en una dieta vegana és obligatori pendre un suplement de vitamina B12).

En conjunt, la reducció de la ingesta de metionina en la dieta sembla ser possible, la qual pot produir un impacte favorable en la longevitat mitja reduint el risc de càncer, diabetis, malalties coronàries i neurodegeneratives (McCarty, Barroso-Aranda & Contreras 2009) i, fins i tot, en alguns casos, podria suplir les intervencions farmacològiques. Ja que com apunta Wenz (Wenz 2009) en la seva revisió, l'activació de PGC-1 α podria ser una aproximació terapèutica per al tractament de malalties mitocondrials, i, en aquest sentit, els nostres resultats demostren un augment d'aquest coregulador de la biogènesi mitocondrial.

En definitiva, sembla ser que la metionina juga un paper clau en el procés de l'envelliment i la longevitat. Tots els resultats fins al moment ho indiquen; no obstant, queda molt per explorar.

CONCLUSIONS

- 1.** Una restricció proteica del 40% com una restricció de metionina al 80% no produeixen canvis composicionals en el perfil d'aminoàcids de les proteïnes de fetge i cervell de rata.
- 2.** La restricció proteica del 40% i la restricció de metionina al 40 i 80% disminueixen el dany oxidatiu a l'ADN mitocondrial en fetge, com també una restricció de metionina al 80% en cervell de rata. Per contra, una suplementació de metionina augmenta el dany oxidatiu a l'ADN mitocondrial i la restricció de tots els aminoàcids, excepte la metionina, no altera el dany oxidatiu a l'ADN mitocondrial en fetge de l'animal.
- 3.** La restricció de proteïnes i de metionina com també la de tots els aminoàcids excepte la metionina disminueixen el dany oxidatiu proteic directe en fetge i cervell de rata a nivell dels marcadors semialdehid glutàmic (SAG) i semialdehid amino-adípic (SAAA). La suplementació de metionina no exerceix canvis significatius en el dany oxidatiu proteic directe.
- 4.** La restricció de proteïnes i de metionina com també la de tots els aminoàcids, excepte la metionina, disminueixen el dany oxidatiu proteic derivat de glicoxidació en fetge i cervell de rata a nivell del marcador N^ε-(Carboxietil)lisina (CEL). La suplementació de metionina no exerceix canvis significatius en el dany oxidatiu proteic derivat de glicoxidació.
- 5.** La restricció de proteïnes i de metionina com també la de tots els aminoàcids excepte la metionina disminueixen el dany oxidatiu proteic derivat de lipoxidació en fetge i cervell de rata a nivell del marcador malondialdehid-lisina (MDAL). La suplementació de metionina no exerceix canvis significatius en el dany oxidatiu proteic derivat de lipoxidació.
- 6.** La restricció de proteïnes i de metionina com també la de tots els aminoàcids excepte la metionina disminueixen el dany oxidatiu proteic derivat de glico i lipoxidació en fetge i cervell de rata a nivell de la carboximetilació en l'aminoàcid lisina, N^ε-(carboximetil)lisina (CML). La suplementació de metionina

no exerceix canvis significatius en el dany oxidatiu proteic derivat de glico com lipoxidació, mesurat amb el marcador CML.

- 7.** Detectem la carboximetilació en l'aminoàcid cisteïna, la CMC, mitjançant tècniques d'espectrometria de masses. CMC es forma *in vivo* i es detecta en mostres de mitocondria de fetge de rata. La restricció de metionina al 40 i 80% disminueix significativament els nivells de CMC. CMC esdevé un biomarcador d'estrès oxidatiu a nivell mitocondrial, anàlogament al marcador carboximetil-lisina (CML).
- 8.** Les intervencions nutricionals realitzades, la restricció proteica, de metionina, de tots els aminoàcids menys la metionina, i la suplementació en metionina, provoquen un canvi en la composició lipídica de les membranes tant en fetge com en cervell.
- 9.** Totes les intervencions nutricionals realitzades produeixen una disminució del grau d'insaturació de membrana i de la susceptibilitat a ser oxidades, provocat per la reorganització en la composició dels tipus d' àcids grassos, fet que fa variar les propietats químiques, però no físiques de les membranes lipídiques.
- 10.** La restricció de proteïnes i de metionina disminueixen el contingut del complex I i III mitocondrials, responsables de la producció de ROS per la cadena de transport mitocondrial, la primera en fetge i la segona en fetge i cervell de rata. La restricció de tots els aminoàcids, excepte la metionina, com la suplementació de metionina no afecta al contingut d'aquests dos complexos. La disminució del CI per la RMet en fetge va acompanyada de la reducció d'AIF, la qual sembla estar implicada en el manteniment d'aquest complex mitocondrial.
- 11.** La restricció de metionina augmenta la biogènesi mitocondrial en cervell, augmentant els nivells del seu màxim regulador, el coactivador PGC-1 α , en una restricció del 80%, però també augmenta el factor de transcripció mitocondrial (mTFA) en una restricció del 40%. Contràriament, la suplementació de

metionina en cervell disminueix el contingut de PGC-1 α suggerint una disminució de la biogènesi mitocondrial produït per l'augment de la metionina.

12. La restricció de metionina al 80% en cervell augmenta la proteïna desacobladora UCP4, suggerint una resistència a l'estrès oxidatiu i metabòlic. La restricció del 40% de metionina no és capaç de produir aquest efecte i la suplementació de metionina exerceix l'efecte contrari en cervell.

13. La restricció de metionina al 40% en cervell és capaç d'augmentar les proteïnes xaperones relacionades amb el plegament proteic i l'estrès de reticle endoplasmàtic, efecte contrari al que succeeix amb l'edat en el teixit nerviós. La suplementació de metionina no mostra cap canvi en el nivell d'aquestes proteïnes.

14. La restricció de metionina al 40% no afecta als nivells de la metionina i tampoc dels seus metabòlits. Contràriament, la suplementació de metionina sí que augmenta els nivells de metionina i de S-adenosilhomocisteïna (SAH), suggerint una possible causa d'hiperhomocisteïnemia produïda per l'augment de metionina en la ingesta.

BIBLIOGRAFIA

A

- Ahmed, M.U., Brinkmann Frye, E., Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R. & Baynes, J.W. 1997, "N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins", *The Biochemical Journal*, vol. 324 (Pt 2), no. Pt 2, pp. 565-570.
- Archer, V.E. 2003, "Does dietary sugar and fat influence longevity?", *Medical Hypotheses*, vol. 60, no. 6, pp. 924-929.
- Argon, Y. & Simen, B.B. 1999, "GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties", *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 10, no. 5, pp. 495-505.
- Ayala, A. & Cutler, R.G. 1996, "Comparison of 5-hydroxy-2-amino valeric acid with carbonyl group content as a marker of oxidized protein in human and mouse liver tissues", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 21, no. 4, pp. 551-558.

B

- Baldwin, J.E., Killin, S.J., Adlington, R.M. & Spiegel, U. 1988, "Synthesis of n-benzyloxycarbonyl-l-alpha-aminoadipic acid, alpha-benzyl ester", *Tetrahedron*, vol. 44, no. 9, pp. 2633.
- Barger, J.L., Walford, R.L. & Weindruch, R. 2003, "The retardation of aging by caloric restriction: Its significance in the transgenic era", *Experimental Gerontology*, vol. 38, no. 11-12, pp. 1343-1351.
- Barja, G. 2001, "Mitochondrial Ubiquinone" in *Coenzyme Q10: Biochemical, Functional, Medical and Therapeutic Aspects in Human Health and Diseases.*, eds. M. Ebadi, J. Marwah & R. Chopra, Prominent Press, Scottsdale, USA.
- Barja, G. 2007, "Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: Implications for aging studies", *Rejuvenation Research*, vol. 10, no. 2, pp. 215-224.
- Barja, G. 2004a, "Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: A mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism?", *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, vol. 79, no. 2, pp. 235-251.
- Barja, G. 2004b, "Free radicals and aging", *Trends in Neurosciences*, vol. 27, no. 10, pp. 595-600.
- Barja, G. 2000, "The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate", *Aging (Milan, Italy)*, vol. 12, no. 5, pp. 342-355.
- Barja, G. & Herrero, A. 1998, "Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 30, no. 3, pp. 235-243.
- Baynes, J.W. 1991, "Role of oxidative stress in development of complications in diabetes", *Diabetes*, vol. 40, no. 4, pp. 405-412.
- Baynes, J.W., Monnier, V.M., Ames, J.M. & Thorpe, S.R. 2005, *The Maillard Reaction: Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease*, New York Academy of Sciences, New York.
- Benzi, G. & Moretti, A. 1995, "Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 19, no. 1, pp. 77-101.
- Bert, P. 1878, *La Pression Barométrique: Reserches De Physiologie Experimentale*. Masson, Paris.

- Bielski, B.H., Arudi, R.L. & Sutherland, M.W. 1983, "A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 258, no. 8, pp. 4759-4761.
- Bignami, M., O'Driscoll, M., Aquilina, G. & Karran, P. 2000, "Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents", *Mutation Research*, vol. 462, no. 2-3, pp. 71-82.
- Bjelland, S. & Seeberg, E. 2003, "Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation", *Mutation Research*, vol. 531, no. 1-2, pp. 37-80.
- Boily, G., Seifert, E.L., Bevilacqua, L., He, X.H., Sabourin, G., Estey, C., Moffat, C., Crawford, S., Saliba, S., Jardine, K., Xuan, J., Evans, M., Harper, M.E. & McBurney, M.W. 2008, "SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice", *PLoS One*, vol. 3, no. 3, pp. e1759.
- Boveris, A. & Cadenas, E. 2000, "Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubiquinone", *IUBMB Life*, vol. 50, no. 4-5, pp. 245-250.
- Boveris, A., Cadenas, E. & Stoppani, A.O. 1976, "Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide", *The Biochemical Journal*, vol. 156, no. 2, pp. 435-444.
- Boveris, A., Oshino, N. & Chance, B. 1972, "The cellular production of hydrogen peroxide", *The Biochemical Journal*, vol. 128, no. 3, pp. 617-630.
- Bradford, M.M. 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254.
- Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I.R., Blaisdell, B.E. & Karlin, S. 1992, "Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 6, pp. 2002-2006.
- Brosnan, J.T. & Brosnan, M.E. 2006, "The sulfur-containing amino acids: An overview", *The Journal of Nutrition*, vol. 136, no. 6 Suppl, pp. 1636S-1640S.
- Brown, G.C. & Borutaite, V. 2004, "Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols", *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1658, no. 1-2, pp. 44-49.
- Bunn, H.F. & Higgins, P.J. 1981, "Reaction of monosaccharides with proteins: Possible evolutionary significance", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 213, no. 4504, pp. 222-224.
- Burren, K.A., Mills, K., Copp, A.J. & Greene, N.D. 2006, "Quantitative analysis of s-adenosylmethionine and s-adenosylhomocysteine in neurulation-stage mouse embryos by liquid chromatography tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography.B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 844, no. 1, pp. 112-118.

C

- Cai, Q., Tian, L. & Wei, H. 1996, "Age-dependent increase of indigenous DNA adducts in rat brain is associated with a lipid peroxidation product", *Experimental Gerontology*, vol. 31, no. 3, pp. 373-385.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Mancuso, C., Pennisi, G., Calafato, S., Bellia, F., Bates, T.E., Giuffrida Stella, A.M., Schapira, T., Dinkova Kostova, A.T. & Rizzarelli, E. 2008, "Cellular stress response: A novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity", *Neurochemical Research*, vol. 33, no. 12, pp. 2444-2471.
- Campbell, W.W., Crim, M.C., Dallal, G.E., Young, V.R. & Evans, W.J. 1994, "Increased protein requirements in elderly people: New data and retrospective reassessments", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 60, no. 4, pp. 501-509.
- Capitani, M. & Sallese, M. 2009, "The KDEL receptor: New functions for an old protein", *FEBS Letters*, vol. 583, no. 23, pp. 3863-3871.

- Caro, P., Gomez, J., Lopez-Torres, M., Sanchez, I., Naudi, A., Jove, M., Pamplona, R. & Barja, G. 2008, "Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver", *Biogerontology*, vol. 9, no. 3, pp. 183-196.
- Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., Garcia, R., Lopez-Torres, M., Naudi, A., Portero-Otin, M., Pamplona, R. & Barja, G. 2009a, "Effect of 40% restriction of dietary amino acids (except methionine) on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver", *Biogerontology*, vol. 10, no. 5, pp. 579-592.
- Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., Naudi, A., Ayala, V., Lopez-Torres, M., Pamplona, R. & Barja, G. 2009b, "Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria", *Rejuvenation Research*, vol. 12, no. 6, pp. 421-434.
- Chang, J., Cornell, J.E., Van Remmen, H., Hakala, K., Ward, W.F. & Richardson, A. 2007, "Effect of aging and caloric restriction on the mitochondrial proteome", *The Journals of Gerontology.Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 62, no. 3, pp. 223-234.
- Chang, L., Zhao, J., Xu, J., Jiang, W., Tang, C.S. & Qi, Y.F. 2004, "Effects of taurine and homocysteine on calcium homeostasis and hydrogen peroxide and superoxide anions in rat myocardial mitochondria", *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, vol. 31, no. 4, pp. 237-243.
- Chao, C.C., Ma, Y.S. & Stadtman, E.R. 1997, "Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 7, pp. 2969-2974.
- Chen, D. & Guarente, L. 2007, "SIR2: A potential target for calorie restriction mimetics", *Trends in Molecular Medicine*, vol. 13, no. 2, pp. 64-71.
- Chen, N.C., Yang, F., Capecci, L.M., Gu, Z., Schafer, A.I., Durante, W., Yang, X.F. & Wang, H. 2010, "Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues", *The FASEB Journal*, DOI: 10.1096/fj.09-143651.
- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L. & Lesnefsky, E.J. 2003, "Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 38, pp. 36027-36031.
- Chinta, S.J., Rane, A., Yadava, N., Andersen, J.K., Nicholls, D.G. & Polster, B.M. 2009, "Reactive oxygen species regulation by AIF- and complex I-depleted brain mitochondria", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 46, no. 7, pp. 939-947.
- Cho, H.P., Nakamura, M. & Clarke, S.D. 1999a, "Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 52, pp. 37335-37339.
- Cho, H.P., Nakamura, M.T. & Clarke, S.D. 1999b, "Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian delta-6 desaturase", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 1, pp. 471-477.
- Civitaresse, A.E., Carling, S., Heilbronn, L.K., Hulver, M.H., Ukropcova, B., Deutsch, W.A., Smith, S.R., Ravussin, E. & CALERIE Pennington Team 2007, "Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans", *PLoS Medicine*, vol. 4, no. 3, pp. e76.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., van Zanden, J. & van Bladeren, P.J. 2001, "The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 10, no. 4, pp. 141-152.
- Cohen, H.Y., Miller, C., Bitterman, K.J., Wall, N.R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K.T., Gorospe, M., de Cabo, R. & Sinclair, D.A. 2004, "Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 305, no. 5682, pp. 390-392.

Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Cruzen, C., Simmons, H.A., Kemnitz, J.W. & Weindruch, R. 2009, "Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 325, no. 5937, pp. 201-204.

Commoner, B., Townsend, J. & Pake, G.E. 1954, "Free radicals in biological materials", *Nature*, vol. 174, no. 4432, pp. 689-691.

Copple, I.M., Goldring, C.E., Kitteringham, N.R. & Park, B.K. 2008, "The Nrf2-Keap1 defence pathway: Role in protection against drug-induced toxicity", *Toxicology*, vol. 246, no. 1, pp. 24-33.

Curran, S.P. & Ruvkun, G. 2007, "Lifespan regulation by evolutionarily conserved genes essential for viability", *PLoS Genetics*, vol. 3, no. 4, pp. e56.

D

da Cunha, A.A., Ferreira, A.G. & Wyse, A.T. 2010, "Increased inflammatory markers in brain and blood of rats subjected to acute homocysteine administration", *Metabolic Brain Disease*, vol. 25, no. 2, pp. 199-206.

Davies, S.M., Poljak, A., Duncan, M.W., Smythe, G.A. & Murphy, M.P. 2001, "Measurements of protein carbonyls, ortho- and meta-tyrosine and oxidative phosphorylation complex activity in mitochondria from young and old rats", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 31, no. 2, pp. 181-190.

de Grey, A.D. 2001, "A proposed mechanism for the lowering of mitochondrial electron leak by caloric restriction", *Mitochondrion*, vol. 1, no. 2, pp. 129-139.

de Grey, A.D. 2000, "The reductive hotspot hypothesis: An update", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 373, no. 1, pp. 295-301.

de la Asuncion, J.G., Millan, A., Pla, R., Bruseghini, L., Esteras, A., Pallardo, F.V., Sastre, J. & Vina, J. 1996, "Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA", *The FASEB Journal*, vol. 10, no. 2, pp. 333-338.

De la Fuente, M. 2009, "Teorías Del Envejecimiento" in *Retos De La Nutrición En El Siglo XXI Ante El Envejecimiento Poblacional*, ed. International Marketing & Communication, Instituto Tomás Pascual Sanz para la nutrición y la salud. Universidad de San Pablo CEU, Madrid, pp. 29-48.

Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M.J. 1997, "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation", *The Biochemical Journal*, vol. 324 (Pt 1), no. Pt 1, pp. 1-18.

Debier, C. & Larondelle, Y. 2005, "Vitamins A and E: Metabolism, roles and transfer to offspring", *The British Journal of Nutrition*, vol. 93, no. 2, pp. 153-174.

Demin, O.V., Kholodenko, B.N. & Skulachev, V.P. 1998, "A model of O₂-generation in the complex III of the electron transport chain", *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 184, no. 1-2, pp. 21-33.

Deplancke, B. & Gaskins, H.R. 2002, "Redox control of the transsulfuration and glutathione biosynthesis pathways", *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, vol. 5, no. 1, pp. 85-92.

Desai, V.G., Weindruch, R., Hart, R.W. & Feuers, R.J. 1996, "Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 333, no. 1, pp. 145-151.

Di Domenico, F., Sultana, R., Tiu, G.F., Scheff, N.N., Perluigi, M., Cini, C. & Butterfield, D.A. 2010, "Protein levels of heat shock proteins 27, 32, 60, 70, 90 and thioredoxin-1 in amnesic mild cognitive impairment: An investigation on the role of cellular stress response in the progression of alzheimer disease", *Brain Research*, vol. 28, no. 1333, pp. 72-81.

- Dillin, A., Hsu, A.L., Arantes-Oliveira, N., Lehrer-Graiwer, J., Hsin, H., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J. & Kenyon, C. 2002, "Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 298, no. 5602, pp. 2398-2401.
- Dinardo, M.M., Musicco, C., Fracasso, F., Milella, F., Gadaleta, M.N., Gadaleta, G. & Cantatore, P. 2003, "Acetylation and level of mitochondrial transcription factor A in several organs of young and old rats", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 301, no. 1, pp. 187-191.
- Drabkin, H.J. & RajBhandary, U.L. 1998, "Initiation of protein synthesis in mammalian cells with codons other than AUG and amino acids other than methionine", *Molecular and Cellular Biology*, vol. 18, no. 9, pp. 5140-5147.
- Draper, H.H., Agarwal, S., Nelson, D.E., Wee, J.J., Ghoshal, A.K. & Farber, E. 1995, "Effects of peroxidative stress and age on the concentration of a deoxyguanosine-malondialdehyde adduct in rat DNA", *Lipids*, vol. 30, no. 10, pp. 959-961.
- Dreger, H., Westphal, K., Weller, A., Baumann, G., Stangl, V., Meiners, S. & Stangl, K. 2009, "Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: A novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection", *Cardiovascular Research*, vol. 83, no. 2, pp. 354-361.
- Dreger, H., Westphal, K., Wilck, N., Baumann, G., Stangl, V., Stangl, K. & Meiners, S. 2010, "Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2", *Cardiovascular Research*, vol. 85, no. 2, pp. 395-403.
- Droge, W. 2002, "Free radicals in the physiological control of cell function", *Physiological Reviews*, vol. 82, no. 1, pp. 47-95.
- Dubey, A., Forster, M.J., Lal, H. & Sohal, R.S. 1996, "Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 333, no. 1, pp. 189-197.
- Durand, P., Prost, M., Loreau, N., Lussier-Cacan, S. & Blache, D. 2001, "Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease", *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, vol. 81, no. 5, pp. 645-672.

E

- Echtay, K.S. 2007, "Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role?", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 43, no. 10, pp. 1351-1371.
- Echtay, K.S., Esteves, T.C., Pakay, J.L., Jekabsons, M.B., Lambert, A.J., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Vidal-Puig, A.J., Wang, S., Roebuck, S.J. & Brand, M.D. 2003, "A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling", *The EMBO Journal*, vol. 22, no. 16, pp. 4103-4110.
- Echtay, K.S., Murphy, M.P., Smith, R.A., Talbot, D.A. & Brand, M.D. 2002, "Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. studies using targeted antioxidants", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 49, pp. 47129-47135.
- Embley, T.M. & Martin, W. 2006, "Eukaryotic evolution, changes and challenges", *Nature*, vol. 440, no. 7084, pp. 623-630.
- Erickson, R.R., Dunning, L.M. & Holtzman, J.L. 2006, "The effect of aging on the chaperone concentrations in the hepatic, endoplasmic reticulum of male rats: The possible role of protein misfolding due to the loss of chaperones in the decline in physiological function seen with age", *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 61, no. 5, pp. 435-443.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J. & Zollner, H. 1991, "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 11, no. 1, pp. 81-128.

F

- Falkowski, P.G. & Godfrey, L.V. 2008, "Electrons, life and the evolution of earth's oxygen cycle", *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, vol. 363, no. 1504, pp. 2705-2716.
- Fau, D., Peret, J. & Hadjiisky, P. 1988, "Effects of ingestion of high protein or excess methionine diets by rats for two years", *The Journal of Nutrition*, vol. 118, no. 1, pp. 128-133.
- Ferrari, C.K. 2004, "Functional foods, herbs and nutraceuticals: Towards biochemical mechanisms of healthy aging", *Biogerontology*, vol. 5, no. 5, pp. 275-289.
- Ferrari, D.M. & Soling, H.D. 1999, "The protein disulphide-isomerase family: Unravelling a string of folds", *The Biochemical Journal*, vol. 339 (Pt 1), no. Pt 1, pp. 1-10.
- Finkelstein, J.D. & Martin, J.J. 1986, "Methionine metabolism in mammals. adaptation to methionine excess", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, no. 4, pp. 1582-1587.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. 1957, "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 226, no. 1, pp. 497-509.
- Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P. & Ames, B.N. 1990, "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 12, pp. 4533-4537.
- Frye, R.A. 2000, "Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 273, no. 2, pp. 793-798.
- Fukagawa, N.K. & Galbraith, R.A. 2004, "Advancing age and other factors influencing the balance between amino acid requirements and toxicity", *The Journal of Nutrition*, vol. 134, no. 6 Suppl, pp. 1569S-1574S.

G

- Gabbita, S.P., Butterfield, D.A., Hensley, K., Shaw, W. & Carney, J.M. 1997, "Aging and caloric restriction affect mitochondrial respiration and lipid membrane status: An electron paramagnetic resonance investigation", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 23, no. 2, pp. 191-201.
- Galkin, A. & Moncada, S. 2007, "S-nitrosation of mitochondrial complex I depends on its structural conformation", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 52, pp. 37448-37453.
- Gaudry, R. 1948, "The synthesis of D,L-alpha amino-epsilon-hydroxycaproic acid and a new synthesis of D,L-lysine", *Canadian Journal of Research*, vol. 26, no. 4 Sect B, pp. 387-392.
- Genova, M.L., Ventura, B., Giuliano, G., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti Castelli, G. & Lenaz, G. 2001, "The site of production of superoxide radical in mitochondrial complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2", *FEBS Letters*, vol. 505, no. 3, pp. 364-368.
- Gerontology Research Group 2010, 06/07/2010-last update, *Supercentenarian Research Foundation*. Available: <http://www.grg.org> [2010, 06/08] .
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P. & Fenn, W.O. 1954, "Oxygen poisoning and x-irradiation: A mechanism in common", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 119, no. 3097, pp. 623-626.
- Gomez, J., Caro, P., Naudi, A., Portero-Otin, M., Pamplona, R. & Barja, G. 2007, "Effect of 8.5% and 25% caloric restriction on mitochondrial free radical production and oxidative stress in rat liver", *Biogerontology*, vol. 8, no. 5, pp. 555-566.

- Gomez, J., Caro, P., Sanchez, I., Naudi, A., Jove, M., Portero-Otin, M., Lopez-Torres, M., Pamplona, R. & Barja, G. 2009, "Effect of methionine dietary supplementation on mitochondrial oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver and heart", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 41, no. 3, pp. 309-321.
- Gomez-Cabrera, M.C., Domenech, E. & Vina, J. 2008, "Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 44, no. 2, pp. 126-131.
- Goth, L. 2000, "Lipid and carbohydrate metabolism in acatalasemia", *Clinical Chemistry*, vol. 46, no. 4, pp. 564-566.
- Gredilla, R. & Barja, G. 2005, "Minireview: The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity", *Endocrinology*, vol. 146, no. 9, pp. 3713-3717.
- Gredilla, R., Barja, G. & Lopez-Torres, M. 2001, "Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 33, no. 4, pp. 279-287.
- Gredilla, R., Sanz, A., Lopez-Torres, M. & Barja, G. 2001, "Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart", *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 9, pp. 1589-1591.
- Grune, T. 2000, "Oxidative stress, aging and the proteasomal system", *Biogerontology*, vol. 1, no. 1, pp. 31-40.
- Guillou, H., Zdravec, D., Martin, P.G. & Jacobsson, A. 2010, "The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice", *Progress in Lipid Research*, vol. 49, no. 2, pp. 186-199.
- Guo, Y.H., Chen, F.Y., Wang, G.S., Chen, L. & Gao, W. 2008, "Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates vascular reverse remodeling of balloon-injured arteries in rat", *Chinese Medical Journal*, vol. 121, no. 22, pp. 2265-2271.

H

- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 2007, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn, Oxford University Press, Oxford etc.
- Hamilton, M.L., Van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A. & Richardson, A. 2001, "Does oxidative damage to DNA increase with age?", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 18, pp. 10469-10474.
- Han, I.B., Kim, O.J., Ahn, J.Y., Oh, D., Hong, S.P., Huh, R., Chung, S.S. & Kim, N.K. 2010, "Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T and 1298A>C) polymorphisms and haplotypes with silent brain infarction and homocysteine levels in a Korean population", *Yonsei Medical Journal*, vol. 51, no. 2, pp. 253-260.
- Hanson, B.J., Carrozzo, R., Piemonte, F., Tessa, A., Robinson, B.H. & Capaldi, R.A. 2001, "Cytochrome c oxidase-deficient patients have distinct subunit assembly profiles", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 19, pp. 16296-16301.
- Harman, D. 1972, "The biologic clock: The mitochondria?", *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 20, no. 4, pp. 145-147.
- Harman, D. 1956, "Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry", *Journal of Gerontology*, vol. 11, no. 3, pp. 298-300.

- Herrero, A. & Barja, G. 2000, "Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 32, no. 6, pp. 609-615.
- Hidiroglou, N., Gilani, G.S., Long, L., Zhao, X., Madere, R., Cockell, K., Belonge, B., Ratnayake, W.M. & Peace, R. 2004, "The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil", *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 15, no. 12, pp. 730-740.
- Hirano, T., Yamaguchi, R., Asami, S., Iwamoto, N. & Kasai, H. 1996, "8-hydroxyguanine levels in nuclear DNA and its repair activity in rat organs associated with age", *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 51, no. 5, pp. B303-7.
- Hock, M.B. & Kralli, A. 2009, "Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function", *Annual Review of Physiology*, vol. 71, pp. 177-203.
- Hoffman, D.L. & Brookes, P.S. 2009, "Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 24, pp. 16236-16245.
- Holman, R.T. 1954, "Autoxidation of Fats and Related Substances" in *Progress in Chemistry of Fats and Other Lipids*, eds. R.T. Holman, W.O. Lundberg & T. Malkin, Pergamon Press, London, pp. 51-98.
- Hooijmans, C.R., Blom, H.J., Oppenraaij-Emmerzaal, D., Ritskes-Hoitinga, M. & Kiliaan, A.J. 2009, "S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine levels in the aging brain of APP/PS1 alzheimer mice", *Neurological Sciences*, vol. 30, no. 5, pp. 439-445.
- Hulbert, A.J. 2005, "On the importance of fatty acid composition of membranes for aging", *Journal of Theoretical Biology*, vol. 234, no. 2, pp. 277-288.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R. & Buttemer, W.A. 2007, "Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals", *Physiological Reviews*, vol. 87, no. 4, pp. 1175-1213.
- Hussain, S.G. & Ramaiah, K.V. 2007, "Reduced eIF2alpha phosphorylation and increased proapoptotic proteins in aging", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 355, no. 2, pp. 365-370.

I

- Ilieva, E.V., Kichev, A., Naudí, A., Ferrer, I., Pamplona, R. & Portero-Otín, M. 2010a, "Mitochondrial dysfunction induces both oxidative and endoplasmic reticulum stress in argyrophilic grain disease.", *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* Submitted.
- Ilieva, E.V., Naudi, A., Kichev, A., Ferrer, I., Pamplona, R. & Portero-Otin, M. 2010b, "Depletion of oxidative and endoplasmic reticulum stress regulators in pick disease", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 48, no. 10, pp. 1302-1310.
- Imai, H. & Nakagawa, Y. 2003, "Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 34, no. 2, pp. 145-169.
- Iwasaki, K., Gleiser, C.A., Masoro, E.J., McMahan, C.A., Seo, E.J. & Yu, B.P. 1988, "Influence of the restriction of individual dietary components on longevity and age-related disease of fischer rats: The fat component and the mineral component", *Journal of Gerontology*, vol. 43, no. 1, pp. B13-21.

J

- Jeon, T.I., Lim, B.O., Yu, B.P., Lim, Y., Jeon, E.J. & Park, D.K. 2001, "Effect of dietary restriction on age-related increase of liver susceptibility to peroxidation in rats", *Lipids*, vol. 36, no. 6, pp. 589-593.
- Jiang, Q., Christen, S., Shigenaga, M.K. & Ames, B.N. 2001, "Gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 74, no. 6, pp. 714-722.
- Jung, C.H. & Thomas, J.A. 1996, "S-glutathiolated hepatocyte proteins and insulin disulfides as substrates for reduction by glutaredoxin, thioredoxin, protein disulfide isomerase, and glutathione", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 335, no. 1, pp. 61-72.

K

- Kehrer, J.P. 2000, "The haber-weiss reaction and mechanisms of toxicity", *Toxicology*, vol. 149, no. 1, pp. 43-50.
- Kelly, D.P. & Scarpulla, R.C. 2004, "Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function", *Genes & Development*, vol. 18, no. 4, pp. 357-368.
- Kelly, T.J., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P. & Puigserver, P. 2009, "GCN5-mediated transcriptional control of the metabolic coactivator PGC-1beta through lysine acetylation", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 30, pp. 19945-19952.
- Khorakova, M., Deil, Z., Khausman, D. & Matsek, K. 1990, "Effect of carbohydrate-enriched diet and subsequent food restriction on life prolongation in fischer 344 male rats", *Fiziologicheskii Zhurnal*, vol. 36, no. 5, pp. 16-21.
- Khrapko, K., Ebralidse, K. & Kraytsberg, Y. 2004, "Where and when do somatic mtDNA mutations occur?", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1019, pp. 240-244.
- Kim, J.D., McCarter, R.J. & Yu, B.P. 1996, "Influence of age, exercise, and dietary restriction on oxidative stress in rats", *Aging (Milan, Italy)*, vol. 8, no. 2, pp. 123-129.
- Klein, J.A. & Ackerman, S.L. 2003, "Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 111, no. 6, pp. 785-793.
- Klein, J.A., Longo-Guess, C.M., Rossmann, M.P., Seburn, K.L., Hurd, R.E., Frankel, W.N., Bronson, R.T. & Ackerman, S.L. 2002, "The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor", *Nature*, vol. 419, no. 6905, pp. 367-374.
- Knecht, K.J., Dunn, J.A., McFarland, K.F., McCance, D.R., Lyons, T.J., Thorpe, S.R. & Baynes, J.W. 1991, "Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine", *Diabetes*, vol. 40, no. 2, pp. 190-196.
- Koizumi, A., Weindruch, R. & Walford, R.L. 1987, "Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice", *The Journal of Nutrition*, vol. 117, no. 2, pp. 361-367.
- Komninou, D., Leutzinger, Y., Reddy, B.S. & Richie, J.P., Jr 2006, "Methionine restriction inhibits colon carcinogenesis", *Nutrition and Cancer*, vol. 54, no. 2, pp. 202-208.
- Koopman, W.J., Nijtmans, L.G., Dieteren, C.E., Roestenberg, P., Valsecchi, F., Smeitink, J.A. & Willems, P.H. 2010, "Mammalian mitochondrial complex I: Biogenesis, regulation and reactive oxygen species generation", *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 12, no. 12, pp. 1431-1470.

- Koppenol, W.H. 2001, "The haber-weiss cycle--70 years later", *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, vol. 6, no. 4, pp. 229-234.
- Koubova, J. & Guarente, L. 2003, "How does calorie restriction work?", *Genes & Development*, vol. 17, no. 3, pp. 313-321.
- Koz, S.T., Gouwy, N.T., Demir, N., Nedzvetsky, V.S., Etem, E. & Baydas, G. 2010, "Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain", *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 28, no. 4, pp. 325-329.
- Krinsky, N.I. 1993, "Micronutrients and their influence on mutagenicity and malignant transformation", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 686, pp. 229-242.
- Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E. & Kunz, W.S. 2004, "Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 6, pp. 4127-4135.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N. & Andreyev, A. 2002, "Complex I-mediated reactive oxygen species generation: Modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state", *The Biochemical Journal*, vol. 368, no. Pt 2, pp. 545-553.
- Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J.L., Yamamoto, M. & Kensler, T.W. 2003, "Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway", *Molecular and Cellular Biology*, vol. 23, no. 23, pp. 8786-8794.

L

- Laganieri, S. & Yu, B.P. 1987, "Anti-lipoperoxidation action of food restriction", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 145, no. 3, pp. 1185-1191.
- Lambert, A.J. & Brand, M.D. 2004a, "Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I)", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 38, pp. 39414-39420.
- Lambert, A.J. & Brand, M.D. 2004b, "Superoxide production by NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane", *The Biochemical Journal*, vol. 382, no. Pt 2, pp. 511-517.
- Lambert, A.J., Portero-Otin, M., Pamplona, R. & Merry, B.J. 2004, "Effect of ageing and caloric restriction on specific markers of protein oxidative damage and membrane peroxidizability in rat liver mitochondria", *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 125, no. 8, pp. 529-538.
- Lane, N. 2003, *Oxygen: The Molecule that made the World*, 1st edn, Oxford University Press, New York.
- Lanza, I.R. & Nair, K.S. 2010, "Mitochondrial function as a determinant of life span", *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, vol. 459, no. 2, pp. 277-289.
- Latorre, A., Moya, A. & Ayala, F.J. 1986, "Evolution of mitochondrial DNA in drosophila subobscura", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, no. 22, pp. 8649-8653.
- Lee, C.K., Allison, D.B., Brand, J., Weindruch, R. & Prolla, T.A. 2002, "Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 23, pp. 14988-14993.
- Lee, E.S., Chen, H., Hardman, C., Simm, A. & Charlton, C. 2008, "Excessive S-adenosyl-L-methionine-dependent methylation increases levels of methanol, formaldehyde and formic acid in rat brain striatal homogenates: Possible role in S-adenosyl-L-methionine-induced parkinson's disease-like disorders", *Life Sciences*, vol. 83, no. 25-26, pp. 821-827.

- Lee, J., Yu, B.P. & Herlihy, J.T. 1999, "Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 26, no. 3-4, pp. 260-265.
- Lee, S.S., Lee, R.Y., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J. & Ruvkun, G. 2003, "A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity", *Nature Genetics*, vol. 33, no. 1, pp. 40-48.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M. 2005, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th edn, WH Freeman, US.
- Lerin, C., Rodgers, J.T., Kalume, D.E., Kim, S.H., Pandey, A. & Puigserver, P. 2006, "GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha", *Cell Metabolism*, vol. 3, no. 6, pp. 429-438.
- Lezza, A.M., Pesce, V., Cormio, A., Fracasso, F., Vecchiet, J., Felzani, G., Cantatore, P. & Gadaleta, M.N. 2001, "Increased expression of mitochondrial transcription factor A and nuclear respiratory factor-1 in skeletal muscle from aged human subjects", *FEBS Letters*, vol. 501, no. 1, pp. 74-78.
- Li, M.H., Jang, J.H., Na, H.K., Cha, Y.N. & Surh, Y.J. 2007, "Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 in response to nitrosative stress induces expression of glutamate-cysteine ligase in PC12 cells via activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Nrf2 signaling", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 39, pp. 28577-28586.
- Lipton, S.A. & Bossy-Wetzell, E. 2002, "Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity", *Cell*, vol. 111, no. 2, pp. 147-150.
- Liu, Y., Fiskum, G. & Schubert, D. 2002, "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain", *Journal of Neurochemistry*, vol. 80, no. 5, pp. 780-787.
- Loeffler, M., Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Metivier, D., Nieminen, A.L., Brothers, G., Penninger, J.M. & Kroemer, G. 2001, "Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor", *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 3, pp. 758-767.
- Lopez-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhu, M., Jamieson, H., Hilmer, S., Cascajo, M.V., Allard, J., Ingram, D.K., Navas, P. & de Cabo, R. 2006, "Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 6, pp. 1768-1773.
- Lopez-Lluch, G., Irusta, P.M., Navas, P. & de Cabo, R. 2008, "Mitochondrial biogenesis and healthy aging", *Experimental Gerontology*, vol. 43, no. 9, pp. 813-819.
- Lopez-Torres, M., Gredilla, R., Sanz, A. & Barja, G. 2002, "Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 32, no. 9, pp. 882-889.
- Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Rojas, C., Cadenas, S. & Barja, G. 1993, "Simultaneous induction of sod, glutathione reductase, GSH, and ascorbate in liver and kidney correlates with survival during aging", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 15, no. 2, pp. 133-142.
- Lynch, S.M. & Strain, J.J. 1989, "Increased hepatic lipid peroxidation with methionine toxicity in the rat", *Free Radical Research Communications*, vol. 5, no. 4-5, pp. 221-226.

M

- Ma, Y. & Hendershot, L.M. 2004, "ER chaperone functions during normal and stress conditions", *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 28, no. 1-2, pp. 51-65.
- Mair, W., Goymer, P., Pletcher, S.D. & Partridge, L. 2003, "Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 301, no. 5640, pp. 1731-1733.

- Mair, W., Piper, M.D. & Partridge, L. 2005, "Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in drosophila", *PLoS Biology*, vol. 3, no. 7, pp. e223.
- Malhotra, J.D. & Kaufman, R.J. 2007, "Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword?", *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 9, no. 12, pp. 2277-2293.
- Malloy, V.L., Krajcik, R.A., Bailey, S.J., Hristopoulos, G., Plummer, J.D. & Orentreich, N. 2006, "Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male fischer 344 rats independent of energy restriction", *Aging Cell*, vol. 5, no. 4, pp. 305-314.
- Mandl, J., Szarka, A. & Banhegyi, G. 2009, "Vitamin C: Update on physiology and pharmacology", *British Journal of Pharmacology*, vol. 157, no. 7, pp. 1097-1110.
- Marnett, L.J. 2002, "Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage", *Toxicology*, vol. 181-182, pp. 219-222.
- Matthias, D., Becker, C.H., Riezler, R. & Kindling, P.H. 1996, "Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine", *Atherosclerosis*, vol. 122, no. 2, pp. 201-216.
- Mattson, M.P. & Magnus, T. 2006, "Ageing and neuronal vulnerability", *Nature Reviews.Neuroscience*, vol. 7, no. 4, pp. 278-294.
- McCarty, M.F. 2003, "A low-fat, whole-food vegan diet, as well as other strategies that down-regulate IGF-I activity, may slow the human aging process", *Medical Hypotheses*, vol. 60, no. 6, pp. 784-792.
- McCarty, M.F., Barroso-Aranda, J. & Contreras, F. 2009, "The low-methionine content of vegan diets may make methionine restriction feasible as a life extension strategy", *Medical Hypotheses*, vol. 72, no. 2, pp. 125-128.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. 1969, "Superoxide dismutase. an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein)", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 244, no. 22, pp. 6049-6055.
- Mecocci, P., MacGarvey, U., Kaufman, A.E., Koontz, D., Shoffner, J.M., Wallace, D.C. & Beal, M.F. 1993, "Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain", *Annals of Neurology*, vol. 34, no. 4, pp. 609-616.
- Medvedev, Z.A. 1990, "An attempt at a rational classification of theories of ageing", *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, vol. 65, no. 3, pp. 375-398.
- Meister, A. 1994, "Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 13, pp. 9397-9400.
- Melendez-Hevia, E., Montero-Gomez, N. & Montero, F. 2008, "From prebiotic chemistry to cellular metabolism--the chemical evolution of metabolism before darwinian natural selection", *Journal of Theoretical Biology*, vol. 252, no. 3, pp. 505-519.
- Melov, S., Hinerfeld, D., Esposito, L. & Wallace, D.C. 1997, "Multi-organ characterization of mitochondrial genomic rearrangements in ad libitum and caloric restricted mice show striking somatic mitochondrial DNA rearrangements with age", *Nucleic Acids Research*, vol. 25, no. 5, pp. 974-982.
- Meyer, T.E., Kovacs, S.J., Ehsani, A.A., Klein, S., Holloszy, J.O. & Fontana, L. 2006, "Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 47, no. 2, pp. 398-402.
- Miller, R.A., Buehner, G., Chang, Y., Harper, J.M., Sigler, R. & Smith-Wheelock, M. 2005, "Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance", *Aging Cell*, vol. 4, no. 3, pp. 119-125.

- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J. & Johnson, J.E., Jr 1980, "Mitochondrial role in cell aging", *Experimental Gerontology*, vol. 15, no. 6, pp. 575-591.
- Miramar, M.D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L.M., Haouzi, D., Brothers, G., Penninger, J.M., Peleato, M.L., Kroemer, G. & Susin, S.A. 2001, "NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 19, pp. 16391-16398.
- Miwa, S., Lawless, C. & von Zglinicki, T. 2008, "Mitochondrial turnover in liver is fast in vivo and is accelerated by dietary restriction: Application of a simple dynamic model", *Aging Cell*, vol. 7, no. 6, pp. 920-923.
- Monnier, V.M. 2003, "Intervention against the maillard reaction in vivo", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 419, no. 1, pp. 1-15.
- Monnier, V.M., Sell, D.R., Nagaraj, R.H. & Miyata, S. 1991, "Mechanisms of protection against damage mediated by the maillard reaction in aging", *Gerontology*, vol. 37, no. 1-3, pp. 152-165.
- Moosmann, B. & Behl, C. 2008, "Mitochondrially encoded cysteine predicts animal lifespan", *Aging Cell*, vol. 7, no. 1, pp. 32-46.
- Mori, N. & Hirayama, K. 2000, "Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver", *The Journal of Nutrition*, vol. 130, no. 9, pp. 2349-2355.
- Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W.M., Requena, J., Berlett, B.S. & Stadtman, E.R. 2001, "Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 23, pp. 12920-12925.
- Muller, F.L., Mele, J., Remmen, V.V. & Richardson, A. 2003, "Proving the in Vivo Relevance of Oxidative Stress in Aging using Knockout and Transgenic Mice" in *Aging at the Molecular Level*, ed. T. von Zglinicki, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht etc., pp. 131.
- Murtagh-Mark, C., Reiser, K., Harris, R. & McDonald, R. 1995, "Source of dietary carbohydrate affects life span of fischer 344 rats independent of caloric restrict", *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, vol. 50, no. 3, pp. B148-54.

N

- Naidoo, N. 2009, "ER and aging-protein folding and the ER stress response", *Ageing Research Reviews*, vol. 8, no. 3, pp. 150-159.
- Naidoo, N., Ferber, M., Master, M., Zhu, Y. & Pack, A.I. 2008, "Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling", *The Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 26, pp. 6539-6548.
- Naudí, A., Caro, P., Jove, M., Gomez, J., Boada, J., Ayala, V., Portero-Otin, M., Barja, G. & Pamplona, R. 2007a, "Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain", *Rejuvenation Research*, vol. 10, no. 4, pp. 473-484.
- Naudí, A., Jove, M., Ayala, V., Portero-Otin, M. & Pamplona, R. 2010, "Glycation of mitochondrial proteins, oxidative stress and aging.", *Revista Espanola De Geriatria y Gerontologia*, vol. 45, no. 3, pp. 156-166.
- Naudí, A., Jové, M., Cacabelos, D., Ilieva, E., Boada, J., Ayala, V., Portero-Otin, M. & Pamplona, R. 2007b, "The biological basis of the aging process", vol. 3, no. 4, pp. 489-499.

Naudí, A., Jové, M., Ilieva, E., Cacabelos, D., Gonzalo, H., Serrano, J., Boada, J., Ayala, M.V., Portero-Otín, M. & Pamplona, R. 2009, "Oxidación De Macromoléculas, Envejecimiento y Longevidad" in *Biogerontología Médica*, eds. J. Sastre, R. Pamplona & J.R. Ramón, 1a edn, Sociedad Española de Geriátria y Gerontología, Madrid, pp. 43-69.

Nemoto, S., Fergusson, M.M. & Finkel, T. 2005, "SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α ", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 16, pp. 16456-16460.

Ninomiya, T., Kiyohara, Y., Kubo, M., Tanizaki, Y., Tanaka, K., Okubo, K., Nakamura, H., Hata, J., Oishi, Y., Kato, I., Hirakata, H. & Iida, M. 2004, "Hyperhomocysteinemia and the development of chronic kidney disease in a general population: The hisayama study", *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 44, no. 3, pp. 437-445.

Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Falcone, S., Valerio, A., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S. & Carruba, M.O. 2005, "Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 310, no. 5746, pp. 314-317.

Nuss, J.E., Choksi, K.B., DeFord, J.H. & Papaconstantinou, J. 2008, "Decreased enzyme activities of chaperones PDI and BiP in aged mouse livers", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 365, no. 2, pp. 355-361.

O

Obeid, R. & Herrmann, W. 2006, "Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia", *FEBS Letters*, vol. 580, no. 13, pp. 2994-3005.

Ohnishi, T. & Salerno, J.C. 2005, "Conformation-driven and semiquinone-gated proton-pump mechanism in the NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I)", *FEBS Letters*, vol. 579, no. 21, pp. 4555-4561.

Okado-Matsumoto, A. & Fridovich, I. 2001, "Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 42, pp. 38388-38393.

Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S. & Stadtman, E.R. 1987, "Age-related changes in oxidized proteins", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, no. 12, pp. 5488-5491.

Orentreich, N., Matias, J.R., DeFelice, A. & Zimmerman, J.A. 1993, "Low methionine ingestion by rats extends life span", *The Journal of Nutrition*, vol. 123, no. 2, pp. 269-274.

Ozawa, T. 1999, "Mitochondrial genome mutation in cell death and aging", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 31, no. 4, pp. 377-390.

P

Pamplona, R. 2009, "El Mito De Las Dietas y Fármacos Milagrosos" in , eds. A. Martínez, L. Gil, P. Serrano & J. Ramos, Ministerio de Sanidad y Política Social, Manuales y Guías Serie Personas Mayores. Instituto de Migraciones y Servicios Sociales, Madrid, España, pp. 55-90.

Pamplona, R. & Barja, G. 2010, "Oxidative Stress Resistance and Longevity" in *Longevity, Mitochondria and Oxygen Free Radicals*, eds. m. Pa R. & G. Barja, Research Signpost, Kerala, India.

Pamplona, R. & Barja, G. 2003, "Aging Rate, Free Radical Production, and Constitutive Sensitivity to Lipid Peroxidation: Insights from Comparative Studies." in *Biology of Aging and its Modulation. Aging at the Molecular Level*, ed. T. Von Sglinicki, The Kluwer Academic Publisher, New York, pp. 47-64.

Pamplona, R. & Constantini, D. 2010, "Variation in molecular and structural antioxidant defences against oxidative stress in animals.", *Functional Ecology*, In press.

- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Sanz, A., Ayala, V., Vasileva, E. & Barja, G. 2006, "Protein and lipid oxidative damage and complex I content are lower in the brain of budgerigards and canaries than in mice. relation to aging rate.", *AGE*, vol. 27, no. Volume 27, Number 4 / December, 2005, pp. 267.
- Pamplona, R. 2008, "Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity", *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1777, no. 10, pp. 1249-1262.
- Pamplona, R. & Barja, G. 2007, "Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: Two key traits of longevity", *Ageing Research Reviews*, vol. 6, no. 3, pp. 189-210.
- Pamplona, R. & Barja, G. 2006, "Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: The protein and methionine connection", *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1757, no. 5-6, pp. 496-508.
- Pamplona, R., Barja, G. & Portero-Otin, M. 2002, "Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: A homeoviscous-longevity adaptation?", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 959, pp. 475-490.
- Pamplona, R., Ilieva, E., Ayala, V., Bellmunt, M.J., Cacabelos, D., Dalfo, E., Ferrer, I. & Portero-Otin, M. 2008, "Maillard reaction versus other nonenzymatic modifications in neurodegenerative processes", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1126, pp. 315-319.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Bellmun, M.J., Gredilla, R. & Barja, G. 2002a, "Aging increases nepsilon-(carboxymethyl)lysine and caloric restriction decreases nepsilon-(carboxyethyl)lysine and nepsilon-(malondialdehyde)lysine in rat heart mitochondrial proteins", *Free Radical Research*, vol. 36, no. 1, pp. 47-54.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Requena, J., Gredilla, R. & Barja, G. 2002b, "Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls", *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 123, no. 11, pp. 1437-1446.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V. & Ruggiero, F.M. 2010, "Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 48, no. 10, pp. 1286-1295.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A. & Ruggiero, F.M. 2004, "Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: Involvement of reactive oxygen species and cardiolipin", *Circulation Research*, vol. 94, no. 1, pp. 53-59.
- Park, C.M., Cho, C.W., Rosenfeld, M.E. & Song, Y.S. 2008, "Methionine supplementation accelerates oxidative stress and nuclear factor kappaB activation in livers of C57BL/6 mice", *Journal of Medicinal Food*, vol. 11, no. 4, pp. 667-674.
- Pavillard, V., Nicolaou, A., Double, J.A. & Phillips, R.M. 2006, "Methionine dependence of tumours: A biochemical strategy for optimizing paclitaxel chemosensitivity in vitro", *Biochemical Pharmacology*, vol. 71, no. 6, pp. 772-778.
- Paz Gavilan, M., Vela, J., Castano, A., Ramos, B., del Rio, J.C., Vitorica, J. & Ruano, D. 2006, "Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus", *Neurobiology of Aging*, vol. 27, no. 7, pp. 973-982.
- Pearl, R. 1928, *The Rate of Living*, University of London Press, London.
- Perrone, C.E., Mattocks, D.A., Jarvis-Morar, M., Plummer, J.D. & Orentreich, N. 2010, "Methionine restriction effects on mitochondrial biogenesis and aerobic capacity in white adipose tissue, liver, and skeletal muscle of F344 rats", *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 59, no. 7, pp. 1000-1011.

- Pesce, V., Cormio, A., Fracasso, F., Vecchiet, J., Felzani, G., Lezza, A.M., Cantatore, P. & Gadaleta, M.N. 2001, "Age-related mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in human skeletal muscle", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 30, no. 11, pp. 1223-1233.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Di Venosa, N. & Paradies, G. 2003, "Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: Role of reactive oxygen species and cardiolipin", *The FASEB Journal*, vol. 17, no. 6, pp. 714-716.
- Petzke, K.J., Proll, J., Bruckner, J. & Metges, C.C. 1999, "Plasma protein carbonyl concentration is not enhanced by chronic intake of high-protein diets in adult rats", *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 10, no. 5, pp. 268-273.
- Piantadosi, C.A., Carraway, M.S., Babiker, A. & Suliman, H.B. 2008, "Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1", *Circulation Research*, vol. 103, no. 11, pp. 1232-1240.
- Piruat, J.I. & Lopez-Barneo, J. 2005, "Oxygen tension regulates mitochondrial DNA-encoded complex I gene expression", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 52, pp. 42676-42684.
- Porter, A.G. & Urbano, A.G. 2006, "Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells?", *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, vol. 28, no. 8, pp. 834-843.
- Portero-Otín, M. & Pamplona, R. 2006, "Is Endogenous Oxidative Protein Damage Involved in the Aging Process?" in *Protein Oxidation and Disease*, ed. J. Pietzsch, Recent Research Developments in Pathological Biochemistry edn, Research Signpost, Kerala, India, pp. 91-142.
- Portero-Otín, M., Requena, J.R., Bellmunt, M.J., Ayala, V. & Pamplona, R. 2004, "Protein nonenzymatic modifications and proteasome activity in skeletal muscle from the short-lived rat and long-lived pigeon", *Experimental Gerontology*, vol. 39, no. 10, pp. 1527-1535.
- Puig Muset, P. 1976, *Oxígeno(s) :Confrontaciones Baconianas Sobre Unos Datos Del Pasado, Del Presente y Del Futuro*, Oikos-tau, Vilassar de Mar.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M. & Spiegelman, B.M. 1998, "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis", *Cell*, vol. 92, no. 6, pp. 829-839.

Q

- Qin, W., Chachich, M., Lane, M., Roth, G., Bryant, M., de Cabo, R., Ottinger, M.A., Mattison, J., Ingram, D., Gandy, S. & Pasinetti, G.M. 2006, "Calorie restriction attenuates alzheimer's disease type brain amyloidosis in squirrel monkeys (*saimiri sciureus*)", *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, vol. 10, no. 4, pp. 417-422.

R

- Rabek, J.P., Boylston, W.H., 3rd & Papaconstantinou, J. 2003, "Carbonylation of ER chaperone proteins in aged mouse liver", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 305, no. 3, pp. 566-572.
- Ramsey, J.J., Hagopian, K., Kenny, T.M., Koomson, E.K., Bevilacqua, L., Weindruch, R. & Harper, M.E. 2004, "Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats", *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol. 286, no. 1, pp. E31-40.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H. & Fahey, G.C., Jr 1993, "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet", *The Journal of Nutrition*, vol. 123, no. 11, pp. 1939-1951.

- Regina, M., Korhonen, V.P., Smith, T.K., Alakuijala, L. & Eloranta, T.O. 1993, "Methionine toxicity in the rat in relation to hepatic accumulation of S-adenosylmethionine: Prevention by dietary stimulation of the hepatic transsulfuration pathway", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 300, no. 2, pp. 598-607.
- Requena, J.R., Ahmed, M.U., Fountain, C.W., Degenhardt, T.P., Reddy, S., Perez, C., Lyons, T.J., Jenkins, A.J., Baynes, J.W. & Thorpe, S.R. 1997, "Carboxymethylethanolamine, a biomarker of phospholipid modification during the maillard reaction in vivo", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 28, pp. 17473-17479.
- Requena, J.R., Chao, C.C., Levine, R.L. & Stadtman, E.R. 2001, "Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 1, pp. 69-74.
- Reverter-Branchat, G., Cabiscol, E., Tamarit, J. & Ros, J. 2004, "Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: Common targets and prevention by calorie restriction", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 30, pp. 31983-31989.
- Richie, J.P., Jr, Komninou, D., Leutzinger, Y., Kleinman, W., Orentreich, N., Malloy, V. & Zimmerman, J.A. 2004, "Tissue glutathione and cysteine levels in methionine-restricted rats", *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, vol. 20, no. 9, pp. 800-805.
- Richie, J.P., Jr, Leutzinger, Y., Parthasarathy, S., Malloy, V., Orentreich, N. & Zimmerman, J.A. 1994, "Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats", *The FASEB Journal*, vol. 8, no. 15, pp. 1302-1307.
- Robin, S., Maupoil, V., Laurant, P., Jacqueson, A. & Berthelot, A. 2004, "Effect of a methionine-supplemented diet on the blood pressure of sprague-dawley and deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats", *The British Journal of Nutrition*, vol. 91, no. 6, pp. 857-865.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Gerhart-Hines, Z. & Puigserver, P. 2008, "Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways", *FEBS Letters*, vol. 582, no. 1, pp. 46-53.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M. & Puigserver, P. 2005, "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1", *Nature*, vol. 434, no. 7029, pp. 113-118.
- Rogina, B. & Helfand, S.L. 2004, "Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 45, pp. 15998-16003.
- Ross, M.H. 1976, "Nutrition and longevity in experimental animals", *Current Concepts in Nutrition*, vol. 4, pp. 43-57.
- Ruiz, M.C., Ayala, V., Portero-Otin, M., Requena, J.R., Barja, G. & Pamplona, R. 2005, "Protein methionine content and MDA-lysine adducts are inversely related to maximum life span in the heart of mammals", *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 126, no. 10, pp. 1106-1114.
- Rushmore, T.H. & Pickett, C.B. 1990, "Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase ya subunit gene. characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 24, pp. 14648-14653.

S

- Samuels, D.C. 2005, "Life span is related to the free energy of mitochondrial DNA", *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 126, no. 10, pp. 1123-1129.
- Sanz, A., Gustavo, G., Pamplona, R. & Leeuwenburgh, C. 2009, "Free Radicals and Mammalian Aging" in , eds. C. Jacob & P. Winyard, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Germany, pp. 433-472.

- Sanz, A., Caro, P., Ayala, V., Portero-Otin, M., Pamplona, R. & Barja, G. 2006, "Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins", *The FASEB Journal*, vol. 20, no. 8, pp. 1064-1073.
- Sanz, A., Caro, P. & Barja, G. 2004, "Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 36, no. 6, pp. 545-552.
- Sanz, A., Caro, P., Sanchez, J.G. & Barja, G. 2006a, "Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1067, pp. 200-209.
- Sanz, A., Gomez, J., Caro, P. & Barja, G. 2006b, "Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 38, no. 5-6, pp. 327-333.
- Sanz, A., Pamplona, R. & Barja, G. 2006, "Is the mitochondrial free radical theory of aging intact?", *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 8, no. 3-4, pp. 582-599.
- Sawada, M. & Carlson, J.C. 1987, "Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat", *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 41, no. 1-2, pp. 125-137.
- Sawada, M., Sester, U. & Carlson, J.C. 1992, "Superoxide radical formation and associated biochemical alterations in the plasma membrane of brain, heart, and liver during the lifetime of the rat", *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 48, no. 3, pp. 296-304.
- Scarpulla, R.C. 2008, "Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function", *Physiological Reviews*, vol. 88, no. 2, pp. 611-638.
- Schafer, F.Q. & Buettner, G.R. 2001, "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 30, no. 11, pp. 1191-1212.
- Scheffler, I.E. 1999, *Mitochondria*, Wiley-Liss, New York etc.
- Scrofano, M.M., Shang, F., Nowell, T.R., Jr, Gong, X., Smith, D.E., Kelliher, M., Dunning, J., Mura, C.V. & Taylor, A. 1998, "Calorie restriction, stress and the ubiquitin-dependent pathway in mouse livers", *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 105, no. 3, pp. 273-290.
- Selhub, J. 1999, "Homocysteine metabolism", *Annual Review of Nutrition*, vol. 19, pp. 217-246.
- Sell, D.R., Lane, M.A., Johnson, W.A., Masoro, E.J., Mock, O.B., Reiser, K.M., Fogarty, J.F., Cutler, R.G., Ingram, D.K., Roth, G.S. & Monnier, V.M. 1996, "Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 1, pp. 485-490.
- Seneviratne, C.K., Li, T., Khaper, N. & Singal, P.K. 1999, "Effects of methionine on endogenous antioxidants in the heart", *The American Journal of Physiology*, vol. 277, no. 6 Pt 2, pp. H2124-8.
- Shimokawa, I., Higami, Y., Yu, B.P., Masoro, E.J. & Ikeda, T. 1996, "Influence of dietary components on occurrence of and mortality due to neoplasms in male F344 rats", *Ageing (Milan, Italy)*, vol. 8, no. 4, pp. 254-262.
- Sies, H. 1999, "Glutathione and its role in cellular functions", *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 27, no. 9-10, pp. 916-921.

- Sohal, R.S., Agarwal, S., Candas, M., Forster, M.J. & Lal, H. 1994, "Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice", *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 76, no. 2-3, pp. 215-224.
- Spiteller, G. 2001, "Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases", *Experimental Gerontology*, vol. 36, no. 9, pp. 1425-1457.
- Stadtman, E.R. & Levine, R.L. 2003, "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins", *Amino Acids*, vol. 25, no. 3-4, pp. 207-218.
- Stadtman, E.R., Moskovitz, J. & Levine, R.L. 2003, "Oxidation of methionine residues of proteins: Biological consequences", *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 5, no. 5, pp. 577-582.
- Stadtman, E.R., Van Remmen, H., Richardson, A., Wehr, N.B. & Levine, R.L. 2005, "Methionine oxidation and aging", *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1703, no. 2, pp. 135-140.
- Stefanello, F.M., Chiarani, F., Kurek, A.G., Wannmacher, C.M., Wajner, M. & Wyse, A.T. 2005, "Methionine alters Na⁺,K⁺-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus", *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 23, no. 7, pp. 651-656.
- Stipanuk, M.H. 2004, "Sulfur amino acid metabolism: Pathways for production and removal of homocysteine and cysteine", *Annual Review of Nutrition*, vol. 24, pp. 539-577.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J. & Brand, M.D. 2002, "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 47, pp. 44784-44790.
- Strehler, B.L. 1962, "Time, Cells and Aging" in *Time, Cells and Aging*, 1st edn, Academic Press, New York, pp. 456.
- Stubbs, A.K., Wheelhouse, N.M., Lomax, M.A. & Hazlerigg, D.G. 2002, "Nutrient-hormone interaction in the ovine liver: Methionine supply selectively modulates growth hormone-induced IGF-I gene expression", *The Journal of Endocrinology*, vol. 174, no. 2, pp. 335-341.
- Sugioka, K., Nakano, M., Totsune-Nakano, H., Minakami, H., Tero-Kubota, S. & Ikegami, Y. 1988, "Mechanism of O₂⁻ generation in reduction and oxidation cycle of ubiquinones in a model of mitochondrial electron transport systems", *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 936, no. 3, pp. 377-385.
- Swallow, D.L. & Abraham, E.P. 1959, "The amide and carboxyl groups of bacitracin A", *The Biochemical Journal*, vol. 72, no. 2, pp. 326-332.

T

- Tamburini, I., Quartacci, M.F., Izzo, R. & Bergamini, E. 2004, "Effects of dietary restriction on age-related changes in the phospholipid fatty acid composition of various rat tissues", *Ageing Clinical and Experimental Research*, vol. 16, no. 6, pp. 425-431.
- Taylor, E.R., Hurrell, F., Shannon, R.J., Lin, T.K., Hirst, J. & Murphy, M.P. 2003, "Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 22, pp. 19603-19610.
- Thorpe, S.R. & Baynes, J.W. 2003, "Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives", *Amino Acids*, vol. 25, no. 3-4, pp. 275-281.
- Toborek, M., Kopiczna-Grzebieniak, E., Drozd, M. & Wieczorek, M. 1996, "Increased lipid peroxidation and antioxidant activity in methionine-induced hepatitis in rabbits", *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, vol. 12, no. 7-8, pp. 534-537.

Toborek, M., Kopieczna-Grzebieniak, E., Drozd, M. & Wieczorek, M. 1995, "Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits", *Atherosclerosis*, vol. 115, no. 2, pp. 217-224.

Troen, A.M., Lutgens, E., Smith, D.E., Rosenberg, I.H. & Selhub, J. 2003, "The atherogenic effect of excess methionine intake", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 25, pp. 15089-15094.

Trumpower, B.L. 1990, "The protonmotive Q cycle. energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 20, pp. 11409-11412.

V

Vahsen, N., Cande, C., Briere, J.J., Benit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P.G., Pequignot, M.O., Casares, N., Lazar, V., Feraud, O., Debili, N., Wissing, S., Engelhardt, S., Madeo, F., Piacentini, M., Penninger, J.M., Schagger, H., Rustin, P. & Kroemer, G. 2004, "AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation", *The EMBO Journal*, vol. 23, no. 23, pp. 4679-4689.

Valle, A., Guevara, R., Garcia-Palmer, F.J., Roca, P. & Oliver, J. 2008a, "Caloric restriction retards the age-related decline in mitochondrial function of brown adipose tissue", *Rejuvenation Research*, vol. 11, no. 3, pp. 597-604.

Valle, A., Silvestri, E., Moreno, M., Chambery, A., Oliver, J., Roca, P. & Goglia, F. 2008b, "Combined effect of gender and caloric restriction on liver proteomic expression profile", *Journal of Proteome Research*, vol. 7, no. 7, pp. 2872-2881.

Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Reinberg, D. 2004, "Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin", *Molecular Cell*, vol. 16, no. 1, pp. 93-105.

Velez-Carrasco, W., Merkel, M., Twiss, C.O. & Smith, J.D. 2008, "Dietary methionine effects on plasma homocysteine and HDL metabolism in mice", *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 19, no. 6, pp. 362-370.

Verhoef, P., van Vliet, T., Olthof, M.R. & Katan, M.B. 2005, "A high-protein diet increases postprandial but not fasting plasma total homocysteine concentrations: A dietary controlled, crossover trial in healthy volunteers", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 82, no. 3, pp. 553-558.

Verzijl, N., DeGroot, J., Oldehinkel, E., Bank, R.A., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., Bayliss, M.T., Bijlsma, J.W., Lafeber, F.P. & Tekoppele, J.M. 2000, "Age-related accumulation of maillard reaction products in human articular cartilage collagen", *The Biochemical Journal*, vol. 350 Pt 2, pp. 381-387.

Vijg, J. 1999, "Profiling aging by gene arrays", *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 112, no. 1, pp. 1-4.

Vina, J., Gomez-Cabrera, M.C., Borrás, C., Froio, T., Sanchis-Gomar, F., Martinez-Bello, V.E. & Pallardo, F.V. 2009, "Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no. 14, pp. 1369-1374.

W

Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W. & Talalay, P. 2004, "Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 7, pp. 2040-2045.

- Wang, W., Kramer, P.M., Yang, S., Pereira, M.A. & Tao, L. 2001, "Reversed-phase high-performance liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in mouse liver and the effect of methionine on their concentrations", *Journal of Chromatography.B, Biomedical Sciences and Applications*, vol. 762, no. 1, pp. 59-65.
- Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L. & Humphery-Smith, I. 1995, "Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*", *Electrophoresis*, vol. 16, no. 7, pp. 1090-1094.
- Waterland, R.A. 2006, "Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation", *The Journal of Nutrition*, vol. 136, no. 6 Suppl, pp. 1706S-1710S.
- Wells-Knecht, M.C., Lyons, T.J., McCance, D.R., Thorpe, S.R. & Baynes, J.W. 1997, "Age-dependent increase in ortho-tyrosine and methionine sulfoxide in human skin collagen is not accelerated in diabetes. evidence against a generalized increase in oxidative stress in diabetes", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 100, no. 4, pp. 839-846.
- Wenz, T. 2009, "PGC-1alpha activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease", *IUBMB Life*, vol. 61, no. 11, pp. 1051-1062.
- Werstuck, G.H., Lentz, S.R., Dayal, S., Hossain, G.S., Sood, S.K., Shi, Y.Y., Zhou, J., Maeda, N., Krisans, S.K., Malinow, M.R. & Austin, R.C. 2001, "Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 107, no. 10, pp. 1263-1273.
- Westermeier, R., Naven, T. & Höpker, H.R. 2008, *Proteomics in Practice*, Second, Completely Revised Edition edn, Wiley-VCH Verlag GmbH & co. KGaA, Germany.
- Y**
- Young, S.N. & Shalchi, M. 2005, "The effect of methionine and S-adenosylmethionine on S-adenosylmethionine levels in the rat brain", *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, vol. 30, no. 1, pp. 44-48.
- Young, T.A., Cunningham, C.C. & Bailey, S.M. 2002, "Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: Studies using myxothiazol", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 405, no. 1, pp. 65-72.
- Young, V.R. & Borgonha, S. 2000, "Nitrogen and amino acid requirements: : The massachusetts institute of technology amino acid requirement pattern", *The Journal of Nutrition*, vol. 130, no. 7, pp. 1841S-9S.
- Youngman, L.D., Park, J.Y. & Ames, B.N. 1992, "Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 19, pp. 9112-9116.
- Yu, B.P. 2005, "Membrane alteration as a basis of aging and the protective effects of calorie restriction", *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 126, no. 9, pp. 1003-1010.
- Yu, B.P., Suescun, E.A. & Yang, S.Y. 1992, "Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: Modulation by dietary restriction", *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 65, no. 1, pp. 17-33.
- Yu, W., Gubkina, O., Mechawar, N., Elwell, D., Quirion, R. & Krantic, S. 2009, "Expression of apoptosis-inducing factor (AIF) in the aged rat brain", *Neurobiology of Aging*, DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.01.010.

Z

Zainal, T.A., Oberley, T.D., Allison, D.B., Szweda, L.I. & Weindruch, R. 2000, "Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle", *The FASEB Journal*, vol. 14, no. 12, pp. 1825-1836.

Zhang, D., Liang, X., He, X.Y., Alipui, O.D., Yang, S.Y. & Schulz, H. 2001, "Delta 3,5,delta 2,4-dienoyl-CoA isomerase is a multifunctional isomerase. A structural and mechanistic study", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 17, pp. 13622-13627.

Zimmerman, J.A., Malloy, V., Krajcik, R. & Orentreich, N. 2003, "Nutritional control of aging", *Experimental Gerontology*, vol. 38, no. 1-2, pp. 47-52.

ANNEX I

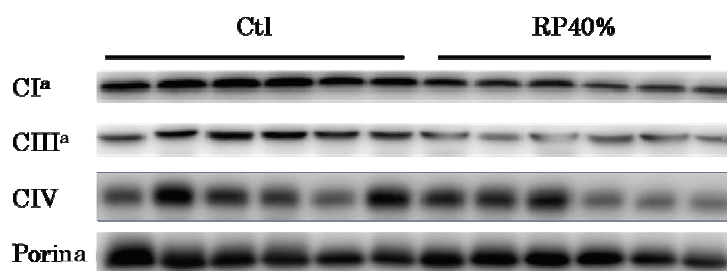


Figura S1 Imatges representatives de les immunotransferències en fetge de l'experiment de restricció proteica al 40%.

CI^a : subunitats NDUFA9 del complex I; CIII^a: subunitat *Core 2* del complex III; CIV: subunitat COX I del complex IV. S'ha realitzat un control de càrrega per cada anticòs (anti-Porina), se'n mostra una imatge representativa.

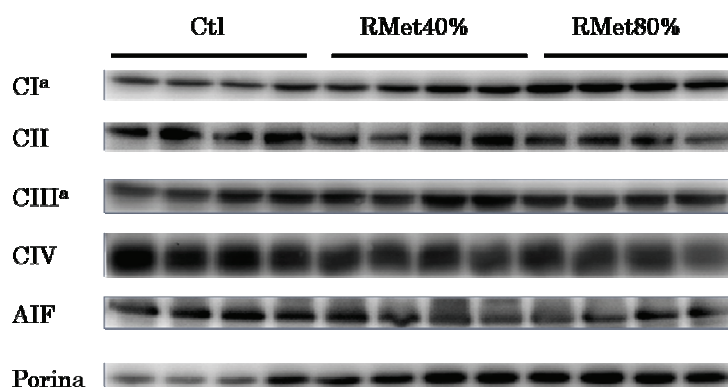


Figura S2 Imatges representatives de les immunotransferències en fetge de l'experiment de restricció de metionina al 40% i 80%.

CI^a : subunitats NDUFA9 del complex I; CII: subunitat Flavoproteïna del complex II; CIII^a: subunitat *Core 2* del complex III; CIV: subunitat COX I del complex IV. S'ha realitzat un control de càrrega per cada anticòs (anti-Porina), se'n mostra una imatge representativa.

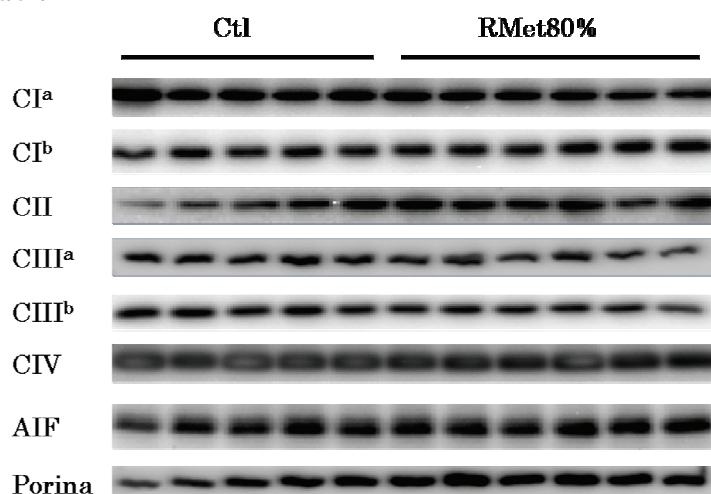


Figura S3 Imatges representatives de les immunotransferències en cervell de l'experiment de restricció de metionina al 80%.

CI^a i CI^b : subunitats NDUFA9 i NDUFS3 del complex I; CII: subunitat Flavoproteïna del complex II; CIII^a i CIII^b: subunitat *Core 2* i *Rieske Iron-Sulfur* del complex III; CIV: subunitat COX I del complex IV; AIF: Apoptosis inducing-factor S'ha realitzat un control de càrrega per cada anticòs (anti-Porina), se'n mostra una imatge representativa.

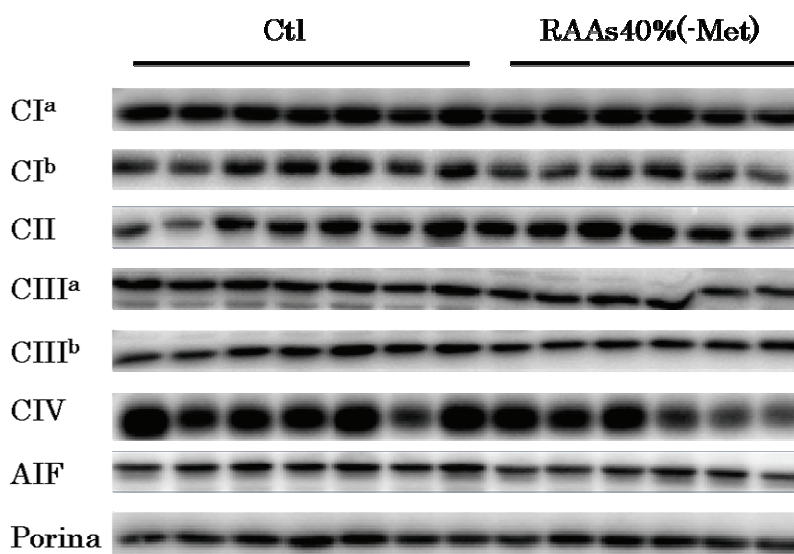


Figura S4 Imatges representatives de les immunotransferències en fetge de l'experiment de restricció de tots els aminoàcids excepte la metionina.

CI^a i CI^b : subunitats NDUFA9 i NDUFS3 del complex I; CII: subunitat Flavoproteïna del complex II; CIII^a i CIII^b: subunitat *Core 2* i *Rieske Iron-Sulfur* del complex III; CIV: subunitat COX I del complex IV; AIF: Apoptosis inducing-factor. S'ha realitzat un control de càrrega per cada anticòs (anti-Porina), se'n mostra una imatge representativa.

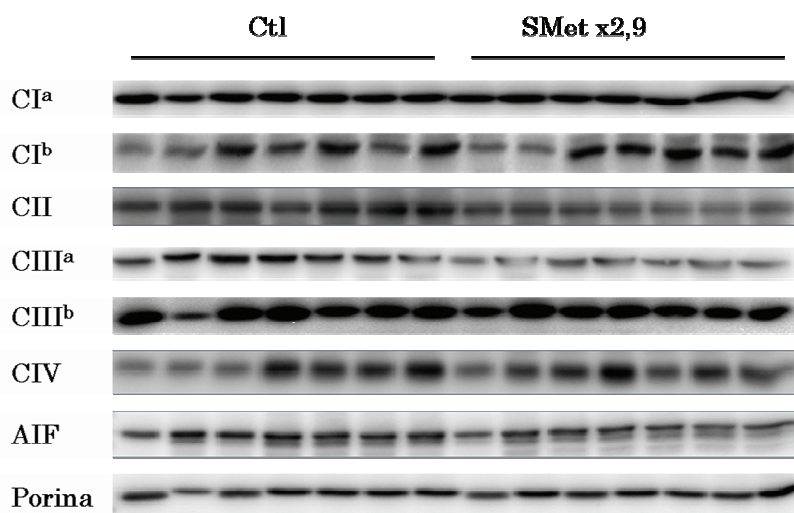


Figura S5 Imatges representatives de les immunotransferències en fetge de l'experiment de suplementació de metionina.

CI^a i CI^b : subunitats NDUFA9 i NDUFS3 del complex I; CII: subunitat Flavoproteïna del complex II; CIII^a i CIII^b: subunitat *Core 2* i *Rieske Iron-Sulfur* del complex III; CIV: subunitat COX I del complex IV; AIF: Apoptosis inducing-factor. S'ha realitzat un control de càrrega per cada anticòs (anti-Porina), se'n mostra una imatge representativa.

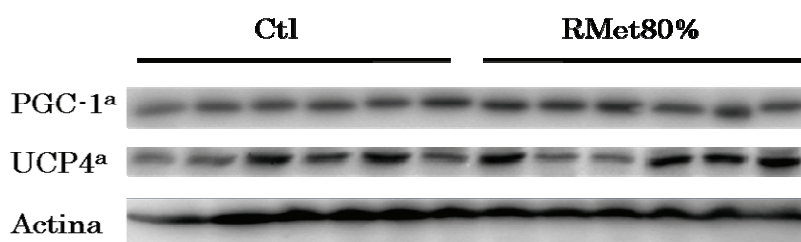


Figura S6 Imatges representatives de les immunotransferències en cervell de l'experiment de restricció de metionina al 80%.

PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α*) i la proteïna desacobladora específica de cervell UCP4 (*Uncoupling Protein 4*). S'ha realitzat un control de càrrega per cada anticòs (anti-Actina), se'n mostra una imatge representativa.

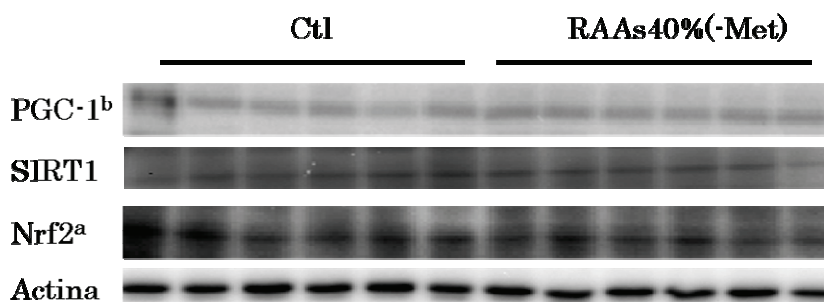


Figura S7 Imatges representatives de les immunotransferències en fetge en l'experiment de restricció de tots els aminoàcids al 40% excepte metionina.

PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α*); SIRT1 (*sirtuin 1*) i el factor nuclear de respiració Nrf2 (*NF-E2 related factor 2*). S'ha realitzat un control de càrrega per cada anticòs (anti-Actina), se'n mostra una imatge representativa.

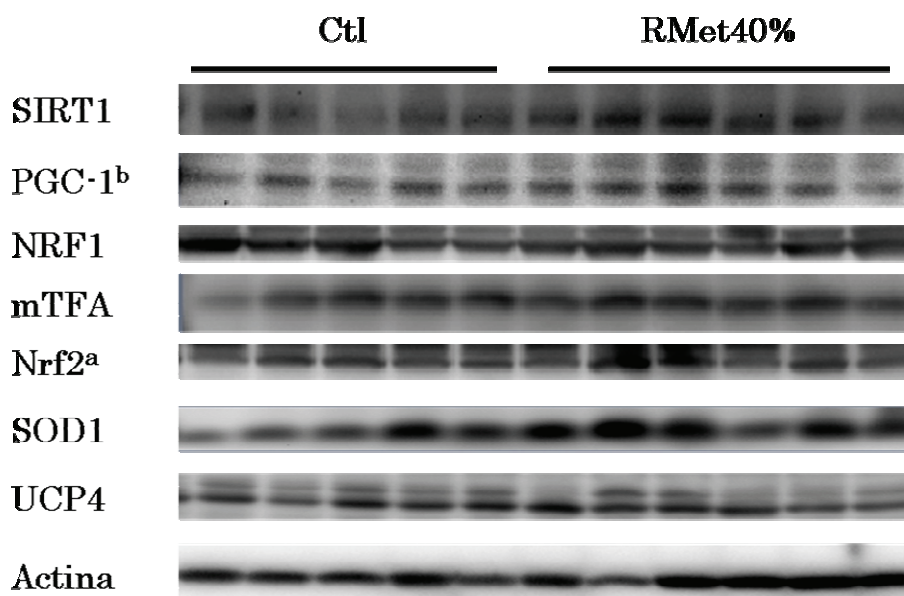


Figura S8 Imatges representatives de les immunotransferències en cervell en l'experiment de restricció de metionina al 40%.

SIRT1 (*sirtuin 1*); PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α*); el factor nuclear de respiració NRF1 (*nuclear respiratory factor1*); factor de transscripció mitocondrial A mTFA (*mitochondrial transcription factor A*); el factor nuclear de respiració Nrf2 (*NF-E2 related factor 2*). la superòxid dismutasa Cu/Zn (SOD1), i la proteïna desacobladora específica de cervell UCP4 (*Uncoupling Protein 4*). S'ha realitzat un control de càrrega per cada anticòs (anti-Actina), se'n mostra una imatge representativa.

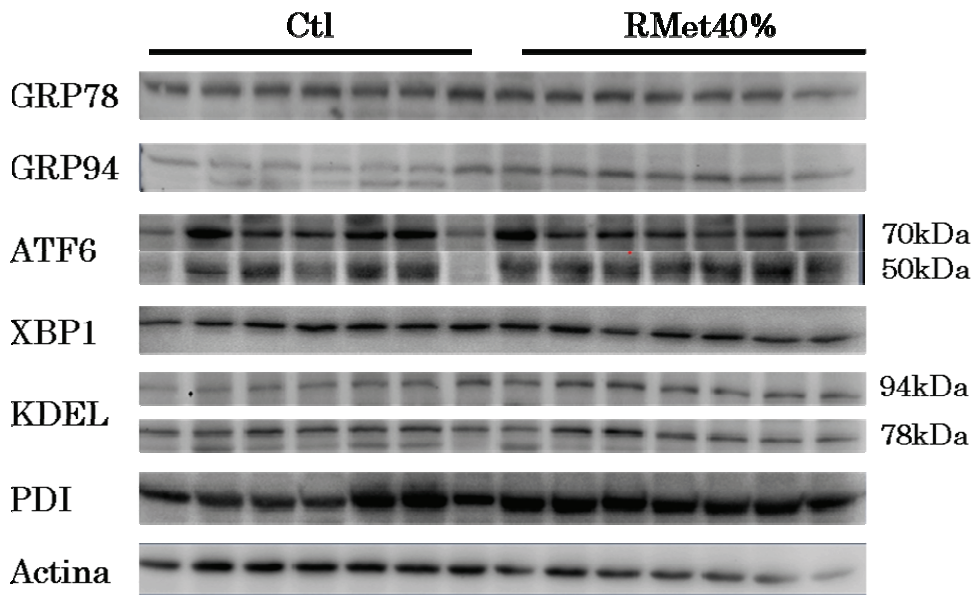


Figura S9 Imatges representatives de les immunotransferències en cervell en l'experiment de restricció de metionina al 40%.

Les proteïnes xaperones del reticle endoplasmàtic GRP 78 (*glucose regulated protein 78kDa*) i GRP 94 (*glucose regulated protein 94kDa*); la proteïna transmembrana del reticle endoplasmàtic ATF6 (*activating transcription factor 6*); el factor de transcripció XBP1 (*X box binding protein 1*); el receptor de membrana KDEL, i la proteïna disulfur isomerasa (*protein disulphide isomerase*) PDI. S'ha realitzat un control de càrrega per cada anticòs (anti-Actina), se'n mostra una imatge representativa

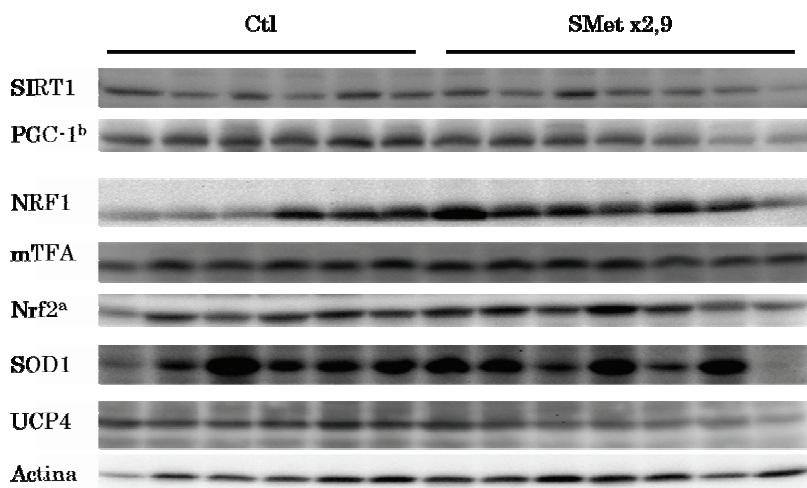


Figura S10 Imatges representatives de les immunotransferències en cervell en l'experiment de suplementació de metionina.

SIRT1 (*sirtuin 1*); PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α*); el factor nuclear de respiració NRF1 (*nuclear respiratory factor1*); factor de transcripció mitocondrial A mTFA (*mitochondrial transcription factor A*); el factor nuclear de respiració Nrf2 (*NF-E2 related factor 2*). la superòxid dismutasa Cu/Zn (SOD1), i la proteïna desacobloradora específica de cervell UCP4 (*Uncoupling Protein 4*). S'ha realitzat un control de càrrega per cada anticòs (anti-Actina), se'n mostra una imatge representativa.

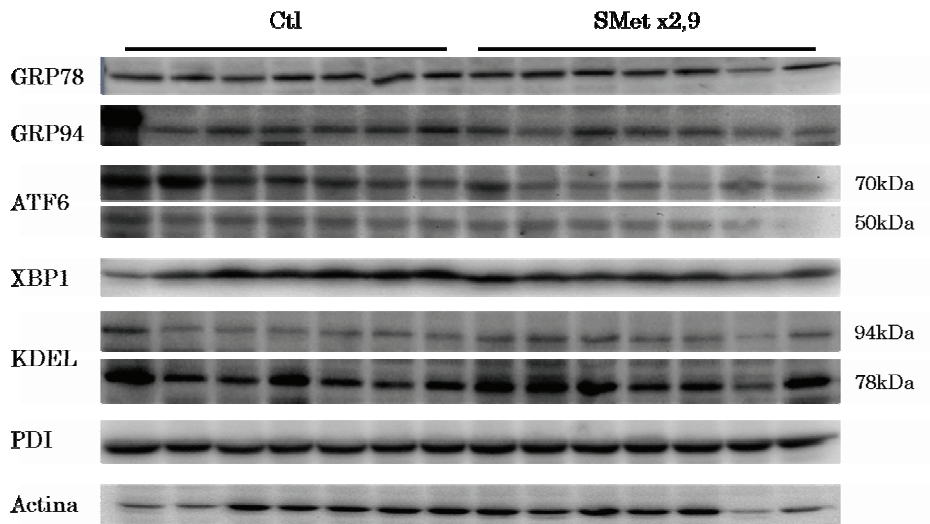


Figura S11 Imatges representatives de les immunotransferències en cervell en l'experiment de suplementació de metionina.

Les proteïnes xaperones del reticle endoplasmàtic GRP 78 (*glucose regulated protein 78kDa*) i GRP 94 (*glucose regulated protein 94kDa*); la proteïna transmembrana del reticle endoplasmàtic ATF6 (*activating transcription factor 6*); el factor de transcripció XBP1 (*X box binding protein 1*); el receptor de membrana KDEL, i la proteïna disulfur isomerasa (*protein disulphide isomerase*) PDI. S'ha realitzat un control de càrrega per cada anticòs (anti-Actina), se'n mostra una imatge representativa.

ANNEX II

FORMACIÓ ACADÈMICA

Llicenciada en Química, Universitat de Barcelona, Febrer 2006

PUBLICACIONS EN REVISTES

- Ilieva, E.V., Kichev, A., **Naudí, A.**, Ferrer, I., Pamplona, R. & Portero-Otín, M. 2010, "Mitochondrial dysfunction induces both oxidative and endoplasmic reticulum stress in argyrophilic grain disease.", *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* Submitted.
- Sanz, A., Soikkeli, M., Portero-Otín, M., Wilson, A., Kempainen, E., McIlroy, G., Ellila, S., Kempainen, K.K., Tuomela, T., Lakanmaa, M., Kiviranta, E., Stefanatos, R., Dufour, E., Hutz, B., **Naudí, A.**, Jove, M., Zeb, A., Vartiainen, S., Matsuno-Yagi, A., Yagi, T., Rustin, P., Pamplona, R. & Jacobs, H.T. 2010, "Expression of the yeast NADH dehydrogenase Ndi1 in Drosophila confers increased lifespan independently of dietary restriction", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 20, pp. 9105-9110.
- Naudí, A.**, Jove, M., Ayala, V., Portero-Otín, M. & Pamplona, R. 2010, "Glycation of mitochondrial proteins, oxidative stress and aging.", *Revista española de geriatría y gerontología*, .
- Fourcade, S., Ruiz, M., Guilera, C., Hahnen, E., Brichta, L., **Naudí, A.**, Portero-Otín, M., Dacremont, G., Cartier, N., Wanders, R., Kemp, S., Mandel, J.L., Wirth, B., Pamplona, R., Aubourg, P. & Pujol, A. 2010, "Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked adrenoleukodystrophy", *Human molecular genetics*, vol. 19, no. 10, pp. 2005-2014.
- Ilieva, E.V., **Naudí, A.**, Kichev, A., Ferrer, I., Pamplona, R. & Portero-Otín, M. 2010, "Depletion of oxidative and endoplasmic reticulum stress regulators in Pick disease", *Free radical biology & medicine*, vol. 48, no. 10, pp. 1302-1310.
- Fernandez, L.L., Carmona, M., Portero-Otín, M., **Naudí, A.**, Pamplona, R., Schroder, N. & Ferrer, I. 2010, "Effects of increased iron intake during the neonatal period on the brain of adult AbetaPP/PS1 transgenic mice", *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, vol. 19, no. 3, pp. 1069-1080.
- Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., **Naudí, A.**, Ayala, V., Lopez-Torres, M., Pamplona, R. & Barja, G. 2009b, "Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria", *Rejuvenation research*, vol. 12, no. 6, pp. 421-434.
- Quiles, J.L., Pamplona, R., Ramirez-Tortosa, M.C., **Naudí, A.**, Portero-Otín, M., Araujo-Nepomuceno, E., Lopez-Frias, M., Battino, M. & Ochoa, J.J. 2010, "Coenzyme Q addition to an n-6 PUFA-rich diet resembles benefits on age-related mitochondrial DNA deletion and oxidative stress of a MUFA-rich diet in rat heart", *Mechanisms of ageing and development*, vol. 131, no. 1, pp. 38-47.
- Muntane, G., Janue, A., Fernandez, N., Odena, M.A., Oliveira, E., Boluda, S., Portero-Otín, M., **Naudí, A.**, Boada, J., Pamplona, R. & Ferrer, I. 2010, "Modification of brain lipids but not phenotype in alpha-synucleinopathy transgenic mice by long-term dietary n-3 fatty acids", *Neurochemistry international*, vol. 56, no. 2, pp. 318-328.

- Gomez, J., Caro, P., Sanchez, I., **Naudí, A.**, Jove, M., Portero-Otin, M., Lopez-Torres, M., Pamplona, R. & Barja, G. 2009, "**Effect of methionine dietary supplementation on mitochondrial oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver and heart**", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 41, no. 3, pp. 309-321.
- Caro, P., Gomez, J., Sanchez, I., Garcia, R., Lopez-Torres, M., **Naudí, A.**, Portero-Otin, M., Pamplona, R. & Barja, G. 2009a, "**Effect of 40% restriction of dietary amino acids (except methionine) on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver**", *Biogerontology*, vol. 10, no. 5, pp. 579-592.
- Martinez, A., Carmona, M., Portero-Otin, M., **Naudí, A.**, Pamplona, R. & Ferrer, I. 2008, "Type-dependent oxidative damage in frontotemporal lobar degeneration: cortical astrocytes are targets of oxidative damage", *Journal of neuropathology and experimental neurology*, vol. 67, no. 12, pp. 1122-1136.
- Pamplona, R., **Naudí, A.**, Gavin, R., Pastrana, M.A., Sajjani, G., Ilieva, E.V., Del Rio, J.A., Portero-Otin, M., Ferrer, I. & Requena, J.R. 2008, "Increased oxidation, glycooxidation, and lipoxidation of brain proteins in prion disease", *Free radical biology & medicine*, vol. 45, no. 8, pp. 1159-1166.
- Caro, P., Gomez, J., Lopez-Torres, M., Sanchez, I., **Naudí, A.**, Portero-Otin, M., Pamplona, R. & Barja, G. 2008b, "Effect of every other day feeding on mitochondrial free radical production and oxidative stress in mouse liver", *Rejuvenation research*, vol. 11, no. 3, pp. 621-629.
- Fourcade, S., Lopez-Erauskin, J., Galino, J., Duval, C., **Naudí, A.**, Jove, M., Kemp, S., Villarroya, F., Ferrer, I., Pamplona, R., Portero-Otin, M. & Pujol, A. 2008, "Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy", *Human molecular genetics*, vol. 17, no. 12, pp. 1762-1773.
- Caro, P., Gomez, J., Lopez-Torres, M., Sanchez, I., **Naudí, A.**, Jove, M., Pamplona, R. & Barja, G. 2008a, "**Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver**", *Biogerontology*, vol. 9, no. 3, pp. 183-196.
- Naudí, A.**, Caro, P., Jove, M., Gomez, J., Boada, J., Ayala, V., Portero-Otin, M., Barja, G. & Pamplona, R. 2007, "**Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain**", *Rejuvenation research*, vol. 10, no. 4, pp. 473-484.
- Naudí, A.**, Jové, M., Cacabelos, D., Ilieva, E., Boada, J., Ayala, V., Portero-Otin, M. & Pamplona, R. 2007, "The biological basis of the aging process", vol. 3, no. 4, pp. 489.
- Gomez, J., Caro, P., **Naudí, A.**, Portero-Otin, M., Pamplona, R. & Barja, G. 2007, "Effect of 8.5% and 25% caloric restriction on mitochondrial free radical production and oxidative stress in rat liver", *Biogerontology*, vol. 8, no. 5, pp. 555-566.
- Ayala, V., **Naudí, A.**, Sanz, A., Caro, P., Portero-Otin, M., Barja, G. & Pamplona, R. 2007, "**Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver**", *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, vol. 62, no. 4, pp. 352-360.

CAPÍTOLS DE LLIBRE

Naudí, A., Jové, M., Ilieva, E., Cacabelos, D., Gonzalo, H., Serrano, J., Boada, J., Ayala, V., Portero-Otín, M. & Pamplona, R. 2009, "**Bases biològiques del proceso de envejecimiento y longevidad**" in *Actualizaciones en aspectos básicos y clínicos del envejecimiento y fragilidad*, ed. Leocadio Rodríguez Mañas, Madrid, pp. 43-69.

Naudí, A., Jové, M., Cacabelos, D., Ilieva, E., Gonzalo, H., Serrano, J., Ayala, M.V., Boada, J., Portero-Otín, M. & Pamplona, R. 2009a, "**Estrés oxidativo y lípidos: determinación del índice de peroxidabilidad de los lípidos de membrana y la lesión lipoxidativa a proteínas**" in *Biogerontología Médica*, eds. J. Sastre, R. Pamplona & J.R. Ramón, 1a edn, Sociedad Española de Geriatria y Gerontología, Madrid, pp. 383-393.

Naudí, A., Jové, M., Ilieva, E., Cacabelos, D., Gonzalo, H., Serrano, J., Boada, J., Ayala, M.V., Portero-Otín, M. & Pamplona, R. 2009b, "**Oxidación de Macromoléculas, Envejecimiento y Longevidad**" in *Biogerontología Médica*, eds. J. Sastre, R. Pamplona & J.R. Ramón, 1a edn, Sociedad Española de Geriatria y Gerontología, Madrid, pp. 43-69.

Formation of S-(carboxymethyl)-cysteine in rat liver mitochondrial proteins. Effects of caloric and methionine restriction.

Alba Naudí,¹ Mariona Jové,¹ Victoria Ayala,¹ Manuel Portero-Otín,¹ Pilar Caro,² José Gomez,² Gustavo Barja,² Reinald Pamplona.^{1*}

¹ Department of Experimental Medicine, University of Lleida-IRBLLEIDA, E-25008 Lleida, Spain

² Department of Animal Physiology-II, Complutense University, E-28040 Madrid, Spain.

Corresponding author: Prof. Dr. R. Pamplona. Departament de Medicina Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, c/ Montserrat Roig-2, E25008 Lleida, Spain. Phone.: +34-973702408; Fax: +34-973702426; e-mail: reinald.pamplona@mex.udl.cat

Key words: Aging; S-(carboxymethyl)-cysteine; N^ε-(carboxymethyl)-lysine; dietary restriction; oxydative stress; protein damage; sulfhydryl group.

Abbreviations used: AGE, advanced glycation end-product; CMC, S-(carboxymethyl)-cysteine in proteins; CML, N^ε-(carboxymethyl)-lysine in proteins; CR, caloric restriction; MetR, methionine restriction; MSD, mass selective detector; ROS, reactive oxygen species; GC/MS, gas chromatography/mass spectrometry.

Abstract

Maillard reaction contributes to the chemical modification and cross-linking of proteins during aging. Oxidative conditions promote the Maillard reaction. Mitochondria are the primary site of oxidants due to the reactive oxygen species (ROS) production. Mitochondrial respiratory chain complex cysteines are targets of oxidative attack due to their specific chemistry and localization. Their uncontrolled oxidation by ROS leads to dysfunctional proteins, which entails cellular senescence and organismal aging. Previous studies have consistently shown that caloric and methionine restriction decreases the rate of mitochondrial ROS production and steady-state levels of markers of oxidative damage to macromolecules. In this scenario, in the present work S-(carboxymethyl)-cysteine (CMC) has been detected and identified as a new irreversible chemical modification in mitochondrial proteins. CMC decreases in liver mitochondrial proteins of rats subjected to 8.5% and 25% caloric restriction, as well as 40% and 80% methionine restriction, with a concomitant and significant increase in protein sulfhydryl group content. The concentration of CMC in mitochondrial proteins significantly correlated with that of the advanced glycation end-product (AGE) N^ε-(carboxymethyl)-lysine. This novel and stable AGE is a potential marker of mitochondrial oxidative stress.

Introduction

A low rate of generation of endogenous damage and an intrinsically high resistance to modification of tissue macromolecules are key traits of animal longevity (Pamplona and Barja 2007). Caloric restriction (CR) is the better described experimental manipulation that increases maximum longevity of many different animal species, and lowers the oxidative stress and ROS generation in rodents (Sanz et al. 2006). Protein restriction and methionine restriction also increase maximum longevity and lower ROS generation and oxidative molecular damage (Pamplona and Barja 2006). These investigations point to a main role of the mitochondrial rate of ROS generation as the main source of oxidative molecular damage contributing to aging.

Although all types of biomacromolecules are susceptible of oxidative damage *in vivo* (Pamplona and Barja 2007), protein damage is thought to have direct physiological consequences due to their role as bio-catalysts. Attacks by ROS on proteins can cause a variety of structural modifications including, formation of disulfide cross-links, methionine sulfoxide, dy-tirosine cross-links, nitrotyrosine, and carbonyls (Dean et al. 1997). Protein carbonylation can occur by two different mechanisms: i) metal-catalyzed oxidation (MCO), which introduces carbonyls in to the side chains of certain amino acid (Requena et al. 2001); and ii) the Maillard reaction (Thorpe and Baynes 2003).

The Maillard reaction (glycation) between proteins and reducing sugars leads to formation of advanced glycation end-products (AGEs) and contributes to the chemical modification and crosslinking of proteins during aging (Monnier, 2003). Exacerbation of this reaction by a hyperglycemic state is implicated in the development of chronic complications of diabetes (Negre-Salvayre et al. 2009). Similar chemistry, involving the oxidative chemical modification of proteins by lipids and formation of advanced lipoxidation end-products (ALEs), is also thought to play a role in the aging process (Pamplona 2008), as well as the pathology of diabetes, atherosclerosis, and neurodegenerative diseases (Martinez et al. 2010; Negre-Salvayre et al. 2009).

Up to now, research on the formation of AGEs/ALEs *in vivo* has focused on chemical modification of the N-terminal α -amino group, the ϵ -amino group of lysine, and the guanidino group of arginine residues in protein. The described AGEs/ALEs are mostly derivatives of lysine and arginine residues, formed by reaction of the amino or guanidino groups on protein with electrophilic intermediates in carbohydrate and lipid autoxidation or metabolism. However, the sulfhydryl group on intracellular proteins is a more reactive nucleophile than either amino or guanidino groups, so that products of chemical modification of cysteine residues should also be observed as a result of intracellular Maillard reactions. The intracellular space is a reducing environment, rich in cysteine residues that are maintained in the reduced state by an array of reduced intermediates, including thioredoxins, peroxiredoxins, metallothioneins and glutathione

(GSH) (Thorpe and Baynes 2003). Changes in oxidation/reduction (redox) state of thiol/disulfide couples affect protein conformation, enzyme activity, transporter activity, ligand binding to receptors, protein-protein interactions, protein-DNA interactions, protein trafficking and protein degradation (Kemp et al. 2008).

Presuming that similar modifications of lysine and cysteine residues might occur in parallel during Maillard reactions *in vivo*, we propose to identify and to quantify S-(carboxymethyl)-cysteine (CMC), the putative product of reaction of glyoxal or glycolaldehyde with cysteine, in rat liver mitochondrial proteins. CMC is an analog of N^ε-(carboxymethyl)-lysine (CML) (Thorpe and Baynes 2003), a major lysine-derived AGE/ALE, formed by oxidation of glucose adducts to protein and by reaction of glyoxal or glycolaldehyde with proteins (Thorpe and Baynes 2003) (**Figure 1**). We report here on the detection and quantification of CMC in rat liver mitochondrial proteins, and on changes in CMC in mitochondrial proteins as a function of different dietary restriction interventions. So, we compare the carboxymethylation state in two different amino acids (lysine and cysteine) and in two different nutritional interventions which are known that decrease the protein oxidative-damage (Caro et al. 2008; Gómez et al. 2008). Thus, in this study, male Wistar rats were subjected, for a period of 7 weeks, to two experimental conditions: i/One about CR, where three groups were defined: control *ad libitum*, 8.5% CR, and 25% CR; and ii/ the second about MetR, with three additional groups: control *ad libitum*, 40% MetR, and 80% MetR. After 7 weeks, the two biomarkers were detected and comparatively measured in liver mitochondrial proteins. The mitochondrial protein sulfhydryl content was also determined.

Materials and Methods

Chemicals

Unless otherwise noted, all chemicals were purchased from Sigma–Aldrich Chemical Co. (Madrid, Spain). U-¹³C₃, ¹⁵N-cysteine, and d₈-lysine were from Cambridge Isotope Laboratories (Woburn, MA, EUA).

Animals and diets

Male Wistar rats of 250-300 g of body weight were caged individually and maintained in a 12:12 (light:dark) cycle at 22±2°C and 50±10% relative humidity. For caloric restriction experiment, the control animals were fed *ad libitum* with a standard rodent diet (Panlab, Barcelona, Spain). The amount of food eaten by the control was measured and their mean food consumption was calculated each week. The two experimental groups received each day an amount of food 8.5% or 25% smaller than the mean amount eaten by the control animals during the previous week. For methionine restriction experiment, semipurified diets prepared by MP Biochemicals (Irvine, CA, EUA) were used. The composition of the 40% and 80% MetR diets was similar to that of the control diet except that L-methionine was present at 0.516% and 0.172%,

which corresponds to amounts 40% and 80% lower than the L-methionine content of the control diet (0.86%). The % decrease in L-methionine in the 40% and 80% MetR diets was compensated with increases in all the rest of the dietary components in proportion to their presence in the diet. Since the % absolute decrease in L-methionine was small, with this procedure the % presence of all the rest of the dietary components was almost the same in the three experimental diets. The control and the 40% MetR groups received each day the same amount of food that the 80% MetR animals had eaten as a mean the previous week (pair feeding). Daily visual inspection of the rat cages indicated that there were no differences in food spillage between control and MetR animals.

After 6-7 weeks of dietary treatment the animals were sacrificed by decapitation. The liver was immediately processed to isolate mitochondria, which were used for the assay of the biochemical parameter. All experiments in animal models were conducted in accordance with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Lleida.

Liver mitochondria isolation

Liver mitochondria were obtained from fresh tissue. The liver was rinsed and homogenized in 60 ml of isolation buffer (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.35). The nuclei and cell debris were removed by centrifugation at 1,000 x g for 10 min. Supernatants were centrifuged at 10,000 x g for 10 min and the resulting supernatants were eliminated. The pellets were resuspended in 40 ml of isolation buffer without EDTA and centrifuged at 1,000 x g for 10 min. Mitochondria were obtained after centrifugation of the supernatants at 10,000 x g for 10 min. After each centrifugation step any overlaying layer of fat was eliminated. The mitochondrial pellets were resuspended in 1 ml of isolation buffer without EDTA. All the above procedures were performed at 5°C. Mitochondrial protein was measured by the Biuret method. The final mitochondrial suspensions were stored at -80°C until analyses were performed.

Analytical methods

CMC was detected and characterized by mass spectrometry of the trifluoroacetyl methyl ester (TFAME) derivative using methods described previously (Pamplona et al. 2005). Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) of standards were performed on a Hewlett-Packard (Agilent, Barcelona, Spain) model 6890series gas chromatograph/5973A mass selective detector (GC/MSD), equipped with a Rtx-5 column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (Restek, Bellefonte, PA). For GC/MS analysis, the injector port was maintained at 275°C; the temperature program was 5 min at 110°C, then 2°C/min to 150°C, then 5°C/min to 240°C, then 25°C/min to 300°C, and finally hold at 300°C for 5 min.

Analysis of mitochondrial protein

CMC and CML concentrations in mitochondrial proteins were determined by selected ion monitoring (SIM)-GC/MS. Briefly, samples containing 0.5 mg of protein were delipidated using

chloroform:methanol (2:1 v/v), and proteins were reduced overnight with 500 mM NaBH₄ in 0.2M borate buffer, pH 9.2, containing 1 drop of hexanol as an anti-foam reagent. Proteins were reprecipitated by adding 1 mL of 20% trichloroacetic acid (TCA) and subsequent centrifugation. After addition of isotopically labelled internal standards (d₈-lysine, d₄-CML, and U-¹³C₃¹⁵N-CMC), the samples were hydrolysed at 155°C for 30 min in 1 mL of 6 N HCl and were dried in vacuo (Speed-Vac; Savant/GMI Instruments, Barcelona, Spain). The N,O-trifluoroacetyl methyl ester (TFAME) derivatives of the protein hydrolysates for GC/MS analysis were prepared as previously described (Pamplona et al. 2005).

Isotope dilution selected ion monitoring (SIM) GC/MS was used for quantitative analysis of mitochondrial proteins, using standard curves developed from mixtures of varying amounts of natural lysine, CML and CMC with a constant amount of the heavy-labeled compound. The ions used were: lysine and [²H₈]lysine, *m/z* 180 and 187, respectively; CML and [²H₄]CML, *m/z* 392 and 396, respectively; CMC and U-¹³C₃¹⁵N-CMC, *m/z* 271 and 275, respectively. The amount of products were expressed as the ratio μmol CMC and CML/mol of lysine and also normalized for protein amount as μmol CMC and CML / mol protein.

Measurement of protein sulfhydryl groups content

Thiol concentrations were assayed by a spectrofluorimetric method. It was used the thiol fluorescent detection kit (ref. K005-F1; Luminos, MI, EUA) which determine the extent of free thiol content in samples using a nonfluorescent substrate, that will covalently bind to free thiol groups to yield a highly fluorescent product. Briefly, it was mixed the appropriate dilution of the sample or standard (N-acetylcysteine) with the substrate in a 96 well plate and it was incubated at room temperature for 30 min. After incubation, the fluorescent product was read at emission 510nm with excitation at 390nm in a fluorimeter (Tecan Infinite M200; Tecan Group Ltd, Switzerland) with the software i-control V1.4 SP1. The sample thiol concentration was calculated using the standard curve of N-acetylcysteine, after making a suitable correction for any sample dilution. Results were expressed as nmol SH/mg of protein.

Statistical analysis

Data are summarized throughout as means ± SEM. Statistical analyses were performed using SPSS software (SPSS Inc. Chicago, IL). Data were analyzed by one way ANOVA. After the ANOVA, the Duncan test was performed for comparisons between pairs of groups. The minimum level of statistical significance was set at P < 0.05 in all the analyses.

Results

Detection of S-(carboxymethyl)-cysteine (CMC) in mitochondrial proteins

CMC standard was from Sigma/Aldrich. U- $^{13}\text{C}_3$ ^{15}N -CMC was synthesized from U- $^{13}\text{C}_3$ ^{15}N -cysteine and iodoacetic acid as described (Wang 2002). The full-scan spectra and structure of the TFAME derivatives of the standards, analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), are shown in Figure 2. The presence of the thiol-aldehyde adduct CMC in mitochondrial proteins was confirmed by detection of several ions derived from CMC at the same retention time and with the same relative ion intensities observed for the unlabeled standard (Figure 3).

Comparative measurement of carboxymethylation-derived mitochondrial protein markers. Effects of caloric and methionine restriction.

The values of the carboxymethylation-derived markers of mitochondrial protein modification (CMC and CML) are shown in Figure 4a and 4b. CMC and CML were significantly lower in 8.5% CR and 25% CR when compared to the controls (Figura 4a). No significant differences for any of the two different protein markers were found when comparing the 8.5% with the 25% CR group. In a similar way, CMC and CML were significantly lower in 40% MetR and 80% MetR when compared to the controls (Figura 4b). No significant differences for any of the two different protein markers were found when comparing the 40% with the 80% MetR group.

Because CMC is formed at mitochondrial level, we considered that it might be a useful index of mitochondrial dysfunction and chemical damage to mitochondrial protein in aging. As shown in Figures 4a and 4b, CMC was present in mitochondrial proteins in control animals at a level representing between 10-20% of CML level. CMC, like CML, decreased in mitochondrial proteins of caloric and methionine restricted rats. So, CMC decreases around 15% (for CR) and 30% (for MetR) with respect to the control group; while CML decreases around 30% in both dietary interventions compared to the control group. In addition, there was a significant correlation between the CMC and CML content of liver mitochondria proteins (Figure 5), which was apparent in both caloric- and methionine-restricted (for CR, $r = 0.67$, $p < 0.006$; for MetR, $r = 0.60$, $p < 0.013$) rats, suggesting that these modifications are produced in response to similar stresses, possibly the result of mitochondrial oxidative stress.

Effect of caloric and methionine restriction on mitochondrial protein sulfhydryl content

The formation process of CMC is accompanied by loss of the thiol group and formation of the stable adduct. For this reason we have measured the protein sulfhydryl content in order to evaluate the effect of caloric- and methionine restriction. The values of sulfhydryl content in mitochondrial proteins are shown in Figure 6. Sulfhydryl content was significantly higher in

8.5% CR and 25% CR when compared to the controls (Figure 6a). No significant differences were found when comparing the 8.5% with the 25% CR group. In a similar way, sulfhydryl content was significantly higher in 40% MetR and 80% MetR when compared to the controls (Figure 6b). No significant differences were found when comparing the 40% with the 80% MetR group.

Discussion

The Maillard reaction (glycation) between proteins and reducing sugars leads to formation of AGEs/ALEs and contributes to the chemical modification and cross-linking of proteins during aging. To date, research on the formation of AGEs/ALEs *in vivo* has focused on chemical modification of the N-terminal α -amino group, the ϵ -amino group of lysine, and the guanidino group of arginine residues in protein. However, the sulfhydryl group on intracellular proteins is a more powerful and reactive nucleophile than either amino or guanidino groups, so that products of chemical modification of cysteine residues should also be observed as a result of intracellular Maillard reactions. Presuming that similar modifications of lysine and cysteine residues might occur in parallel during Maillard reactions *in vivo*, we set out to identify S-(carboxymethyl)cysteine (CMC), the putative product of reaction of the carbonyl compounds glyoxal or glycolaldehyde with cysteine. The thiol-aldehyde adduct CMC should be an analog of N ϵ -(carboxymethyl)lysine (CML), a major lysine-derived AGE, formed by oxidation of glucose adducts to protein and by reaction of the carbonyl compounds glyoxal or glycolaldehyde with protein. In the present study, it has been demonstrated by mass spectrometry methods that cysteine residues, analogously to lysine, are targets for carbonyl compounds when present on mitochondrial proteins. Based on its structure and proposed mechanism of formation from *in vitro* studies, the product CMC is a thioether, not a thioester, adduct to cysteine and is therefore not reversible by transesterification reactions with glutathione or other cellular thiols. Consequently, mitochondrial CMC must be considered as an irreversible and stable endproduct.

The lower level of CMC, ~20% the level of CML, in mitochondrial proteins is consistent with the low level of cysteine in mitochondrial proteins (Moosmann and Behl 2008). However, actual concentrations of cysteine are only about 10% the concentration of lysine in cellular protein. Thus, cysteine, which is a stronger nucleophile than lysine, can be considered as a primary target of nonenzymatic carboxymethylation of protein. For this reason CMC might be more sensitive indicator of mitochondrial (and intracellular) carbonyl formation and oxidative stress.

The strong correlation between CMC and CML in rat liver mitochondrial protein suggests that these modifications are produced in response to similar stresses, possibly the result of oxidative stress at mitochondrial level. The net flux of mitochondrial oxidative stress result in a steady-state level of damaged mitochondrial proteins that need to be rapidly removed, before they accumulate as insoluble aggregates and disrupt mitochondrial function and cellular

homeostasis. Glycation is a major cause of spontaneous damage to cellular and extracellular proteins in physiological systems, affecting e.g. 0.1–0.2% of lysine and arginine residues. For some proteins with limited protein turnover, such as lens proteins, the extent of protein glycation may be up to 10-fold higher. Most mitochondrial proteins are short-lived, however, with turnovers from 10–30 min to 3–5 days. Probably the most important glyating agents to consider for glycation damage to the mitochondrial proteome are reactive carbonyls such as glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone formed endogenously by lipid peroxidation and the degradation of metabolic intermediates. These carbonyl compounds are potent glyating agents, 200–50000-fold more reactive than glucose, although physiological concentrations are typically 10000–50000-fold lower than glucose. Quality control of the mitochondrial proteome involves mitochondrial proteases, ubiquitination and proteolysis of outer membrane, mitochondrial fission and fusion, and finally autophagy of damaged mitochondria (mitophagy).

The livers of old rats exhibit less mitochondrial protease (Lon proteases) activity and higher amounts of oxidized and CML protein content than do livers of young rats. Similarly, the Lon content and activity in skeletal muscle mitochondria from old mice are significantly decreased from values found in young mice, whereas the levels of oxidized mitochondrial proteins are increased. In contrast to these results in rodent liver and skeletal muscle, the activity of Lon remains unchanged in heart muscle from old rats, although Lon protein and mRNA levels both increase with age, suggesting an accumulation of inactive Lon. Additionally, in a recent study was shown that reactive aldehydes and protein-bound carbonyls inhibited lysosomal cysteine proteases through modification of the active site cysteine residue, providing a partial explanation for the accumulation of modified proteins, particularly in the lysosomes, in a wide range of cells treated with oxidative and carbonyl stress. Consequently, it can be inferred that the accumulation of oxidized mitochondrial proteins and impaired mitochondrial function observed during aging may be due, at least in part, to the nonenzymatic and irreversible modification of cysteine residues by carbonyl compounds.

Protein oxidation is thought to constitute an important trigger of the aging process (Sohal, 2002; Stadtman, 2004). Animal models of impaired oxidized protein repair have been shown to exhibit premature aging phenotypes (Moskovitz et al., 2001). Cysteine oxidation and the consequent loss of free thiol groups is well-known to be one of the first biochemical alterations in proteins after exposure to ROS (Sohal, 2002). Thiol loss is an established biomarker of aging (Droge, 2002), notably in membrane proteins (Agarwal & Sohal, 1994), and it is known to be induced by hyperoxia and to be attenuated by caloric restriction (Sohal, 2002). Long-lived mouse strains maintain higher levels of reduced glutathione, especially in mitochondria, affording the reduction of oxidized protein cysteines (Rebrin & Sohal, 2004) and the glutathionylation of free cysteines (Hurd et al., 2005). In addition, supplementation of mice with N-acetylcysteine partially prevents the age-associated decline of complex I and IV activity observed in these animals (Miquel et al., 1995). In this line, in the present study mitochondrial CMC content is attenuated by caloric and methionine restriction, with a concomitant increase in

protein free sulfhydryl content, probably due, considering that CMC is irreversible, to an increased mitochondrial turnover as described recently in caloric restriction.

One important, but to date almost unexplored, element is the potential role of modification of thiol groups on proteins. Most non-enzymatic chemical modifications of protein are products of oxidation and/or Maillard reaction. Cysteine and methionine are the only amino acids in proteins which contain elements undergoing reversible oxidation under physiological conditions. These elements are aptly described as "sulfur switches" because the reversible oxidations provide a means to control a broad range of activity and structure of proteins. The sulfur atoms of both cysteine and methionine can undergo multiple oxidations, but the reversible oxidation of thiols to disulfides has been the most extensively studied. Changes in oxidation/reduction (redox) state of thiol/disulfide couples affect protein conformation, enzyme activity, transporter activity, ligand binding to receptors, protein–protein interactions, protein–DNA interactions, protein trafficking, and protein degradation, affecting components in redox signaling, transcriptional regulation, cell proliferation, apoptosis, hormonal signaling, and other fundamental cell functions.

The ubiquitous and functional nature of these cysteine sulfhydryls also makes them a target for AGE/ALE formation with the potential for widespread impact. In contrast to the character reversible for oxidation, Maillard reaction-derived compounds are stable and irreversible. Cysteine thiol radicals and their diverse derivatives (e.g. CMC) have the detrimental capacity to initiate irreversible protein cross-linking (Giles & Jacob, 2002; Jacob *et al.*, 2003; Nauser *et al.*, 2004). The inner mitochondrial membrane is characterised by a uniquely high protein content of approximately 75% by mass. In view of these structural premises, it is clear that protein cross-linking, often yielding dysfunctional enzymes and decreased membrane fluidity, will occur significantly earlier in such a high-protein membrane. Decreased membrane fluidity and a reduced diffusion coefficient of integral membrane proteins are well-established biochemical markers for aging (Kitani, 1991; Shigenaga *et al.*, 1994; Zs-Nagy *et al.*, 2001), whereas undegradable, hydrophobic and mitochondrial membrane proteins seem to predominate the histological hallmark of aging, lipofuscin (Jolly *et al.*, 2002).

Interestingly, in a recent research it was found evidence of lifespan extension of the nematode *Caenorhabditis elegans* with overexpression of the gene for glyoxalase 1 (Glo1). Silencing of Glo1 decreased lifespan. Glo1 is a glutathione-dependent enzyme that catalyses the metabolism of reactive carbonyl compounds such as methylglyoxal and glyoxal. It thereby prevents the glycation of proteins by these carbonyl compounds. Proteins of mitochondria were found to be major targets of carbonyl glycation: increased glycation of mitochondrial proteins was associated with increased formation of ROS and increased proteome damage by oxidative and nitrosative processes. There was a decline of Glo1 expression in *C. elegans* and increased formation of mitochondrial ROS in normal aging. Overexpression of Glo1 in *C. elegans* decreased carbonyl glycation of mitochondrial proteins, decreased the formation of ROS and proteome markers of carbonyl glycation and also markers of oxidative and nitrosative damage

(methionine sulfoxide and 3-nitrotyrosine residues respectively) with concomitant life extension. This was indicative that carbonyl glycation could be a critical damage to the mitochondrial proteome that triggers increased ROS and oxidative damage in aging.

Mitochondrial respiratory chain complex cysteines are distinguished targets for oxidative attack due to their specific chemistry and localization. Their uncontrolled oxidation by ROS leads to dysfunctional proteins, which entails cellular senescence and organismal aging. For this reason, cysteine depletion does occur on a proteome-wide scale in aerobic unicellular organisms, providing a clear case in point for the evolutionary pertinence of optimizing protein durability by selective amino acid ablation. Furthermore, long-lived species avoid employing this amino acid. Indeed, the longer the longevity of a species, the lower is the mitochondrial protein cysteine content. Consequently, the longer the longevity of a species, the higher is the mitochondrial protein resistance to oxidative damage. The site affected by cysteine depletion is the inner mitochondrial membrane respiratory chain because it renders them more resistant to oxidative attack, being an evidence of the evolutionary pressure towards functionally optimized respiratory chain complexes. Improved control of the cellular thiol redox state thus constitutes a paradigmatic biochemical adaptation in long-lived versus short-lived animals, which is directed at the prevention or amelioration of the toxic effects of reactive molecular species (Beckman & Ames, 1998). Other examples include the use of oxidation-resistant lipids to build mitochondrial membranes (Pamplona et al., 1998), or the improved fidelity and minimized radical generation of respiring mitochondria in long-lived species (Sohal & Brunk, 1992).

Overall, these observations support the Free Radical Theory of Aging (Beckman & Ames, 1998; Harman, 1956) and underline the importance of mitochondria as determinants of aging and longevity.

Acknowledgments

This study was supported in part by I+D grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2008-00335/BFI), and BSCH-UCM (for 2009) to G.B; grants from the Spanish Ministry of Health (PI08843) and Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2006-12433) to M.P.O; and grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2009-11879/BFI), the Spanish Ministry of Health (RD06/0013/0012), and the Generalitat of Catalunya (2009SGR00735) to R.P. P. Caro and J. Gómez received predoctoral fellowships from the Ministry of Education and Science. We thank David Argiles for excellent technical assistance.

References

Mostafa AA, Randell EW, Vasdev SC, Gill VD, Han Y, Gadag V, Raouf AA, El Said H. 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 Aug;302(1-2):35-42. Epub 2007 Feb 21

Zeng J, Davies MJ Evidence for the formation of adducts and S-(carboxymethyl)cysteine on reaction of alpha-dicarbonyl compounds with thiol groups on amino acids, peptides, and proteins. *Chem Res Toxicol.* 2005 Aug;18(8):1232-41. potential marker of glycation , evidence of formation of CMC in vitro in

Alt N, Carson JA, Alderson NL, Wang Y, Nagai R, Henle T, Thorpe SR, Baynes JW. Chemical modification of muscle protein in diabetes. *Arch Biochem Biophys.* 2004 May 15;425(2):200-6
Patró de fragmentació de CMC

Thorpe SR, Baynes JW. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids.* 2003 Dec;25(3-4):275-81. Epub 2003 Jul 29

"CMC is present in intracellular proteins at absolute concentrations comparable to CML –despite the much lower concentration of cysteine, compared to lysine, residues in proteins" (Thorpe & Baynes,2003)

Kemp M, Go YM, Jones DP. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med.* 2008 Mar 15;44(6):921-37. Epub 2007 Nov 28.

FIGURES

