

## **Radicales libres de origen mitocondrial y longevidad**

GUSTAVO BARJA

*Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional  
de Farmacia*

### **RESUMEN**

Desde los inicios del siglo XX se han propuesto muchas teorías diferentes sobre las causas del envejecimiento. Hoy en día, la teoría de los radicales libres de origen mitocondrial es la que disfruta de más apoyos a su favor en la literatura científica. En el presente artículo se revisan los trabajos publicados sobre la relación entre la longevidad máxima de las distintas especies animales y sus niveles endógenos de antioxidantes y de generación mitocondrial de radicales de oxígeno. La mayoría de los estudios sobre suplementación experimental con antioxidantes indican que pueden aumentar la esperanza de vida pero no cambian la longevidad máxima. Además, los antioxidantes endógenos correlacionan de forma negativa con la longevidad máxima. Sin embargo, la intensidad de producción mitocondrial de radicales de oxígeno y el daño oxidativo al ADN mitocondrial son menores en los animales longevos que en los de vida corta. Los animales longevos también muestran un menor grado de insaturación de los ácidos grasos de sus membranas tisulares que las especies de vida corta. Por otra parte, la restricción calórica, la manipulación experimental mejor conocida que disminuye la velocidad del envejecimiento, también disminuye la producción mitocondrial de radicales libres y el daño oxidativo al ADN mitocondrial. Este descenso ocurre en el complejo I. Estos resultados sugieren que se han utilizado mecanismos similares para aumentar la longevidad tanto en la restricción calórica como durante la evolución de especies animales con distinta velocidad de envejecimiento, y que dichos mecanismos incluyen un descenso en la intensidad de generación de radicales libres en la mitocondria.

**Palabras clave:** Radicales libres.—Mitocondrias.—Envejecimiento.—Longevidad.—ADN.—Ácidos grasos.—Restricción calórica.

**ABSTRACT****Mitochondrial free radicals and longevity**

Since the beginning of the XXth century many theories have been proposed to explain aging. Nowadays, the mitochondrial free radical theory is strongly supported by the available scientific evidence. In this article published studies on the relationship between the maximum longevity of animals and their levels of endogenous antioxidants and mitochondrial rates of oxygen radical generation are reviewed. Most studies of antioxidant supplementation indicate that these chemicals can increase mean but not maximum longevity. In addition, endogenous antioxidant levels negatively correlate with maximum longevity. However, the rate of production of oxygen radicals at mitochondria and the steady-state levels of oxidative damage in mitochondrial DNA are lower in long-lived than in short-lived animal species. Long-lived species also have lower levels of fatty acid unsaturation in their cellular membranes. On the other hand, caloric restriction, the best known manipulation that decreases the rate of aging, also lowers mitochondrial free radical production and oxidative damage to mitochondrial DNA. This decrease occurs at complex I. These results suggest that common mechanisms have been used to increase longevity in caloric restriction and during the evolution of animal species with different aging rates. These mechanisms include a decrease in the rate of generation of free radicals at mitochondria.

**Key words:** Free radicals.—mitochondria.—aging.—longevity.—DNA.—fatty acids.—caloric restriction.

**INTRODUCCIÓN**

Durante la respiración celular se producen continuamente especies reactivas derivadas del oxígeno como el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo (reactive oxygen species, ROS). Estas sustancias atacan continuamente a todos los tipos de macromoléculas biológicas. Aunque la producción de ROS puede aumentar mucho en varias situaciones patológicas, en el individuo sano hay una producción celular baja pero continua de ROS. La mayor parte de dicha producción procede de la cadena respiratoria mitocondrial. La idea de que los radicales libres de origen mitocondrial son una de las principales causas del envejecimiento (1) tiene cada vez más apoyos en la literatura científica (2, 3). Cualquier teoría del envejecimiento debe ser capaz de explicar tres de sus características principales: es progresivo, universal y endógeno. El ca-

rácter progresivo del envejecimiento significa que ocurre a lo largo de toda la vida del individuo, tanto joven como viejo, con una intensidad más o menos constante. Además, todos los individuos envejecen, y lo mismo puede decirse de prácticamente todas las especies animales multicelulares, especialmente de aquellas que, como la humana, dejan de crecer al alcanzar el desarrollo adulto. Por último, el origen del envejecimiento es interno, lo que explica que el envejecimiento continúe aunque se proteja al individuo de toda fuente de daño procedente del medio ambiente. Este carácter endógeno también explica porqué las distintas especies animales envejecen a velocidades enormemente diferentes aunque vivan en el mismo ambiente. Los factores externos no pueden ser causa del proceso intrínseco del envejecimiento. Esto significa que la velocidad del envejecimiento de cada especie animal, y por tanto su longevidad máxima, está determinada fundamentalmente por sus genes, no por el medio ambiente. La teoría del envejecimiento por radicales libres de origen mitocondrial encaja con esas tres características del envejecimiento, ya que las mitocondrias son una fuente endógena de radicales libres, y todas las células de los órganos vitales producen ROS de forma continua en sus mitocondrias.

## **ANTIOXIDANTES Y LONGEVIDAD**

Ante una producción continua de radicales libres, se necesitan mecanismos que minimicen el daño oxidativo. La producción de radicales libres en las células está contrarrestada, aunque solo parcialmente, por los antioxidantes endógenos celulares, para producir un equilibrio en el estrés oxidativo compatible con la viabilidad celular. La mayoría de los estudios sobre longevidad animal realizados inicialmente se centraron en los factores antioxidantes más que en los prooxidantes, ya que los primeros eran mucho más fáciles de medir. Una de las primeras hipótesis que se plantearon fue que el envejecimiento podría deberse a un descenso en los niveles de antioxidantes conforme el individuo envejece. Esta idea se descartó en cuanto se observó que las variaciones en las concentraciones de antioxidantes celulares en función de la edad no seguían un patrón uniforme, ya que disminuían, aumentaban, o no variaban en los animales viejos dependiendo del antioxidante medido, el órgano

estudiado, o la especie o cepa animal elegida (4). Otros autores propusieron sin embargo, basándose en algunos estudios comparados iniciales, que los antioxidantes eran factores determinantes de la longevidad (5). Esto se basaba en la observación de que algunos antioxidantes como la actividad de la CuZnSOD (superóxido dismutasa) correlacionaban positivamente con la longevidad máxima de los mamíferos, aunque esto sólo ocurría después de dividir dicha actividad por la tasa metabólica del animal (5). Puesto que los animales comparados por estos autores tenían tamaños corporales muy diferentes, y los animales grandes tienen tasas metabólicas específicas menores que los pequeños, las correlaciones positivas observadas con la longevidad máxima se debían al menor consumo de oxígeno por unidad de masa de los animales longevos, no a que tuviesen más CuZnSOD. De hecho, el trabajo original mostraba la ausencia de correlación entre la CuZnSOD y la longevidad máxima (5). Cuando los niveles de los distintos tipos de antioxidantes tisulares se relacionaron con la longevidad máxima sin realizar ningún tipo de transformación matemática, de los doce trabajos publicados realizados en siete laboratorios diferentes diez mostraron que las enzimas antioxidantes y los antioxidantes de bajo peso molecular correlacionan de forma negativa con la longevidad máxima (6), mientras que en los otros dos trabajos no se observó correlación (5, 7). Estas correlaciones negativas constituyen el indicio principal de que la intensidad de generación de radicales libres en los tejidos *in vivo* tiene que ser menor en las especies longevas que en las que muestran una mayor velocidad de envejecimiento.

Es importante también considerar los estudios experimentales acerca de los efectos sobre la longevidad de la manipulación de los antioxidantes tisulares a lo largo de todo el ciclo vital de los animales. De un total de dieciséis estudios de este tipo, realizados mediante suplementación de antioxidantes en la dieta, inducción farmacológica, o con técnicas transgénicas, en cuatro estudios aumentó ligeramente la longevidad máxima, mientras que en los doce restantes dicha longevidad no se modificó (3). Esta tendencia general a una ausencia de efecto de los antioxidantes sobre la velocidad del envejecimiento es más evidente en los vertebrados, en los que de un total de ocho estudios, sólo uno describió un aumento de un 12% en la longevidad máxima de los ratones, mientras que en los otros

siete trabajos no se encontraron efectos en ranas, ratones o ratas. De acuerdo con esto, se ha observado que la sobreexpresión de la CuZnSOD en un 50-300% en varios tejidos de ratones transgénicos da lugar a un fenotipo patológico en muchos órganos vitales con una longevidad máxima igual o incluso más corta que la de los controles y una mayor resistencia al estrés (8). En otro estudio la sobreexpresión de la CuZn SOD 4-13 veces por encima de lo normal en el ratón generó un amplio abanico de cambios neurodegenerativos incluyendo el hinchamiento y vacuolización de las mitocondrias neuronales, degeneración axónica y pérdida de motoneuronas espinales durante el envejecimiento (9). También se ha descrito en *Drosophila melanogaster* que la sobreexpresión de la glutathion reductasa aumenta la resistencia al estrés sin cambiar la longevidad máxima (10), mientras que en los ratones la sobreexpresión de la MnSOD aumenta la resistencia a la hiperoxia (11), pero la sobreexpresión de la CuZn SOD en el ratón no afecta a la longevidad (12). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió con la longevidad máxima, en los estudios arriba citados sí se encontró frecuentemente que la esperanza media de vida sube en los animales con niveles de antioxidantes tisulares aumentados. Esto sugiere que los antioxidantes pueden proteger de forma inespecífica contra muchas causas de muerte prematura, es decir que pueden aumentar la probabilidad de supervivencia, especialmente cuando los experimentos se realizan en condiciones subóptimas. Esto se debe, al menos en parte, a la capacidad de los antioxidantes para reaccionar con inducciones protectoras frente a los aumentos de estrés oxidativo de origen exógeno. Estos efectos protectores podrían tener gran importancia para evitar la muerte prematura en el hombre, especialmente en el caso de poblaciones que viven en condiciones ambientales subóptimas que dan lugar a curvas de supervivencia poco rectangulares. Sin embargo, la ausencia general de efecto de los antioxidantes sobre la longevidad máxima indica que no son capaces de disminuir la velocidad del envejecimiento.

También están de acuerdo con este concepto muchos experimentos realizados en animales knockout para genes que codifican enzimas antioxidantes. Así, la velocidad del envejecimiento no cambia en ratones homocigotos knockout para la CuZnSOD (13), la SOD extracelular (14), o la glutathion peroxidasa (15), o heterocigotos knockout

para la MnSOD (16). En estos casos, los efectos se limitan a una ausencia de efecto o a una sensibilidad mayor que la normal al estrés. En el caso de ratones homocigotos knockout para la MnSOD, la ausencia de la enzima produce un fenotipo fuertemente patológico, que da lugar a una cardiomiopatía dilatada y a la muerte a los pocos días de vida (17), y que es completamente distinto del proceso del envejecimiento. En resumen, todos los tipos de estudios realizados indican que los antioxidantes pueden incrementar la esperanza de vida en ciertas condiciones, pero no modifican la velocidad del envejecimiento ni la longevidad máxima.

### **GENERACIÓN MITOCONDRIAL DE RADICALES LIBRES, ADN MITOCONDRIAL Y LONGEVIDAD MÁXIMA**

Puesto que los antioxidantes no modifican la velocidad del envejecimiento, ¿cuáles son entonces los factores que establecen la conexión entre el estrés oxidativo y el envejecimiento? Los estudios disponibles apuntan ya a dos parámetros como responsables de dicha relación. El primer parámetro descubierto que correlaciona con la velocidad del envejecimiento en el sentido apropiado es la intensidad de generación mitocondrial de ROS. Todos los estudios realizados hasta la fecha han encontrado que la producción de ROS de las mitocondrias aisladas de tejidos post-mitóticos es menor en las especies animales longevas que en las de vida corta (3, 18, 19; Fig. 1). Esto es cierto en todo tipo de animales homeotermos longevos tanto si su tasa de consumo de oxígeno es lenta (como en los mamíferos de gran tamaño corporal), como si es rápida (como en las aves de pequeño tamaño). Esta observación clave puede explicar también porqué la correlación entre antioxidantes y longevidad máxima es negativa: los animales longevos tienen niveles bajos de antioxidantes simplemente porque su intensidad de producción de ROS por unidad de tiempo es pequeña.

Por otra parte, se ha encontrado que el daño oxidativo al ADN mitocondrial de corazón y cerebro, medido como 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxyguanosina (8-oxodG), correlaciona también negativamente con la longevidad máxima en los homeotermos (incluyendo a aves y mamíferos), mientras que esto no ocurre en el caso del ADN nu-

clear (20). Además, de acuerdo con datos preliminares de hígado de rata (21), estudios realizados en el corazón y el cerebro de once especies de mamíferos y aves ha demostrado que los niveles de daño oxidativo son varias veces mayores en el ADN mitocondrial que en el ADN nuclear (20) y pueden aumentar con la edad. Puesto que ahora se sabe que existen sistemas enzimáticos de reparación de la 8-oxodG no sólo en el núcleo, sino también en las mitocondrias, se ha sugerido que los aumentos en el daño oxidativo al ADN con la edad reflejan que el flujo de daño oxidativo (ataque y reparación) a través del ADN es mayor en los animales viejos que en los jóvenes (22). Análogamente, los resultados de las comparaciones entre especies también reflejan que dicho flujo es mayor en el ADN mitocondrial de los animales de ciclo vital corto que en el de los animales longevos, y lo mismo se puede decir del flujo de daño oxidativo a través del ADN mitocondrial comparado con el flujo a través del ADN nuclear en cada especie animal (20). Así pues, cuanto mayor es la longevidad máxima de una especie, menor es la intensidad de ataque oxidativo a su ADN mitocondrial (22). Sería esto relevante para el envejecimiento a pesar de la presencia de reparación de la 8-oxodG en las mitocondrias? Lo sería porque los ROS causan muchos tipos de daño en el ADN además de la formación de 8-oxodG, y varias de esas formas de daño no se reparan de forma eficiente y se acumulan con la edad. Así, la mayor producción mitocondrial de ROS de los animales de vida corta puede ser una causa importante de su velocidad mucho mayor de acumulación de mutaciones somáticas en el ADN mitocondrial (Fig. 1). Dicha acumulación necesita 70-100 años para ocurrir en el hombre, pero se da en sólo dos-tres años en el ratón. Además, puesto que la presencia de 8-oxodG en el ADN es mutagénica (23), el nivel más alto de 8-oxodG de los animales de vida corta en relación a los longevos también contribuiría a su mayor tasa de acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial. Los mayores niveles de 8-oxodG del ADN mitocondrial en relación al nuclear pueden explicar también la mayor intensidad de acumulación de mutaciones somáticas del primero. El resultado final es probablemente un aumento del número de células postmitóticas con función anormal conforme aumenta la edad del individuo.

## INSATURACIÓN DE LAS MEMBRANAS Y LONGEVIDAD

Además de la producción mitocondrial de ROS, se ha descubierto un segundo parámetro relacionado con el estrés oxidativo que también correlaciona con la longevidad máxima en el sentido adecuado: el grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares de los órganos vitales. Estudios iniciales que no trataban sobre longevidad encontraron que el número total de dobles enlaces de los ácidos grasos (el índice de dobles enlaces) correlacionaba negativamente con el tamaño corporal en los mamíferos (24). Luego se observó que las aves, que son mucho más longevas que los mamíferos, también tienen un menor índice de dobles enlaces que los mamíferos de igual tamaño corporal y tasa metabólica (25). Los ácidos grasos insaturados son las macromoléculas más sensibles al daño inducido por los radicales libres que existen en las células, debido a la presencia de electrones muy inestables junto a sus dobles enlaces. Además, su sensibilidad a la peroxidación lipídica aumenta exponencialmente conforme sube el número de dobles enlaces por molécula. Por lo tanto, el bajo índice de dobles enlaces del corazón, el músculo esquelético, el riñón y el hígado de los animales longevos (26) protegería a sus tejidos frente a la peroxidación lipídica de forma constitutiva tanto si tienen tasas metabólicas bajas (como los mamíferos de gran tamaño corporal) o altas (como las aves). Esto fue de hecho lo que se encontró cuando se estudió la intensidad de la peroxidación lipídica en estas especies (Fig. 1). La peroxidación lipídica no sólo es destructiva para los lípidos. Los productos de la peroxidación lipídica también pueden modificar covalentemente otros tipos de macromoléculas como las proteínas causando alteraciones en su estructura y función. De acuerdo con esto, se ha observado que los niveles de malondialdehído-lisina y carboximetil-lisina en proteínas mitocondriales cardíacas son menores en los mamíferos y aves longevos, que tienen también un bajo grado de insaturación de sus ácidos grasos, que en los que envejecen rápidamente (26). Este bajo grado de insaturación de los animales longevos no se debe a la dieta (un factor exógeno). Por el contrario, se trata de un parámetro regulado homeostáticamente a un nivel distinto en cada especie según cual sea su longevidad máxima (26). Por otra parte, los análisis detallados de la composición en ácidos grasos indican que la



causa principal del menor número de dobles enlaces de las especies longevas es la presencia de niveles bajos de actividad delta-5 y delta-6 desaturasa (26), que son limitantes para la biosíntesis de ácidos grasos muy insaturados de cadena larga como el ácido araquidónico (con cuatro dobles enlaces por molécula) y el ácido docosahexaenoico (con seis dobles enlaces) a partir de sus precursores menos insaturados. Estos resultados no se limitan a modelos comparados sino que también responden a la modificación experimental. Se ha observado recientemente que al aumentar experimentalmente el grado de insaturación de las membranas celulares se produce un aumento del daño oxidativo no sólo a lípidos sino también a proteínas y al ADN mitocondrial en cerebro de rata (27).

### **RESTRICCIÓN CALÓRICA Y ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL**

Los distintos niveles de producción mitocondrial de radicales libres y daño oxidativo al ADN mitocondrial en función de la longevidad de las distintas especies animales apoyan con fuerza la teoría del envejecimiento por radicales libres. Sin embargo las correlaciones, aunque coincidentes con las predicciones de la teoría, no implican necesariamente la existencia de relaciones causales entre los parámetros implicados. Por eso es interesante comprobar si dichos parámetros se modifican en el sentido adecuado cuando se altera experimentalmente la velocidad del envejecimiento. Tal alteración no es tarea fácil. Afortunadamente, existe una manipulación experimental que aumenta la longevidad máxima debido a una ralentización de la velocidad del envejecimiento: la restricción del número de calorías que el animal ingiere (28). El aumento de longevidad máxima inducido por la restricción calórica se ha demostrado innumerables veces en roedores de laboratorio, así como en otras especies incluyendo nematodos, rotíferos, insectos, arácnidos y peces, y actualmente se está estudiando si también ocurre en primates no humanos.

Muchos estudios recientes han investigado si el mecanismo de acción de la restricción calórica sobre la longevidad máxima incluye cambios en la producción mitocondrial de ROS y el daño sub-

siguiente al ADN mitocondrial (29). Estos estudios sobre la producción de ROS, que se han realizado tanto a corto como a largo plazo en el corazón de ratas jóvenes y viejas, aclaran si ocurren tales cambios, dónde ocurren dentro de la cadena respiratoria, y cual es el mecanismo que los genera (29). La restricción calórica a corto plazo (seis semanas) no cambió ninguno de los parámetros estudiados en el corazón. Sin embargo, la restricción calórica a largo plazo (un año) disminuyó casi a la mitad la producción mitocondrial de ROS (Fig. 1) e hizo descender también el daño oxidativo al ADN mitocondrial sin modificar dicho daño en el ADN nuclear en el corazón de ratas viejas (29). Se han encontrado también descensos en la generación mitocondrial de ROS tras la restricción calórica en el hígado a corto y largo plazo (30, 31) y el músculo esquelético a largo plazo (32) pero no en el riñón a corto plazo (33). Estudios recientes de otros autores han confirmado el descenso generalizado de producción mitocondrial de ROS en la restricción calórica en los tejidos de los mamíferos (34-36). Por otra parte, hemos observado que la restricción protéica sin restricción calórica intensa también hace descender la producción de ROS en el hígado a corto plazo (37). En cambio, la restricción calórica no cambia de forma coherente ni la actividad (38) ni la expresión génica (39) de las enzimas antioxidantes SOD, catalasa o glutathion peroxidasa. El descenso en el ataque por ROS y en los niveles de 8-oxodG en el ADN mitocondrial en la restricción calórica indica que el flujo del daño oxidativo (ataque y reparación) a través de éste ADN debe ser menor, como en el caso de los animales longevos respecto a los de vida corta, en los animales restringidos que en los alimentados *ad libitum* (22, 29). De hecho, se ha observado que la restricción calórica disminuye la expresión de varios genes que codifican para sistemas de reparación del ADN (40-42). Otro aspecto importante es que el efecto de la restricción calórica no consiste fundamentalmente, como se había sugerido inicialmente (38), en evitar un aumento de producción mitocondrial de ROS en el animal viejo, sino en disminuir dicha producción por debajo de los niveles basales de los animales, tanto jóvenes como viejos (29). Este tipo de cambio es el que cabría esperar si la restricción calórica disminuye la velocidad del envejecimiento a través de una reducción en la producción mitocondrial de ROS.

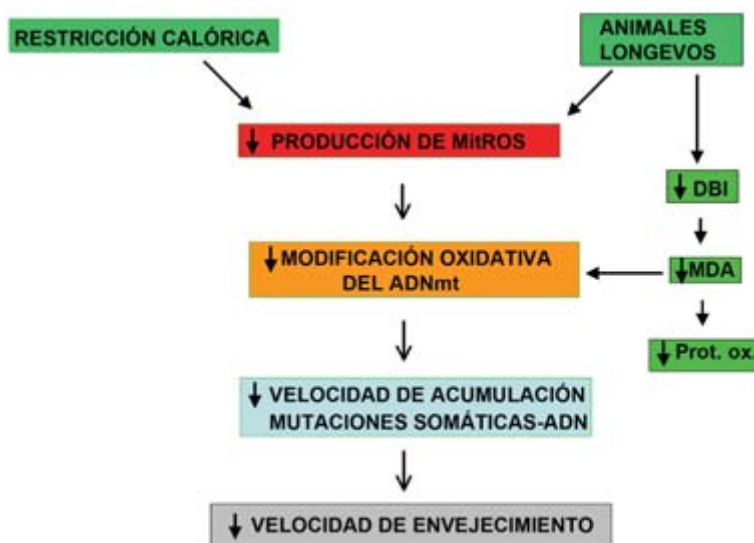


FIGURA 1. Tanto las especies animales longevas como los mamíferos sometidos a restricción calórica comparten una característica común: tienen una producción lenta de ROS en sus mitocondrias. En relación con ello, el daño oxidativo al ADN mitocondrial (ADNmt) es menor, se acumulan más despacio las mutaciones somáticas en el ADN y la velocidad del envejecimiento es más lenta. Además de esto, las membranas celulares de las especies longevas tienen un grado menor de insaturación de sus ácidos grasos (menor DBI; DBI = índice de dobles enlaces), lo que las hace más resistentes al ataque oxidativo y además disminuye el daño oxidativo secundario tanto en proteínas (Prot. ox.) como en el ADNmt. MDA = malondialdehído; MitROS = ROS mitocondriales.

Si la velocidad del envejecimiento está controlada en parte por la producción mitocondrial de radicales libres, es muy importante aclarar cual es el sitio de producción implicado dentro de la cadena respiratoria mitocondrial. Se sabe por estudios anteriores que, en el caso de las mitocondrias cardiacas, la producción de ROS ocurre tanto en el complejo I como en el complejo III. Sin embargo, de esos dos complejos, sólo el complejo I está implicado en el descenso de producción de radicales libres que ocurre en la restricción calórica, ya que dicho descenso ocurre cuando se utilizan piruvato/malato como sustratos pero no cuando los electrones se introducen en la cadena respiratoria utilizando succinato en presencia de rotenona (29). También se ha aclarado otro aspecto importante, el meca-

nismo de dicho descenso, que no consiste en una simple disminución del consumo de oxígeno, ya que éste se mantiene inalterado en las mitocondrias de los animales restringidos. Lo que ocurre es que desciende la fuga de radicales libres (el porcentaje del total de electrones que fluye por la cadena que da lugar a ROS en vez de reducirse totalmente a agua en la citocromo oxidasa). Esto está relacionado con grado de reducción electrónica del generador de ROS del complejo I, ya que la diferencia entre animales restringidos y controles se da cuando dicho grado de reducción es parcial pero no cuando es total (29). Se han encontrado resultados similares a los anteriores en mitocondrias hepáticas, con la diferencia de que los cambios se producen antes en este órgano, siendo ya detectables a las seis semanas de restricción (30). Estudios recientes en corazón de rata indican que la restricción calórica también disminuye los niveles de modificación oxidativa de las proteínas mitocondriales (43).

## CONCLUSIONES

La información disponible sugiere que la relación entre el estrés oxidativo y la longevidad animal se debe en gran medida a la menor producción mitocondrial de radicales de oxígeno de las especies longevas. Esto se complementa con una menor sensibilidad a la peroxidación lipídica en los animales longevos, debida al menor grado de insaturación de los ácidos grasos de sus membranas celulares. Es llamativo que la producción mitocondrial de ROS y el daño oxidativo al ADN mitocondrial estén disminuidos tanto en los animales longevos como en los restringidos. Esto sugiere que la disminución de la intensidad de generación de radicales de oxígeno en el complejo I es un mecanismo evolutivo muy conservado que se utiliza para disminuir la velocidad del envejecimiento y para aumentar la longevidad máxima.

## AGRADECIMIENTOS

Los estudios descritos en este trabajo han sido subvencionados en parte por los proyectos SAF2002-01635 y BFU2005-02584 del Ministerio de Educación y Ciencia.

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) HARMAN, D. (2003): The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 5: 557-561.
- (2) BARGER, J. L.; WALFORD, R. L. y WEINDRUCH, R. (2003): The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era. *Exper Gerontol.* 38: 1343-1351.
- (3) BARJA, G. (2004): Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biological Rev.* 79: 235-251.
- (4) BARJA DE QUIROGA, G.; LÓPEZ-TORRES, M. y PÉREZ-CAMPO, R. (1992): Relationship between antioxidants, lipid peroxidation and aging. en: *Free Radicals and Aging* (Emerit, I. y Chance, B., Eds.), pp. 109-123. Birkhäuser, Basel.
- (5) TOLMASOFF, J. M.; ONO, T. y CUTLER, R. G. (1980): Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *PNAS USA* 77: 2777-2781.
- (6) PÉREZ-CAMPO, R.; LÓPEZ-TORRES, M.; CADENAS, S.; ROJAS, C. y BARJA, G. (1998): The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B*, 168: 149-158.
- (7) SOHAL, R. S.; SOHAL, B. H. y BRUNK, U. T. (1990): Relationship between antioxidant defenses and longevity. *Mech. Ageing Dev.* 53: 217-227.
- (8) HUANG, T. T.; CARLSON, E. J.; GILLESPIE, A. M.; SHI, Y. y EPSTEIN, C. J. (2000): Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *J. Gerontol.* 55A: B5-B9.
- (9) JAARSMA, D.; HAASDIJK, E. D.; GRASHORN, J. A. C.; HAWKINS, R.; VAN DUIJN, W.; VERSPAGET, H. W.; LONDON, J. y HOLSTEGE, J. C. (2000): Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1): overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol. Disease* 7: 623-643.
- (10) MOCKETT, R. J.; SOHAL, R. S. y ORR W. C. (1999): Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not in normoxia. *FASEB J* 13: 1733-1742.
- (11) WISPE, J. R.; WARNER, B. B.; CLARCK, J. C.; DEY, C. R.; NEUMAN, J.; GLASSER, S. W.; CRAPO, J. D.; CHANG, L. Y. y WHITSETT, J. A. (1992): Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J. Biol. Chem.* 267: 23937-23941.
- (12) HUANG, T. T.; CARLSON, E. J., GILLESPIE, A. M.; SHI, Y. y EPSTEIN, C. J. (2000): Ubiquitous overexpression of Cu,Zn superoxide dismutase does not extend life in mice. *J. Gerontol.* 55A: B5-B9.
- (13) HO, Y. S.; GARGANO, M.; CAO, J.; BRONSON, R. T.; HEIMLER, I. y HUTZ, R. J. (1998): Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 273: 7765-7769.
- (14) CARLSSON, L. M.; JONSSON, J.; EDLUND, T. y MARKLUND, S. L. (1995): Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *PNAS USA* 92: 6264-6268.

- (15) REDDY, V. N.; GIBLIN, F. J.; LIN, L. R.; DANG, L.; UNAKAR, N. J.; MUSCH, D. C.; BOYLE, D. L.; TAKEMOTO, L. J.; HO, Y. S.; KNOERNSCHILD, T.; JUENEMANN, A. y LUTJEN-DRECOLL, E. (2001): Glutathione peroxidase-1 deficiency leads to increased nuclear light scattering, membrane damage, and cataract formation in gene-knockout mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 3247-3255.
- (16) TSAN, M. F.; WHITE, J. E.; CASKA, B.; EPSTEIN, C. J.; LEE, C. Y. (1998): Susceptibility of heterozygous MnSOD gene-knockout mice to oxygen toxicity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 114-120.
- (17) MELOV, S.; COSKUN, P.; PATEL, M.; TUINSTRAN, R.; COTTRELL, B.; JUN, A. S.; ZASTAWNY, T. H.; DIZDAROGU, M.; GOODMAN, S. I.; HANG, T. T.; MIZIORKO, H.; EPSTEIN, C. J. y WALLACE, D. C. (1999): Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *PNAS USA* 96: 846-851.
- (18) KU, H. H.; BRUNK, U. T. y SOHAL, R. S. (1993): Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad. Biol. Med.* 15: 621-627.
- (19) BARJA G. (2004): Free radicals and aging. *Trends Neuroscience*, 27: 595-600.
- (20) BARJA, G. y HERRERO, A. (2000): Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.* 14: 312-318.
- (21) RICHTER, CH.; PARK, J. W. y AMES, B. N. (1988): Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *PNAS USA* 85: 6465-6467.
- (22) BARJA, G. (2000): The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging Clin. Exper. Res.* 12: 342-355.
- (23) KIM, S. R.; MATSUI, K.; YAMADA, M.; KOHNO, T.; KASAI, H.; YOKOTA, J. y NOHMI, T. (2004): Suppression of chemically induced and spontaneously occurring oxidative mutagenesis by three alleles of human OGG1 gene encoding 8-hydroxyguanine DNA glycosylase. *Mutat. Res.* 554: 365-374.
- (24) COUTURE, P. y HULBERT, A. J. (1995): Membrane fatty acid composition of tissues is related to body mass of mammals. *J. Membr. Biol.* 148: 27-39.
- (25) PAMPLONA, R.; PRAT, J.; CADENAS, S.; ROJAS, C.; PÉREZ-CAMPO, R.; LÓPEZ-TORRES, M. y BARJA, G. (1996): Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from longevous species: the pigeon and human case. *Mech. Ageing Dev.* 86: 53-66.
- (26) PAMPLONA, R.; BARJA, G. y PORTERO-OTÍN, M. (2002): Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span. A homeoviscous-longevity adaptation? *Ann New York Acad. Sci.* 959: 475-490.
- (27) PAMPLONA, R.; PORTERO-OTÍN, M.; SANZ, A.; REQUENA, J. y BARJA, G. (2004): Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Exper Gerontol.* 39: 725-733.
- (28) LEE, C. K.; PUGH, T. D.; KLOPP, R. G.; EDWARDS, J.; ALLISON, D. B., WEINDRUCH, R. y PROLLA, T. A. (2004): The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme Q10 and caloric restriction on life span and gene expression patterns in mice. *Free Rad. Biol. Med.* 36: 1043-1057.
- (29) GREDILLA, R.; SANZ, A.; LÓPEZ-TORRES, M. and BARJA, G. (2001): Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers

- oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J.* 15: 1589-1591.
- (30) GREDILLA R.; BARJA, G. y LÓPEZ-TORRES, M. (2001): Effect of short-term caloric restriction on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria, and location of the free radical source. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33: 279-287.
- (31) LÓPEZ-TORRES, M.; GREDILLA, R.; SANZ, A. y BARJA, G. (2002): Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Rad. Biol. Med.* 32: 882-889.
- (32) DREW, B.; PHANEUF, S.; DIRKS, A.; SELMAN, C.; GREDILLA, R.; LEZZA, A.; BARJA, G. y LEEUWENBURGH, C. (2003): Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Amer J. Physiol.* 284: R474-R480.
- (33) GREDILLA, R.; PHANEUF, S.; SELMAN, C.; KENDIAIAH, S.; LEEUWENBURGH, C. y BARJA G. (2004): Short-term caloric restriction and sites of oxygen radical generation in kidney and skeletal muscle mitochondria. *Ann. New York Acad. Sci.* 1019: 333-342.
- (34) RAMSEY, J. J.; HAGOPIAN, K.; KENNY, T. M.; KOOMSON, E. K.; BEVILACQUA, L.; WEINDRUCH, R. y HARPER, M. E. (2004): Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats. *Am. J. Physiol.* 286: E31-E40.
- (35) BEVILACQUA, L.; RAMSEY, J. J.; HAGOPIAN, K.; WEINDRUCH, R. y HARPER, M. E. (2004): Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am. J. Physiol.* 286: E852-E861.
- (36) JUDGE, S.; JUDGE, A.; GRUNE, T. y LEEUWENBURGH C. (2004): Short-term CR decreases cardiac mitochondrial oxidant production but increases carbonyl content. *Am. J. Physiol.* 286: R254-R259.
- (37) SANZ, A.; CARO, P. y BARJA, G. (2004): Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36: 545-552.
- (38) SOHAL, R. S.; KU, H. H.; AGARWAL, S.; FORSTER, M. J. y LAL, H. (1994): Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction. *Mech. Ageing Dev.* 74: 121-133.
- (39) WEINDRUCH, R.; KAYO, T.; LEE, C. L. y PROLLA, T. A. (2001): Microfile profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *J. Nutr.* 131: 918S-923S.
- (40) FORNACE, A. J. JR.; ZMUDKA, B.; HOLLANDER, M. C. y WILSON, S. H. (1989): Induction of  $\beta$ -polymerase mRNA by DNA-damaging agents in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* 9: 851-853.
- (41) PAYNE, A. y CHU, G. (1994): Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage. *Mut. Res.* 310: 89-102.
- (42) PETRINI, J. H. (1999): The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular damage response. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 1264-1269.

- (43) PAMPLONA, R.; PORTERO-OTÍN, M.; BELLMUNT, M. J; GREDILLA, R. y BARJA G. (2002): Aging increases N<sup>ε</sup>-(Carboxymethyl)lysine and caloric restriction decreases N<sup>ε</sup>-(Carboxyethyl)lysine and N<sup>ε</sup>-(Malondialdehyde)lysine in rat heart mitochondrial proteins. *Free Rad. Res.* 36: 47-54.