

Universidad de Granada
Instituto de Biotecnología
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología



**BENEFICIO DEL TRATAMIENTO
CRÓNICO CON MELATONINA
FRENTE AL DAÑO OXIDATIVO/NITROSATIVO
MITOCONDRIAL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO
EN RATONES CON SENESCENCIA ACELERADA**



RED G03/137

M^a ISABEL RODRÍGUEZ LARA

Granada, 2007

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Isabel Rodríguez Lara
D.L.: Gr. 70- 2007
ISBN: 978-84-338-4223-7

D. DARÍO ACUÑA-CASTROVIEJO, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE **D^a. M^a ISABEL RODRÍGUEZ LARA**, Licenciada en Ciencias Químicas, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **“Beneficio del tratamiento crónico con melatonina frente al daño oxidativo/nitrosativo mitocondrial durante el envejecimiento en ratones con senescencia acelerada”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 11 de Enero, de 2007

V^o B^o Director

La interesada

Darío Acuña-Castroviejo

M^a Isabel Rodríguez Lara

Dra. GERMAINE ESCAMES ROSA, profesora contratada doctora del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE **D^a. M^a ISABEL RODRÍGUEZ LARA**, Licenciada en Ciencias Químicas, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **“Beneficio del tratamiento crónico con melatonina frente al daño oxidativo/nitrosativo mitocondrial durante el envejecimiento en ratones con senescencia acelerada”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 11 de Enero, de 2007

V^o B^o Director

La interesada

Germaine Escames Rosa

M^a Isabel Rodríguez Lara

A la memoria de mi abuela

María Aranda Jiménez

A mis padres

“No puede haber cosa más alegre y feliz que la vejez pertrechada con los estudios y experiencias de la juventud”.

Cicerón

“Muy pronto en la vida es demasiado tarde”.

Marguerite Duras

AGRADECIMIENTOS

Después de este tiempo de trabajo en el laboratorio llega el momento de culminar los resultados obtenidos con la escritura de la tesis. También es el momento de agradecerle a toda la gente, que directa o indirectamente, me han ayudado durante este tiempo en la realización de este trabajo. Por eso, en primer lugar me gustaría dar las gracias al Dr. Darío Acuña-Castroviejo por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral bajo su dirección y depositar su confianza en mí, contribuyendo enormemente a terminar de despertar en mí el entusiasmo por la ciencia. Gracias por compartir conmigo ese cúmulo de conocimientos que posee y por el apoyo prestado en todo este tiempo.

A la profesora Germaine Escames por su predisposición permanente para brindarme ayuda en todo momento, así como por compartir conmigo generosamente su experiencia y valores vitales. De todo corazón, muchas gracias.

No me puedo olvidar de mis compañeros: María, Ana, Carmen, Jose Antonio, Víctor, Francis, Carlos y Mariam, con los cuales he compartido muchas horas de trabajo, pero también muchos momentos de alegrías. Gracias por todo vuestro apoyo, por vuestro cariño y comprensión a lo largo de este camino.

A todos mis amigos, especialmente a Toñi, Miguel Ángel, M^a José, Belén, Amor Belén, Miguel por haberme demostrado siempre su cariño y haberme ayudado siempre que os necesito, así como por aguantarme tanto en los buenos como en los malos momentos.

A Antonia Peinado, por todas las palabras de ánimo que he recibido durante este tiempo.

A mi mejor amigo, a Carlos, la persona más franca y noble que conozco. Gracias por todo tu apoyo, tu amor, ánimos y ese saber escuchar. Gracias por estar ahí. Tampoco quiero olvidarme de tu familia, tus padres; José y Magda; y de tu hermano, Noé, otra familia más para mí.

Pero todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mis padres, Tomás y Mari, unos lucheros natos, por haberme inculcado unos valores basados en el respeto, amor, trabajo y constancia, tan necesarios para cualquier aspecto de la vida. Gracias por darme tanto ánimo y comprensión en todo momento, gracias por ser así. No puedo olvidarme de mis abuelos y mi Javi, que aunque ya no están aquí sé que me cuidan y ayudan en todo momento y seguro que estarían orgullosos de mí, al igual que yo de ellos.

Finalmente, agradezco a la Fundación Hospital Clínico por el soporte institucional que han prestado a la realización y difusión de este estudio.

A TOD@S GRACIAS

Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo gracias a la financiación de las siguientes instituciones y proyectos de investigación:

A. Beca predoctoral:

Beca de investigación

Entidad financiadora: Red G03/ 137; Instituto de Salud Carlos III

Duración: 2004-2005

Beca de investigación

Entidad financiadora: PI05-0107; Instituto de Salud Carlos III

Duración: 2006

B. Proyectos de Investigación:

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO-RED DEL ISCIII: Bases moleculares y celulares del daño oxidativo en el envejecimiento.

Investigador Principal: Darío Acuña Castroviejo

Referencia: G03/137

Duración 2002-2006

PAI (JUNTA DE ANDALUCÍA): Mecanismos de acción de la melatonina.

Investigador Principal: Darío Acuña Castroviejo

Referencia: CTS-101

Duración 2004-2004

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS

- 1.- Rodríguez MI, Carretero M, Escames G, López LC, Maldonado MD, Tan Dun-Xian, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D (2006) Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic Res.*, 41: 15-24.

- 2.- Rodríguez MI, Escames G, López LC, López Ana, Ortiz Francisco, Acuña-Castroviejo D (2006) Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.*, Doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00416.x

3. - Rodríguez MI, Escames G, López LC, García JA, Ortiz F, López A, Acuña-Castroviejo D (2006) Mitochondrial oxidative damage during aging in senescence accelerated mice: Efficacy of chronic melatonin administration. *Mech Ageing Dev.* (En prensa).

- 4.- Rodríguez MI, López LC, Escames G, López A, García JA, Ortiz F, Acuña-Castroviejo D (2007) Age-dependent changes in mitochondrial redox status in senescence-accelerated mice are counteracted by chronic melatonin administration. *Exp Gerontol.* (Enviado).

- 5.- Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Camins A, Payas M (2005) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev.*, 126: 1300-4.

- 6.- Tomás-Zapico C, Alvarez-García O, Sierra V, Vega-Naredo I, Caballero B, Garcia JJ, Acuña-Castroviejo D, Rodríguez MI, Tolivia D, Rodríguez-Colunga MJ, Coto-Montes A (2006) Oxidative damage in the livers of senescence accelerated mice: a gender-related response. *Can J Physiol Pharmacol.*, 84: 213-20.

- 7.- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Rodríguez MI, López LC (2007) Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci.*, 12: 947-63.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

1. M^a Isabel Rodríguez, Pilar Utrilla, Víctor Tapias, Miguel Carretero, Marcos Ruíz, Germaine Escames, Carlos Arana, Darío Acuña-Castroviejo. XXXIII Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences, sponsored symposia with the physiological society (UK and Eire) and the duth society of physiology. J. Physiol. Biochem. 61 (1): 221. Sevilla, 10-13 de Febrero de 2005.
2. Anna María Canudas, Javier Gutierrez-Cuesta, M^a Isabel Rodríguez, Darío Acuña-Castroviejo, Antoni Camins and Mercè Payas. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). XXXIII Congress of the Spanish Society of the Physiological Sciences, sponsored symposia with the physiological society (UK and Eire) and the duth society of physiology. J. Physiol. Biochem 61 (1): 163. Sevilla, 10-13 de Febrero de 2005.
3. M^a Isabel Rodriguez. Prevención del daño mitocondrial del envejecimiento por tratamiento crónico con melatonina. 2^a Reunión Nacional SEMEG. Madrid, 25-27 de Octubre de 2006 (Comunicación oral).

— *Abreviaturas* —

8-oxo-dG: 8-hidroxiideoxiguanosina

AFMK: N¹-acetil-N²-formil-5-

metoxikinuramina

AMK: N-acetil-5-metoxikinurenamina

aMT: melatonina

CAT: catalasa

COX-2: ciclooxigenasa-2

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

ETC: cadena de transporte electrónico

G-6-PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GM-CSF: factor estimulante de colonias de
granulocitos

GPx: glutatión peroxidasa

GRd: glutatión reductasa

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HO[•]: radical hidroxilo

HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa

IL: interleuquina

INF-γ: interferón gamma

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

mtDNA: DNA mitocondrial

mtNOS: óxido nítrico sintasa mitocondrial

NAT: N-acetiltransferasa

nDNA: DNA nuclear

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal

NO[•]: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

O₂^{•-}: anión superóxido

HO[•]: radical hidroxilo

ONOO⁻: peroxinitritos

ROS: especies reactivas de oxígeno

RL: radicales libres

RNA: ácidos ribonucleicos

RNS: especies reactivas de nitrógeno

SOD: superóxido dismutasa

TNF-α: factor de necrosis tumoral

— *Índice* —

INTRODUCCIÓN **1**

1.-	ENVEJECIMIENTO	1
1.1.-	Teoría de los Radicales Libres: Harman, 1956.....	4
1.2.-	Teoría Mitocondrial: Miquel y cols., 1975.....	8
1.2.1.-	DNA mitocondrial y envejecimiento.....	9
1.2.2.-	Alteraciones y mecanismos de reparación mitocondriales.....	10
1.2.3.-	Alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial con la edad.....	12
1.2.4.-	Alteraciones estructurales mitocondriales asociadas con la edad.....	13
1.3.-	Teoría Inflamatoria: Chung y cols., 2001.....	14
1.3.1.-	Factores activadores de la inflamación.....	18
1.3.2.-	Factores inhibidores de la inflamación.....	21
2.-	MELATONINA	22
2.1.-	Metabolismo de la melatonina.....	22
2.1.1.-	Biosíntesis de la melatonina.....	22
2.1.2.-	Metabolismo de la melatonina.....	24
2.2.-	Mecanismos de protección de la melatonina.....	27
2.3.-	Melatonina y mitocondria.....	30
2.4.-	Melatonina y envejecimiento.....	33

OBJETIVOS **37**

METODOLOGIA **41**

RESULTADOS **47**

1.-	EFFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL EN RATONES SAMP8 Y SAMR1 HEMBRAS	47
1.1.-	Diafragma.....	47
1.2.-	Corazón.....	53
1.3.-	Estudio comparativo de los resultados obtenidos en mitocondrias de corazón y diafragma.....	65
2.-	RESPUESTA INFLAMATORIA PRODUCIDA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO EN RATONES MACHOS Y HEMBRAS SAMR1 Y SAMP8	69

DISCUSION **81**

**1.- EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA BIOENERGÉTICA
MITOCONDRIAL EN RATONES SAMP8 Y SAMR1 HEMBRAS** **82**

1.1.- Diafragma..... 82

1.2.- Corazón..... 86

1.3.- Estudio comparativo de los resultados obtenidos en mitocondrias de corazón y
diafragma.....89

**2.- RESPUESTA INFLAMATORIA PRODUCIDA DURANTE EL
ENVEJECIMIENTO EN RATONES MACHOS Y HEMBRAS SAMR1 Y SAMP8** **91**

3.- COMENTARIOS FINALES **93**

CONCLUSIONES **97**

BIBLIOGRAFÍA **101**

— *Introducción* —

1.- ENVEJECIMIENTO

Con más del 20% de la población mayor de 60 años, Europa Occidental y Japón conforman el conjunto de países más envejecidos del planeta. No obstante, en proporción, los países en vías de desarrollo tampoco se están rejuveneciendo, ya que la disminución de las tasas de natalidad y el aumento de la longevidad están cambiando la composición de sus sociedades, invirtiéndose la pirámide de edad. La proporción de ancianos, es decir, aquellas personas de más de 60 años, se duplicará antes de llegar a 2030, pero ya dentro de 10 años se calcula que la longevidad, que actualmente en Europa está en torno a los 75 años, pasará a los 85 años. En la actualidad, un 45% de los mayores de 65 años requieren de asistencia, y esta proporción aumenta conforme se eleva la longevidad.

Estos cambios demográficos están obligando a los países a pensar en las medidas de protección social y financiera necesarias para enfrentar el tema del aumento de la población anciana.

Para intentar contrarrestar el que será un exagerado gasto sanitario, que incidirá negativamente en el llamado Estado del Bienestar, es necesario poner en marcha medidas como la investigación que, conociendo los fenómenos que inducen el envejecimiento, puedan dar lugar a la puesta en marcha de medidas preventivas que mejoren la calidad de vida de esas personas mayores, lo que redundará en una menor necesidad de asistencia sanitaria y, por tanto, de gasto sanitario.

Este proceso de envejecimiento se puede definir como un proceso multifactorial que incluye pérdida celular progresiva, déficit endocrinos y metabólicos, disminución de las defensas y pérdida funcional que incrementa el riesgo de muerte. Estos cambios serían responsables tanto del envejecimiento fisiológico como de enfermedades degenerativas asociadas con la edad como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, etc.

El proceso degenerativo universal, denominado envejecimiento, ha sido y es uno de los objetivos más importantes en la investigación científica, no sólo por tratar de conocer sus causas, sino también por intentar proponer medios no tanto para retrasar su evolución como para prevenir el déficit y las patologías asociadas al mismo. En la actualidad, sin embargo, únicamente se dispone de teorías, más o menos basadas en datos empíricos. Dichas teorías establecen que el envejecimiento es el resultado de una acumulación progresiva de defectos

celulares como consecuencia de la pérdida de los sistemas defensivos necesarios [Kowald y cols., 1996].

Se han propuesto muchas teorías y clasificaciones para explicar el proceso de envejecimiento [Warner y cols., 1987; Medvedev, 1990], que podemos clasificar en dos grupos:

➤ **Teorías estocásticas**, que engloban una serie de variables aleatorias, por lo que este fenómeno será producto del azar y será estudiado mediante cálculos probabilísticos. Así encontramos:

- Teorías genéticas como la teoría de la regulación genética, la teoría de la diferenciación terminal y la de la inestabilidad del genoma, que confieren al entorno celular el papel de ser el responsable de todos los daños provocados al azar en el DNA.

- Teoría de la mutación somática propuesta por Szilard en 1959. Predice que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de mutaciones en el nDNA de las células somáticas.

- Teoría de los radicales libres propuesta por Harman en 1956. Postula que el envejecimiento resulta de los efectos perjudiciales fortuitos causados a tejidos por reacciones de radicales libres.

- Teoría error-catástrofe propuesta por Orgel en 1963 y modificada por él mismo en 1970. Esta hipótesis postula que, con la edad, surgen errores en los mecanismos de síntesis de proteínas, que causan la producción de proteínas anormales. Si alguna de estas proteínas llega a formar parte de la maquinaria que sintetiza proteínas, causarían incluso más errores en próxima generación de proteínas y así sucesivamente, hasta llegar a una pérdida “catastrófica” de la homeostasis celular que conduce a la muerte celular.

- Teoría de las uniones cruzadas de estructuras celulares. Postula que la formación de enlaces moleculares entre proteínas o cadenas de ácidos nucleicos, aumenta con la edad.

- Teoría de la acumulación de productos de desecho. Sheldrake en 1974 propuso que “el envejecimiento celular se puede explicar en términos de la acumulación de la ruptura de productos citoplasmáticos, algunos de los cuales pueden ser perjudiciales para la

célula". Para evitar la mortalidad inevitable, las células tendrían que seguir creciendo y dividiéndose, diluyendo la ruptura acumulada de productos.

- Teoría inmunológica. Esta teoría postula que el genoma nuclear, actuando como un "reloj molecular" o "reloj celular", es el responsable de programar los cambios que se irán presentando en el desarrollo de un organismo a lo largo de su vida.

➤ **Teorías deterministas**, que sugieren que una serie de procesos del envejecimiento están programados innatamente dentro del genoma de cada organismo. Así encontramos:

- Teoría de la capacidad replicativa finita de las células. Inicialmente se pensó que las células humanas capaces de proliferar en el organismo, se replicarían indefinidamente en los cultivos celulares. Más tarde, Martín y cols., en 1970 demostraron que la capacidad de duplicarse éstas, desciende progresivamente con la edad del donante. El telómero podría ser el reloj que determina la pérdida de la capacidad proliferativa de las células.

- Teorías evolutivas. Se clasifican en 3 teorías, donde la 1ª postula que la senescencia es una adaptación necesaria, programada como desarrollo. La 2ª propone que las mutaciones perjudiciales que se activan tarde son las responsables del envejecimiento. Por último, la 3ª sugiera que la senescencia es el resultado de un desajuste entre la supervivencia tardía y la fecundidad temprana.

Pero quizás la hipótesis del envejecimiento más importante en el momento actual, es la del estrés oxidativo, en la que se afirma que las sustancias reactivas derivadas del oxígeno (O₂), producidas por el metabolismo aerobio celular, originarían daño oxidativo progresivo en toda la célula, induciendo su degeneración y muerte [Rajindar y cols., 1996; Shigenaga y cols., 1994].

Relacionada con esta, otra teoría es la que implica a la principal fuente energética celular, la mitocondria. Fruto de la intensa investigación realizada en la última década, se ha puesto de manifiesto la existencia de numerosas alteraciones estructurales, funcionales y genéticas de esta organela asociadas con el envejecimiento [Shigenaga y cols., 1994; Schapira y cols., 1992; Muller y cols., 1992], por lo que se postula que la lesión mitocondrial crónica provocaría la degeneración celular con el tiempo.

1.1.- Teoría de los Radicales Libres: Harman, 1956

Harman en 1956 propuso que durante la respiración aeróbica se generan y acumulan radicales libres y se produce un estrés oxidativo que daña estructuras celulares, lo cual conduce a la muerte celular. Estos radicales libres ocasionan la destrucción de las macromoléculas de la célula (ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y proteínas), induciendo una disminución en la resistencia al ambiente y un incremento en la fragilidad celular.

Los radicales libres son resultado de los procesos fisiológicos propios del organismo, como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio, o bien son generados por factores ambientales como la contaminación industrial, el tabaco, la radiación, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y los pesticidas. Se trata de especies químicas neutras o cargadas cuyo orbital más externo contiene uno o más electrones desapareados. Debido a esto, la molécula es extremadamente reactiva ya que tiende a captar (radicales oxidantes, como el HO^\bullet) o donar (radicales reductores, como el COO^\bullet) un electrón de o hacia las moléculas adyacentes causándoles severos daños oxidativos. Los radicales libres son generados y utilizados por células como los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos, los eosinófilos y los fibroblastos para eliminar organismos extraños como bacterias y virus. El incremento de estos radicales conduce a un deterioro celular que se refleja de manera muy pronunciada durante el envejecimiento.

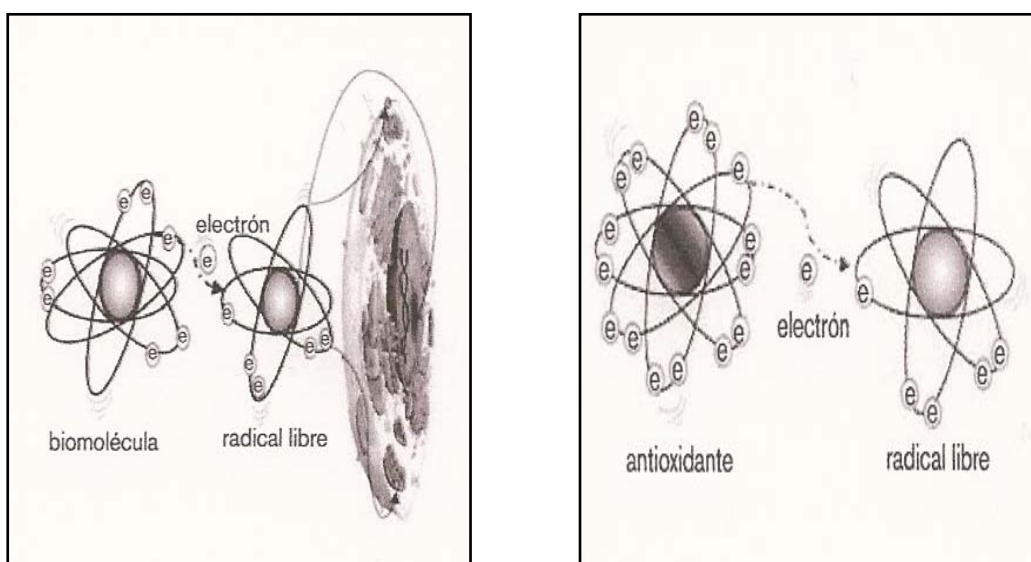


Figura 1. Interacción de radicales libres con biomoléculas (A) ó con antioxidantes (B)

Nos vamos a centrar en las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) debido a su especial formación e interés en la mitocondria. Dentro de las ROS encontramos el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), que se forman a partir de la siguiente reacción:

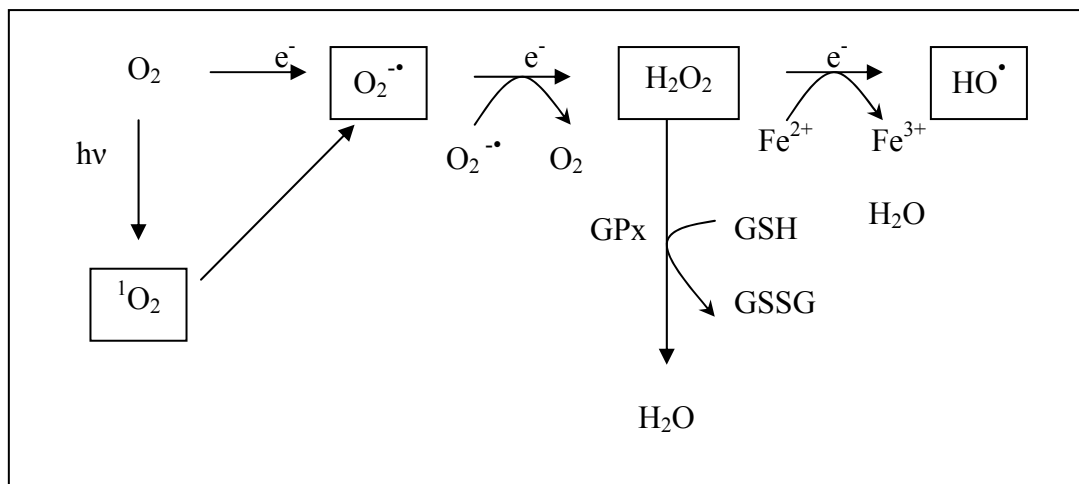


Figura 2. Generación ROS

Así, además de las ROS descritas por Harman, encontramos las RNS, entre las que se encuentra el óxido nítrico (NO^{\cdot}) un radical libre gaseoso importante mediador en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Este NO^{\cdot} podría funcionar como un donador de electrones (oxidante) ó como un aceptor de electrones (antioxidante) y se forma a partir de la siguiente reacción:

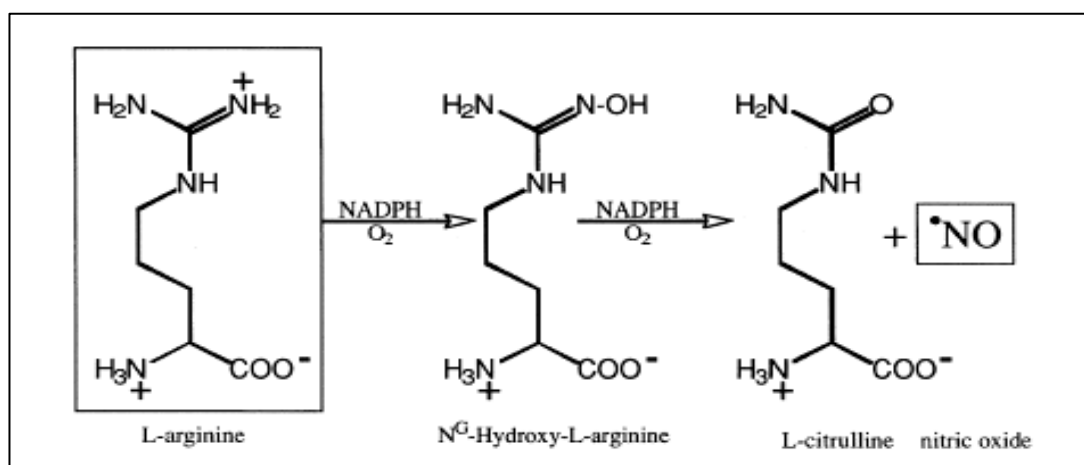


Figura 3. Síntesis de NO^{\cdot} catalizada por la NOS

Este NO^\bullet es poco reactivo y no puede nitrar proteínas irreversiblemente, pero puede reaccionar con otros reactivos intermedios que pueden afectar la función de proteínas y las del organismo entero; como la reacción entre NO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$, donde se forman peroxinitritos (ONOO^-) que son potentes oxidantes.

El NO^\bullet se produce dentro de las células por la acción de un grupo de enzimas llamadas óxido nítrico sintasa (NOS). Se han descrito y clonado tres isoformas de la NOS: NOS neuronal (nNOS ó NOS-1), NOS inducible (iNOS ó NOS-2) y NOS endotelial (eNOS ó NOS-3) [Andrew y Mayer, 1999; Alderton y cols., 2001]. Entre las características que las distinguen, hay que destacar el tamaño de los monómeros y la dependencia de Ca^{+2} de las llamadas isoformas constitutivas (eNOS y nNOS) en contraste con la independencia de Ca^{+2} de la isoforma inducible (iNOS) [Andrew y Mayer, 1999; Alderton y cols., 2001].

Así se pueden establecer reacciones en cadena por medio de varios transportadores que se oxidan y se reducen secuencialmente, cuando un radical libre inicial modifica una biomolécula después de transferir o capturar un electrón. El daño es transmitido por medio de los transportadores, que incluso pueden ser moléculas circulantes.

Las células han desarrollado mecanismos que las protegen del efecto nocivo de los radicales libres con base a un complejo sistema de defensa constituido por los agentes antioxidantes. Cuando aumenta la producción de radicales libres, estos mecanismos se activan para controlar y estabilizar el ambiente redox intra- o extracelular. Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que, presentes a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retardan o previenen la oxidación. Al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico. Existen dos tipos de antioxidantes: los endógenos, dotados por el propio sistema biológico, y los exógenos, tomados en la dieta.

Tabla 1. Tipos de antioxidantes

PRIMARIOS	SECUNDARIOS	TERCIARIOS
<p>Previenen la formación de nuevos RL, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de RL a partir de otras moléculas.</p> <p>Ej.: GPx, CAT, GRd, glutathion S-transferasa, proteínas que se unen a metales y limitan la disponibilidad del Fe necesario para formar radical HO[•].</p>	<p>Capturan los RL evitando reacción en cadena.</p> <p>Ej.: aMT, vitamina E, C, beta-caroteno, ácido úrico, albúmina, estrógenos.</p>	<p>Reparan las biomoléculas dañadas por los RL.</p> <p>Ej.: Enzimas reparadoras de ADN (endonucleasas, exonucleasas) Las metionina sulfóxido reductasa.</p>

En resumen, observamos como esa relación entre la generación de oxidantes, los mecanismos de protección antioxidante y la reparación del daño oxidativo nos informará acerca del daño producido durante el envejecimiento.

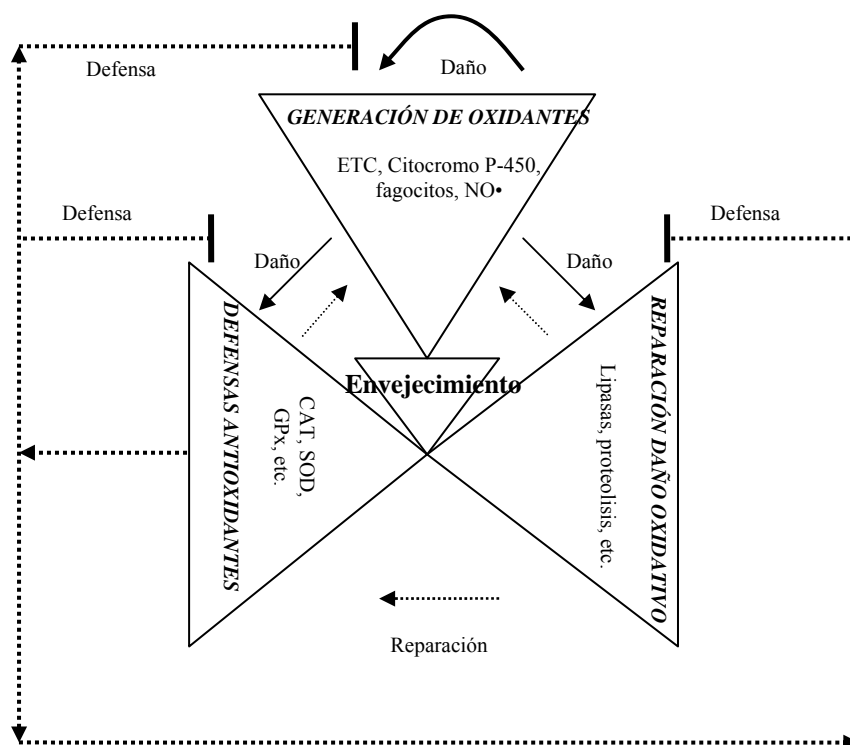


Figura 4. Interacción entre oxidantes, antioxidantes y mecanismos de reparación

1.2.- Teoría mitocondrial: Miquel y cols., 1975

La Teoría Mitocondrial fue propuesta inicialmente por Denham Harman en 1972, el “padre” de la “Teoría de los Radicales Libres del envejecimiento”, pero fue refinada y desarrollada por Miquel en 1980; por lo que hay una fuerte conexión entre ambas teorías. Miquel y cols. mantuvieron que ese daño producido por los radicales libres de la membrana mitocondrial interna estaría causado al genoma mitocondrial (mtDNA) (Figura 5). Este daño oxidativo sobre estructuras mitocondriales podría estar implicado en los procesos de envejecimiento, es la denominada teoría mitocondrial del envejecimiento [Miquel y cols., 1989, 1992, 1996].

La mitocondria es la principal fuente energética celular y consume cerca del 85 % del O_2 que utiliza la célula. Por lo tanto, también sería la principal fuente de las especies reactivas del oxígeno, que actuarían sobre los lípidos de membrana mitocondrial, las proteínas de sus sistemas enzimáticos y, fundamentalmente, sobre el DNA mitocondrial (mtDNA), muy

susceptible al daño oxidativo. Todo ello produciría un deterioro crónico y progresivo en la mitocondria y, por tanto, en la función celular.

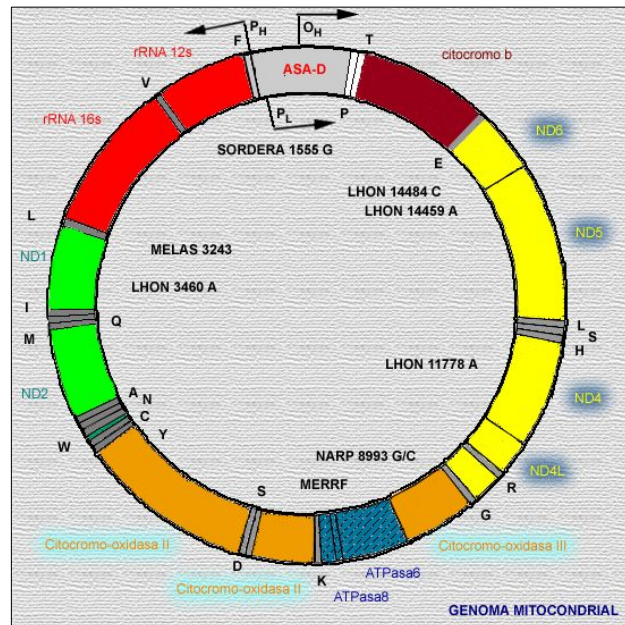


Figura 5. DNA mitocondrial

1.2.1.- DNA mitocondrial y envejecimiento

El mtDNA es una doble cadena de DNA circular de pequeño tamaño, estimado en torno a 16569 pares de bases. Contiene genes para la codificación de 13 polipéptidos implicados en la cadena respiratoria mitocondrial y en la fosforilación oxidativa, dos ácidos ribonucleicos (RNA) ribosómicos y 22 RNA de transferencia, imprescindibles para la síntesis proteica en las mitocondrias [Lee y cols., 1994]. Así, la integridad del genoma mitocondrial es esencial para el mantenimiento de la función energética de esta organela y, por lo tanto, de las células. La mayoría de las células somáticas contienen, aproximadamente, 5 mtDNA en cada mitocondria, variando esta cifra según el tejido [Schon y cols., 1994].

Se sitúa en la vecindad de la membrana interna mitocondrial, estructura donde tienen lugar los procesos de fosforilación oxidativa que proporcionan energía, y donde se generan los radicales libres derivados del oxígeno [Shigenaga y cols., 1994]. Este mtDNA es vulnerable a la agresión que producen estos radicales, ya que, al contrario de lo que ocurre con el DNA

nuclear (nDNA), carece de los mecanismos de reparación adecuados y no tiene la protección que suponen las histonas [Schapira, 1994]. Numerosos estudios han demostrado la existencia de daño oxidativo en el mtDNA, en relación con la edad [Schapira y cols., 1994; Yakes y cols., 1997; Ozawa, 1995; Richter, 1995], como el descubrimiento de mutaciones (roturas de la doble cadena, daños de bases y deleciones), incremento de 8-oxoguanina (un indicador de alteración oxidativa) en el mtDNA [De la Asunción y cols., 1996], e incluso, recientemente, el daño en el genoma mitocondrial inducido por peróxido de hidrógeno (potente agente oxidante) [Yakes y cols., 1997].

1.2.2.- Alteraciones y mecanismos de reparación mitocondriales

El incremento en la masa mitocondrial y el contenido de mtDNA son los eventos moleculares tempranos de las células humanas en respuesta al estrés oxidativo. La mayor parte del oxígeno demandado por las células humanas es reducido a agua vía complejo IV mitocondrial. Esto requiere la adición de cuatro electrones por cada molécula de oxígeno. En esta reducción de O_2 pueden ocurrir pasos intermedios con el resultado de la formación de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^{\cdot}), correspondiendo a la reducción parcial por uno, dos y tres electrones respectivamente [Barja, 1999].

El $O_2^{\cdot-}$ por sí mismo posee una toxicidad limitada, pero puede dar lugar a diferentes compuestos como las especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales al reaccionar con moléculas esenciales, como lípidos, proteínas y DNA, pueden provocar una gran destrucción molecular. El $O_2^{\cdot-}$ pasa a H_2O_2 , por la acción de la superóxido dismutasa (SOD), enzima que se distribuye desigualmente en la célula y en el compartimiento extracelular y constituye la primera línea de defensa frente a las ROS [Antolin y cols., 1996]. Aunque la SOD juega un papel fundamental en la eliminación de radicales libre ($O_2^{\cdot-}$) de la célula, cuando su actividad está crónicamente elevada sobre lo normal, como en el Síndrome de Down puede incrementar el daño oxidativo, con lo que sería prooxidativa [Busciglio y Yanker, 1995]. El H_2O_2 es reducido a agua por la acción de la catalasa (CAT) o en situaciones en las que la generación de H_2O_2 es excesiva, que podrían iniciar el daño celular mediante reacciones de peroxidación lipídica y proteica, interviene la glutatión peroxidasa (GPx). GPx en presencia de 2 moléculas de glutatión reducido (GSH), convierte H_2O_2 en H_2O , generando como producto de la oxidación del glutatión una molécula de glutatión oxidado (GSSG). Este GSSG es nuevamente reducido de forma rápida por la intervención de la glutatión reductasa (GRd), una flavoproteína citosólica cuya principal acción es generar GSH mediante la reducción del GSSG. La actividad de la enzima NADPH es fundamental en el mantenimiento del estado redox del glutatión y es

generada a partir de la oxidación de la glucosa-6-fosfato (G-6-P). No todo el H_2O_2 que es producido en la célula es detoxificado, parte es convertido en HO^\bullet . O_2^\bullet y H_2O_2 en presencia de metales de transición generan el radical hidroxilo (HO^\bullet) que es extremadamente reactivo y es el responsable de iniciar la destrucción oxidativa de biomoléculas.

El O_2 también puede jugar un papel negativo en las membranas celulares debido a que afecta a la integridad de los ácidos grasos poliinsaturados. Además, variando la cantidad de O_2 puede ser incorporado dentro de los lípidos de membrana de cadena larga, con resultado destructivo.

Como hemos visto anteriormente, no sólo las ROS dañan macromoléculas, ya que además existen las especies reactivas de nitrógeno (RNS). El O_2^\bullet combinado con NO^\bullet forma ONOO^- [Pryor y Squadrito, 1995]. NO^\bullet y su metabolito ONOO^- son RNS producidos en la mitocondria. Este producto, como el HO^\bullet , es suficientemente reactivo y daña lípidos, proteínas y DNA.

Como se ha mencionado anteriormente, el DNA mitocondrial, no está protegido por histonas y yace en las proximidades donde se producen los radicales libres en la cadena de transporte electrónica (ETC). Un gran número de modificaciones en las bases de DNA son causadas por el estrés oxidativo como la mutación en la 8-hidroxideoxiguanosina (8-oxo-dG). Para protegerse del daño oxidativo la mitocondria tiene dos mecanismos principales como son la eliminación de ROS/RNS y la reparación del daño a moléculas.

En condiciones fisiológicas deberá existir un equilibrio entre los mecanismos de generación y depuración de O_2^\bullet y otras ROS [Acuña-Castroviejo y cols., 2002].

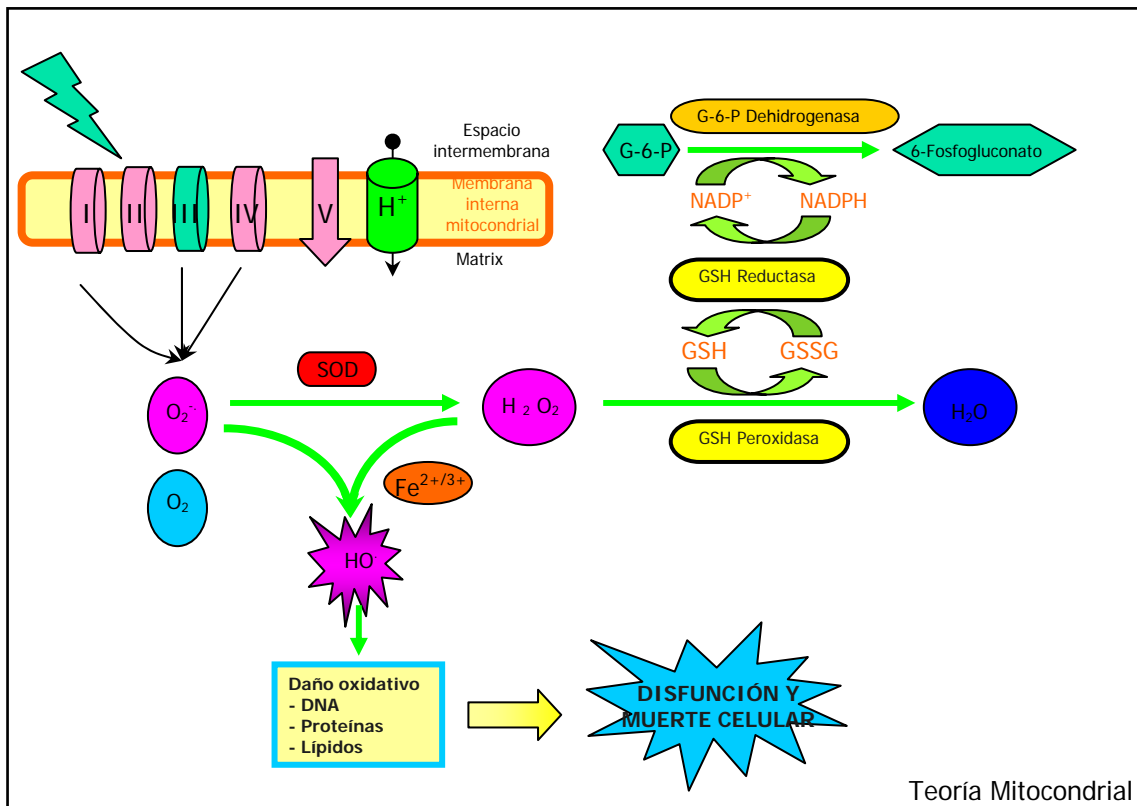


Figura 6. Daño a la mitocondria por las ROS

1.2.3.- Alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial con la edad

Una de las principales funciones de la mitocondria es la de generar energía mediante un sistema integrado por cinco complejos de proteínas. Dichas estructuras proteicas, denominadas complejos mitocondriales y situadas en la membrana interna mitocondrial, funcionan como cadenas transportadoras de electrones que catalizan así la fosforilación de ADP a ATP. La actividad de estos complejos mitocondriales disminuye con la edad, fundamentalmente los complejos I, II y IV. Estas alteraciones en las estructuras mitocondriales estarían relacionadas con la producción de radicales libres.

1.2.4.- Alteraciones estructurales mitocondriales asociadas con la edad

Se han descrito numerosos cambios en la estructura mitocondrial asociados a la edad como vacuolización, agrandamiento, inclusiones intramitocondriales paracrystalinas [Schapira, 1994; Feldman y cols., 1981; Frenzel y cols., 1984], acumulación de glucógeno, agregaciones intracitoplasmáticas mitocondriales, pérdida de la matriz, inclusiones lipídicas [Coleman y cols., 1988] o bien tubulares y filamentosas [Miquel y cols., 1996; Vanneste y cols., 1981], así como cambios en la distribución intracelular de las mitocondrias asociados con el envejecimiento. En un reciente estudio sobre la estructura mitocondrial en músculos de humanos se demostró un aumento del área mitocondrial total, de la densidad numérica y de la densidad de volumen en relación con la edad [Zucchini y cols., 1995].

A nivel molecular, en la membrana mitocondrial se produce una disminución de los niveles de ácido linoleico y un incremento de los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena, una clase de ácidos grasos de membrana que exhiben una mayor sensibilidad a la acción de los procesos oxidativos [Shigenaga y cols., 1994; Castelluccio y cols., 1994]. Además, se ha descrito un aumento de los niveles de colesterol, disminución del contenido de fosfolípidos [Paradies y cols., 1990], del potencial de membrana, y aumento de la generación de peróxido en membrana [Sastre y cols., 1996]. El hecho más significativo es la disminución de los niveles de cardiolipina en la membrana interna mitocondrial. La cardiolipina es un difosfatidil glicerol que desempeña un papel muy importante en la estructura y función mitocondrial, sirve como anclaje de numerosas proteínas a la membrana interna mitocondrial (citocromo oxidasa, ADP/ATP translocador, translocador de fosfatos, ATP-sintetasa mitocondrial, proteínas transportadoras y enzimas implicadas en el procesamiento de la carnitina), y está implicada en la permeabilidad y control de gradientes a través de dicha membrana. Se ha visto una disminución del contenido de cardiolipina en numerosos tejidos como cardíaco, hepático y cerebral asociado a la edad, lo que podría suponer una gran alteración en el funcionamiento mitocondrial [Shigenaga y cols., 1994; Ruggiero y cols., 1992; Ames y cols., 1995]. Además, contiene gran cantidad de ácidos grasos insaturados en comparación con otros fosfolípidos de la membrana interna mitocondrial, lo que aumenta su sensibilidad a la oxidación. Este estrés oxidativo acumulado a lo largo del tiempo inducirá la oxidación de estos ácidos grasos insaturados y, por tanto, la disminución de la cantidad de cardiolipina mitocondrial, con la consiguiente repercusión en los enzimas de la membrana interna y disminución de la permeabilidad, contribuyendo así a la degeneración.

1.3.- Teoría inflamatoria: Chung y cols., 2001

La inflamación se define como una reacción compleja de defensa ante el estrés, fisiológico o no. Se trata de una respuesta inespecífica y, por tanto, inmediata y no elaborada, frente a las agresiones del medio, y está generada por los agentes inflamatorios. Las citoquinas son los mensajeros fisiológicos de la respuesta inflamatoria. Se trata de pequeñas moléculas proteicas o glicoproteicas cuya función fundamental es intervenir en la transmisión de información (señales) de una célula a otra. Se unen a receptores específicos de sus células blanco, provocando en estas células modificaciones que llevan a la síntesis y liberación de mediadores secundarios. Su efecto se ejerce fundamentalmente sobre las células que rodean a la célula emisora (efecto paracrino). La respuesta inflamatoria surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado.

Como se muestra en la figura 7, la respuesta inflamatoria sigue las siguientes fases:

- 1) activación intracelular
- 2) infiltración de macrófagos proinflamatorios y linfocitos
- 3) incremento de la permeabilidad vascular
- 4) daño en los tejidos y muerte celular

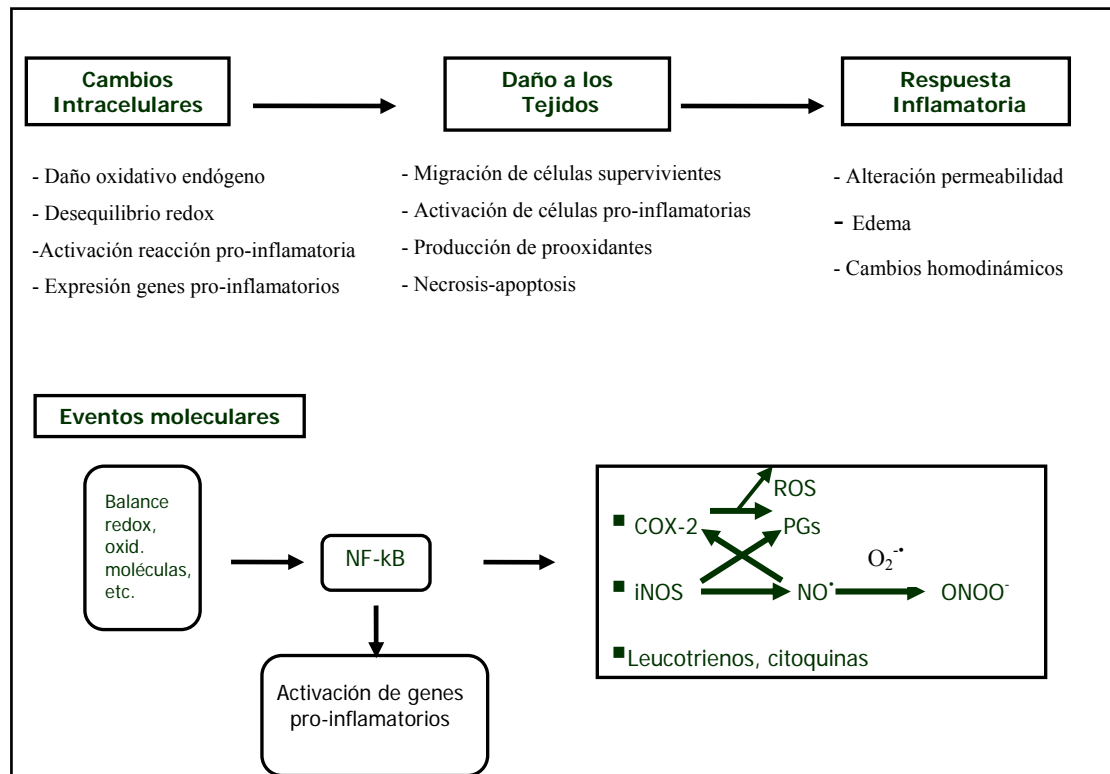


Figura 7. Cambios bioquímicos y moleculares en la respuesta inflamatoria

El envejecimiento está asociado con un incremento de los niveles de citoquinas circulantes. Algunas de éstas promueven la inflamación y son llamadas **citoquinas pro-inflamatorias**, mientras que otras suprimen la actividad de éstas y se conocen como **citoquinas anti-inflamatorias**. En la siguiente tabla se muestran las citoquinas que vamos a estudiar, así como su fuente y actividad.

Tabla 2. *Citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias*

CITOQUINAS	FUENTES	ACTIVIDAD
Interleuquina 1 (IL-1 β)	Muchos tipos celulares, entre ellos monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T y B, células NK y células ajenas al sistema inmunitario como epitelio vascular, fibroblastos y algunas células del músculo liso	Presenta una gran variedad de actividades biológicas en muchos tipos celulares diferentes como células T, células B y monocitos. Los receptores para IL-1 también se encuentran en otros leucocitos que incluyen eosinófilos y células dendríticas, así como en células no inmunitarias, como fibroblastos, células endoteliales vasculares y algunas células del sistema nervioso. Los efectos in vivo de IL-1 abarcan inducción de fiebre, la respuesta de fase aguda y estimulación de la producción de neutrófilos.
Interleuquina 2 (IL-2)	Células T	Estimula el crecimiento y la diferenciación de células T, células B y células NK. Ejerce otros muchos efectos sobre el sistema inmune, teniendo un papel esencial en el desarrollo de las respuestas inflamatorias crónicas, tanto humorales como celulares.
Interleuquina 4 (IL-4)	Mastocitos, células T, células estromales de la médula ósea	Es una citoquina muy pleiotrópica, ya que ejerce numerosos efectos en diferentes tipos celulares. Promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia células de tipo Th2, inhibiendo la generación de células Th1. Posee efectos inmunosupresores, ya que inhibe la producción de determinados mediadores inflamatorios de los macrófagos e induce el crecimiento y desarrollo de células B y T, y de células del linaje monocítico. También afecta las células fuera del sistema inmunitario, como células endoteliales y fibroblastos.

CITOQUINAS	FUENTES	ACTIVIDAD
Interleuquina 5 (IL-5)	Mastocitos, células T, eosinófilos	Induce formación y diferenciación de eosinófilos.
Interleuquina 10 (IL-10)	Subgrupos activados de células CD ₄ ⁺ y CD ₈ ⁺	Es la citocina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la síntesis de muchas otras citoquinas (INF- γ , TNF- α , IL-2, IL-12,...). También tiene efectos antiproliferativos sobre muchos tipos celulares. Además ejerce múltiples actividades inmunomoduladoras. Estimula e intensifica la proliferación de células B, timocitos y mastocitos.
Interferón gamma (IFN- γ)	Células T CD ₄ ⁺ y CD ₈ ⁺ , células NK	Afecta la activación, el crecimiento y la diferenciación de células T, células B y macrófagos, así como células NK. Regula en ascenso la expresión de MHC en células presentadoras de antígeno. Es la citocina de firma de la diferenciación de T _H 1. Actividad antiviral y antiproliferativa débil.
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	Monocitos, macrófagos, otros tipos celulares, inclusive células T y fibroblastos	Mediador potente de funciones inflamatorias e inmunitarias. Conocido por regular el crecimiento y la diferenciación de una gran variedad de tipos celulares. Citotóxico para muchos tipos de células transformadas.
Factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF)	Células T, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales	Factor de crecimiento para las células progenitoras hematopoyéticas y factor de diferenciación para linajes de células granulocíticas y monocíticas.

La acción de muchos tipos de células que regulan la respuesta inflamatoria depende de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS). El papel dual de las ROS y RNS (deletéreo y beneficioso), es dependiente de su nivel constante del medio celular donde estas especies son producidas [Chung, 1998]. Las ROS cumplen muchas funciones esenciales como segundos mensajeros bajo la regulación de condiciones fisiológicas como la regulación de la presión sanguínea y función plaquetaria. Los tejidos reclutan y usan neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos que producen O₂⁻ y H₂O₂ como una parte de las

estrategias de defensa [Babior y Woodman, 1990]. Aunque, también las ROS asumen un papel deletéreo cuando no son reguladas como ocurre en la inflamación crónica, golpes y el shock séptico [Anggard, 1994; Grisham, 1994; Halliwell and Gutteridge, 1999; Moncada, 1993].

Por otra parte, el NO[•] juega un papel importante en la señalización celular, vasodilatación y en la respuesta inmune. Muchos procesos inflamatorios están asociados con una gran producción de NO[•], producido por la iNOS, con consecuentes efectos citotóxicos. La iNOS fue inicialmente identificada en macrófagos, pero puede ser expresada en algunos tipos esenciales de células. El NO[•], una vez producido en grandes concentraciones locales, puede actuar como una molécula citostática y citotóxica para bacterias, helmintos, hongos y organismos protozoos además de células tumorales. Usando inhibidores de la iNOS ó ratones knockout para la iNOS se ha demostrado que el NO[•] participa como un agente señalizador proinflamatorio en la activación de la cascada inflamatoria caracterizada por el incremento en la producción de citoquinas, por moléculas de adhesión que se unen a las expresadas por los leucocitos y determinan la llegada de estos leucocitos al foco inflamatorio y la infiltración de neutrófilos dentro de los tejidos durante la inflamación crónica ó aguda [Cuzzocrea y cols., 2000; Hierholzer y cols., 1998; McInnes y cols., 1998].

Los ROS son también producidos en abundancia durante el proceso inflamatorio. La generación simultánea de NO[•] y O₂^{•-} favorece la producción de ONOO⁻ que, como ya hemos visto, son muy tóxicos [Beckman y cols., 1996].

1.3.1.- Factores activadores de la inflamación

Las citoquinas pro-inflamatorias que inician la respuesta inflamatoria son la IL-1, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α). Estas moléculas suelen actuar conjuntamente con otras citoquinas como la IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 y el interferón gamma (INF- γ), etc. Otros mediadores son producidos en el proceso inflamatorio, los cuales tienen acciones sinérgicas con las citoquinas. Estos autoinducen su propia producción, o la de otras citoquinas, que regularán al alta o a la baja, el proceso inflamatorio.

Las citoquinas son el mayor canal de comunicación entre el sistema inmune y otros órganos. Estas citoquinas tienen actividades potenciadoras de la inflamación, pero destacaremos la activación de las células endoteliales e inducción de la expresión de moléculas de adhesión responsables de la llegada de leucocitos al foco inflamatorio y la activación del macrófago. Esta célula es el núcleo funcional del proceso inflamatorio,

desarrollando numerosas funciones como: producción de citoquinas inflamatorias, fagocitosis, citotoxicidad e incluso actuando como célula presentadora del antígeno a los Th. Las bacterias, por otra parte, liberan diversos productos que activan el proceso inflamatorio.

Por otra parte el factor de transcripción NF- κ B, que es extremadamente sensible a los oxidantes y muchas sustancias pro-inflamatorias, regula al menos un centenar de genes incluidos varios proinflamatorios. NF- κ B está implicado en la expresión de genes de compuestos oxidantes e inflamatorios como el TNF α , o la ciclooxigenasa-2 (COX-2) e iNOS (óxido nítrico sintasa inducible), manifiesta una gran activación en las células inmunitarias en situaciones de estrés oxidativo como sucede al envejecer. De este modo, se podría establecer un “círculo vicioso” que fomentaría aún más el estrés oxidativo.

Papel de NF- κ B en procesos inflamatorios

Una gran parte de las moléculas implicadas en el proceso inflamatorio de la pared vascular están bajo el control del factor de transcripción NF- κ B. Este factor de transcripción se encuentra expresado ubicuamente en los diferentes tejidos. NF- κ B se localiza en el citoplasma celular formando un heterorímero compuesto, generalmente, por las subunidades p50, p65 y la proteína inhibitoria κ B (I κ B). Cuando llega un estímulo activador a la célula, la subunidad I κ B es fosforilada por diferentes quinasas específicas produciendo su liberación del complejo y su degradación por el proteosoma. El complejo p50-p65 liberado, penetra en el núcleo celular donde se une a secuencias específicas en los promotores de los genes diana, activando su transcripción.

Diferentes estímulos son capaces de provocar la activación de este factor de transcripción entre los que se encuentran estímulos inmunológicos, citoquinas (FNT- α , IL-1, factores de crecimiento, LDL oxidadas, etc.).

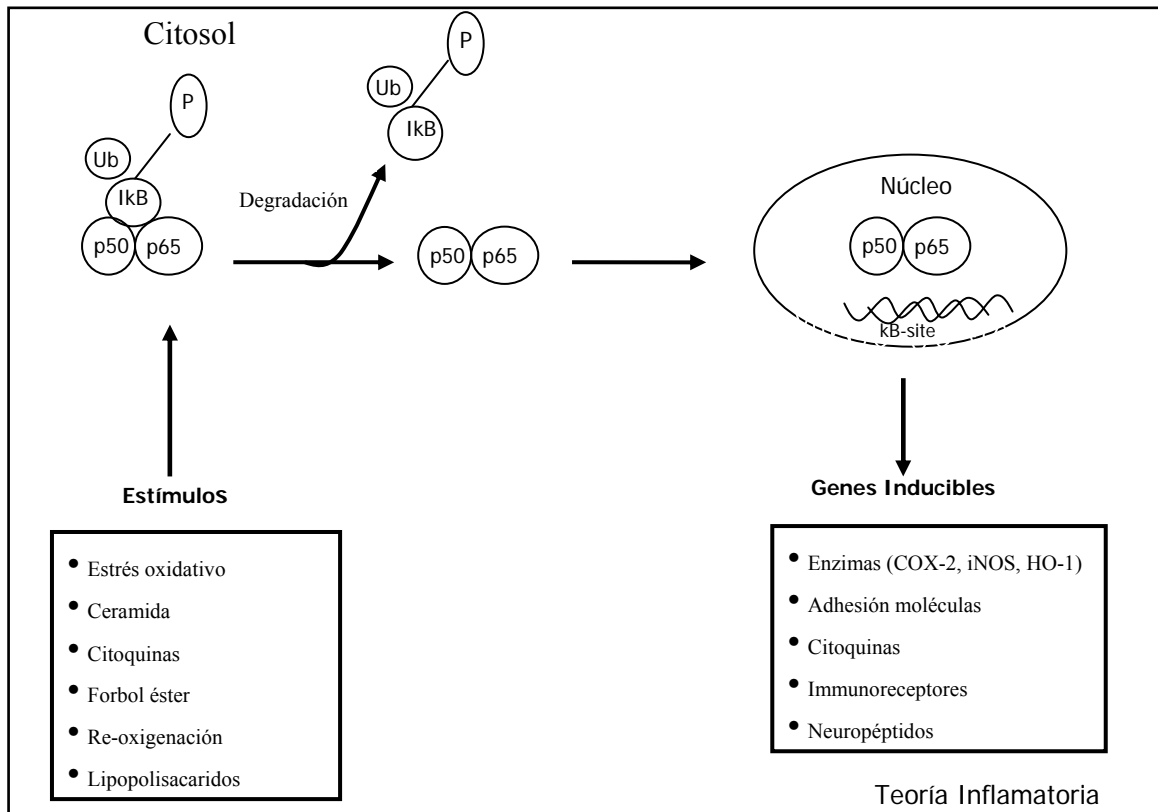


Figura 8. Activación de NF-κB

Por lo que durante el envejecimiento se producirá un aumento de factores oxidantes (ya que nuestro sistema inmunitario con el paso del tiempo se ve enfrentado a numerosos agentes extraños que crearían un desgaste en el equilibrio oxidantes/antioxidantes) e inflamatorios que afectarían con el paso del tiempo a todas las células del organismo.

1.3.2.- Factores inhibidores de la inflamación

Finalmente, las citoquinas anti-inflamatorias que incluyen la IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13, receptores solubles y antagonistas de receptores y son responsables de la correcta terminación de la respuesta inflamatoria. Tienen un efecto inhibitor de la inflamación actuando sobre el macrófago. Bajo condiciones fisiológicas, estos inhibidores de las citoquinas sirven como elementos inmunomoduladores que limitan los potenciales efectos perjudiciales de la sostenida y excesiva reacción inflamatoria. Bajo condiciones patológicas, estos mediadores anti-inflamatorios pueden 1) proveer insuficiente control sobre la actividad proinflamatoria ó 2) compensar e inhibir excesivamente la respuesta inmune presentando un gran riesgo de infección sistémica [Muñoz y cols., 1991; Kasai y cols., 1997].

2.- MELATONINA

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (aMT) es una indolamina descrita inicialmente por McCord y Allen [McCord y Allen, 1917] y aislada por primera vez por Lerner [Lerner y cols., 1958] a partir de extractos de la glándula pineal. Se le conoce como melatonina debido a la capacidad que poseía para aclarar la piel de anfibios mediante la agregación de **melanina** en los **melanóforos** y a que es un derivado metabólico de la **serotonina**.

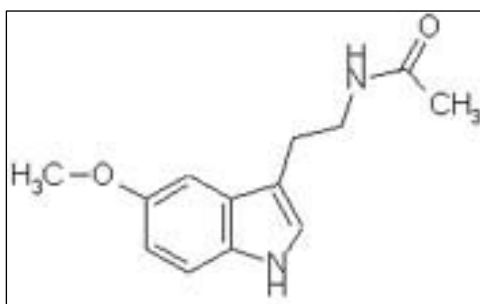


Figura 9. Estructura química de la molécula de melatonina

Se trata de un cristal orgánico, de color blanco, con un punto de fusión entre 116-118°C, poco soluble en agua y muy soluble en etanol [Szmuskowicz y Heinzelman, 1960].

2.1.- Metabolismo de la melatonina

2.1.1.- Biosíntesis de la melatonina

La melatonina aparece muy pronto en la escala evolutiva [Macías y cols., 1999]. En los mamíferos, la síntesis de melatonina se descubrió en la glándula pineal [Reiter, 1991b; Erren y cols., 2003].

La cascada bioquímica que da lugar a su síntesis comienza con la captación del aminoácido esencial triptófano, procedente del torrente circulatorio. Éste se transforma, en

primer lugar, en 5-hidroxitriptamina o serotonina, por acción sucesiva de la L-triptófano hidroxilasa y la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa.

La serotonina es acetilada por la N-acetiltransferasa o NAT (enzima limitante del proceso de síntesis de la melatonina). La metilación sufrida por la N-acetilserotonina gracias a la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) produce la molécula de melatonina [Weissbach y cols., 1960; Axelrod y Weissbach, 1961; Axelrod, 1974].

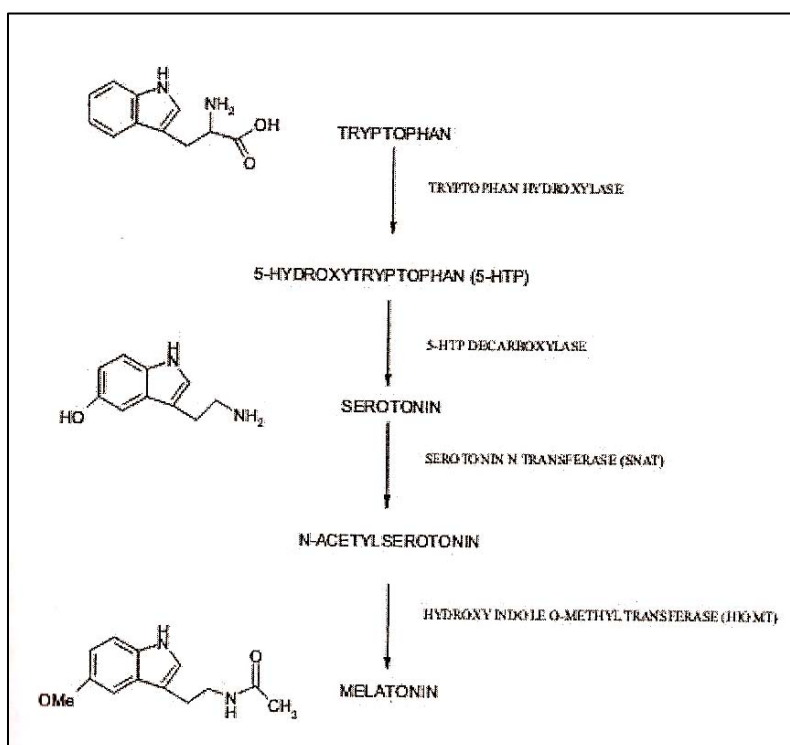


Figura 10. Síntesis de melatonina a partir de triptófano en la glándula pineal

La melatonina se produce de manera circadiana, presentando unos niveles máximos durante la noche [Pang y cols., 1980; Aimoto y cols., 1985; Menéndez-Peláez y cols., 1987; Reiter, 1991b,c]. Recientemente, se ha demostrado la presencia, en prácticamente todos los tejidos del organismo, de la expresión de los genes que codifican los enzimas clave de la síntesis de melatonina (NAT y HIOMT) [Stefulj y cols., 2001]; por lo que cada tejido podría producir la melatonina que necesita en cada momento, sin depender de la melatonina

circulante. Por tanto, además de en la glándula pineal, la melatonina es sintetizada en mamíferos en una gran variedad de tejidos como la retina, la glándula harderiana, la mucosa del intestino, el cerebelo, el epitelio respiratorio, el hígado, el riñón, el timo, el tiroides, el páncreas, los ovarios, el cuerpo carotideo, la placenta y el endometrio, así como en células no endocrinas tales como las células NK (natural killer), eosinófilas, plaquetas y endoteliales [Kavetnoy, 2002]. Además, la melatonina es ubicua en el reino animal y vegetal, encontrándose en muchos tipos de organismos, como bacterias, eucariotas unicelulares, microalgas, plantas, invertebrados y vertebrados, al igual que en diversos comestibles como vegetales, frutas, hierbas medicinales y semillas [Hardeland y Poeggeler, 2003; Macías y cols., 1999]. En el interior de los orgánulos subcelulares, la concentración de melatonina puede variar, y algunos autores han descrito que los niveles de esta indolamina en núcleo y en mitocondria pueden ser significativamente mayores que en plasma [Menéndez-Peláez y Reiter, 1993b; Acuña-Castroviejo y cols., 2003].

2.1.2.- Metabolismo de la melatonina

La melatonina, fundamentalmente en la retina, aunque también en el hígado, puede sufrir desacetilación y desaminación hasta convertirse en ácido 5-metoxiindolacético y 5-metoxitriptofol [Cahill y Besharse, 1989].

Otra vía de degradación sería la que tiene lugar en el cerebro, plexo coroideo y pineal. En este caso, la melatonina se transforma primero en N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK) y después en N¹-acetil-5-metoxikinurenamina (AMK), siendo esta una de las vías más importantes de metabolización de la melatonina en cerebro de mamíferos [Hirata y cols., 1974; Fujiwara y cols., 1978].

AFMK es el producto que se forma cuando la melatonina depura H₂O₂ [Tan y cols., 2000a]. Igualmente importante es el hecho de que AFMK es también un efectivo depurador de HO[•]. Por lo tanto, no sólo la melatonina pero también alguno de sus metabolitos es altamente eficiente en reducir el daño producido por los radicales libres. Nos referimos a esto como la “cascada antioxidante de la melatonina”, un proceso que incrementa mucho la eficiencia de su ubicua actividad como depurador de radicales libres y antioxidante.

Con este mecanismo el radical catión indolilo (radical de la melatonina), elimina, en realidad, dos radicales libres a la vez: un HO[•] y un O₂^{-•}.

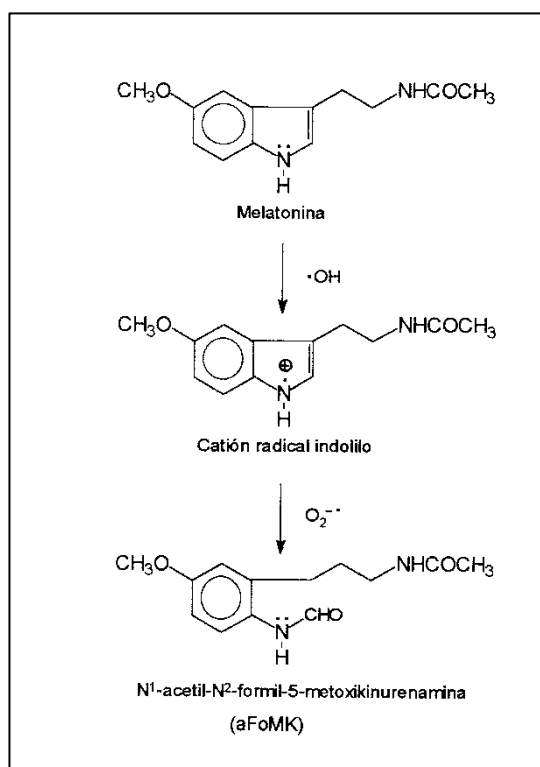
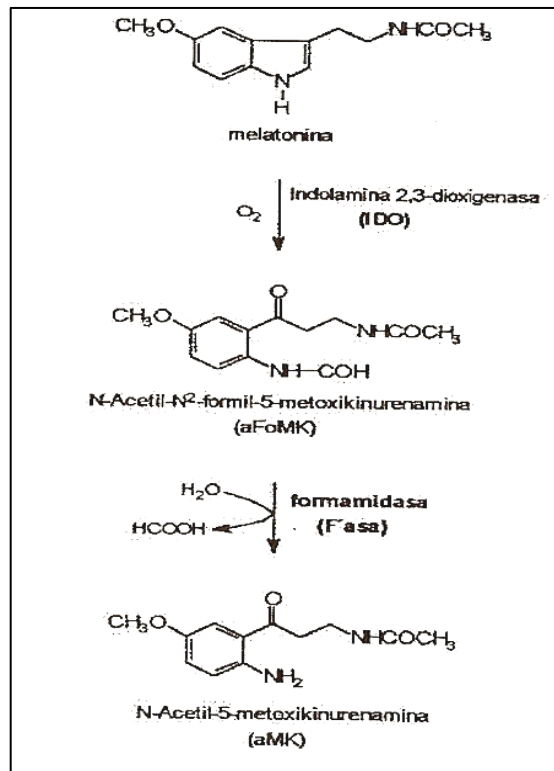


Figura 11. Ruta oxidativa de degradación de melatonina

La melatonina también puede transformarse de forma no enzimática en AMK, cuando depura en primer lugar un radical hidroxilo (HO[·]) y en segundo lugar un radical superóxido (O₂^{·-}) [Hirata y cols., 1974; Fujiwara y cols., 1978].



-Figura 12. Ruta enzimática de degradación de melatonina

AMK y AFMK se forman durante el metabolismo enzimático de la melatonina en el cerebro [Hirata y cols., 1974], pero también son productos secundarios cuando la melatonina actúa como depurador de radicales libres de ROS y RNS. Como hemos visto, estos metabolitos son también eficientes antioxidantes [Tan y cols., 2001, 2003], y existen evidencias de su participación en la inhibición de la NOS cerebral [León y cols., 2006].

2.2.- Mecanismos de protección de la melatonina

La melatonina es una molécula altamente lipofílica, lo que le permitiría atravesar las membranas celulares con cierta facilidad, enriqueciendo los compartimentos subcelulares, incluyendo la mitocondria, donde puede acumularse a altas concentraciones [Acuña-Castroviejo y cols., 2002, 2003; León y cols., 2004].

La melatonina puede actuar como un potente antioxidante de acción directa e indirecta:

Su acción directa se debe a que la melatonina y algunos de sus metabolitos poseen la capacidad de depurar por sí mismos algunas especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno [Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003; León y cols., 2004]. Principalmente actúa sobre el peligroso radical HO^\bullet [Tan y cols., 1993; Khaldy y cols., 2000; Reiter y Tan, 2002a], de ROO^\bullet [Pieri y cols., 1994] y oxígeno singlete [Cagnoli y cols., 1995]. El mecanismo por el cual la melatonina neutraliza al radical HO^\bullet consiste en que esta indolamina cede un electrón al radical, transformándose en el catión indolilo [Hardeland y cols., 1993; Poeggeler y cols., 1994]. Éste interactúa con el radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, precursor del HO^\bullet , para generar AFMK, que se elimina por la orina.

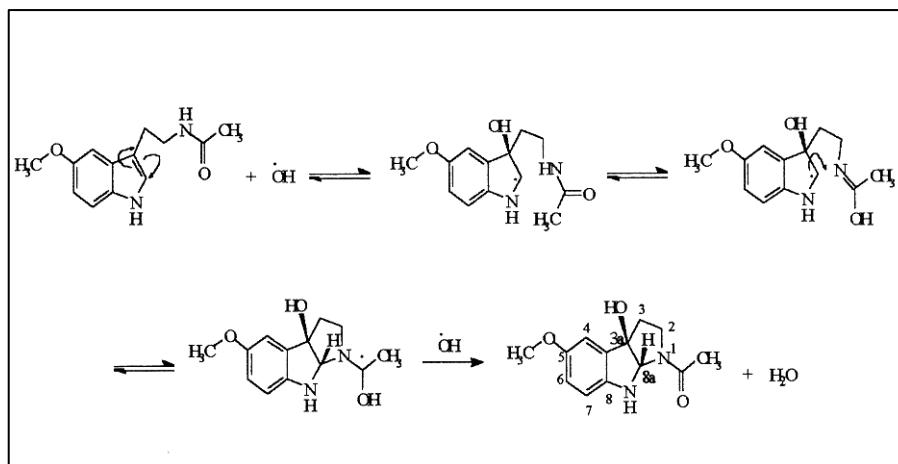


Figura 13. Ruta de reacción propuesta cuando la melatonina depura 2 radicales HO^\bullet

Actualmente se han encontrado otras vías de metabolización del radical HO^\bullet de parte de la melatonina. En esta ruta, la melatonina se convierte en hidroximelatonina cíclica (3-OHaMT) que se elimina por la orina. Experimentalmente se puede medir la concentración de

este metabolito de la melatonina para tener un índice fiable de estrés oxidativo en el organismo [Tan y cols., 1998].

La melatonina también posee capacidad para neutralizar H_2O_2 y como producto de esta interacción se obtiene el metabolito N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinuramina (AFMK) [Tan y cols., 2000a], cuya capacidad antioxidante contra el daño oxidativo inducido por H_2O_2 en DNA y lípidos también se ha puesto de manifiesto [Tan y cols., 2001]. Estos experimentos también han sido comprobados *in vivo* [Reiter y cols., 2003].

Tanto la 3-hidroxi-melatonina cíclica como la AFMK, productos de reacción de la melatonina con HO^\bullet y H_2O_2 respectivamente, parecen tener funciones depuradoras de agentes tóxicos [Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003; León y cols., 2004].

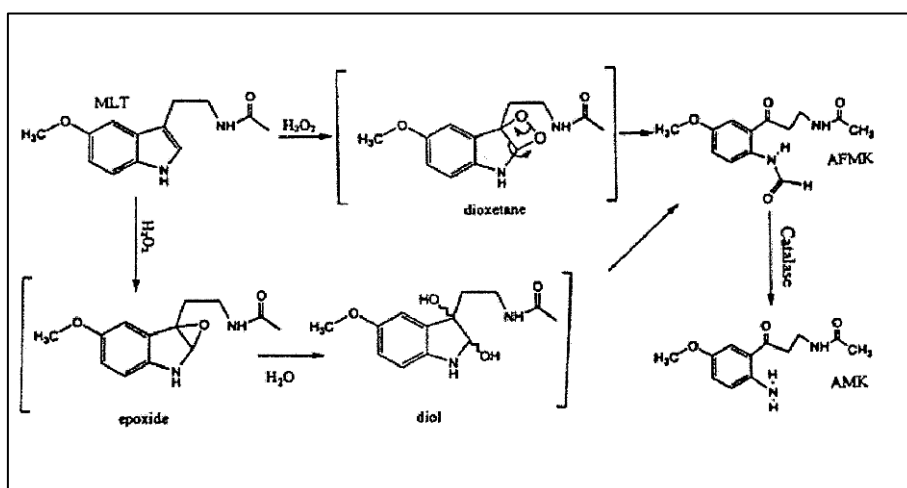


Figura 14. Ruta de reacción de la melatonina propuesta para la degradación de H_2O_2

Aunque el $O_2^{\bullet-}$ es menos tóxico que el HO^\bullet , tras su rápido acoplamiento con el NO^\bullet se forma el $ONOO^\bullet$, el cual posee una mayor toxicidad que el HO^\bullet , ya que además de su inherente toxicidad, a través del ácido peroxinitroso ($ONOOH$) puede volver a metabolizarse a HO^\bullet in vivo. Aunque algunos autores han mostrado débiles efectos de la melatonina sobre la neutralización de $O_2^{\bullet-}$ [Marshall y cols., 1996; Zang y cols., 1998], el efecto de la melatonina sobre este radical aún está por confirmar, especialmente in vivo, ya que la reacción por la cual

la melatonina ejercería esta acción no es conocida [Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003; León y cols., 2004].

La capacidad neutralizadora de la melatonina sobre la formación y la citotoxicidad del oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) también se ha demostrado. $^1\text{O}_2$ es una forma de oxígeno de alta energía generada normalmente por reacciones de fotosensibilización de colorantes y pigmentos biológicos. Al igual que el proceso de neutralización del H_2O_2 , la oxidación que la melatonina sufre en la neutralización genera el metabolito AFMK [de Almeida y cols., 2003].

La melatonina también puede depurar radicales peróxido (LOO^\cdot), interfiriendo así en la propagación de la peroxidación lipídica, aunque este hecho podría deberse más a la acción depuradora de otras especies reactivas que pueden provocar peroxidación lipídica que a la depuración en sí de radicales peróxido. No obstante, la melatonina es altamente eficaz para reducir los niveles de peroxidación lipídica, tanto basales como estimulados por estrés oxidativo [Reiter y cols., 2003].

Además de la capacidad intrínseca para depurar radicales libres, la melatonina posee la capacidad de estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción indirecta para la reducción del estrés oxidativo [Kotler y cols., 1998; Antolin y cols., 2002; Mayo y cols., 2002]. En primer lugar, la melatonina estimula el ciclo del glutatión, aumentando la actividad de la GPx y de la GRd, regulando así el balance GSSG/GSH (Pablos y cols., 1998; Martín y cols., 2000a). Además, la melatonina aumenta la producción de GSH por la estimulación de la γ -glutamilcisteina sintasa, enzima limitante en la ruta de síntesis de glutatión [Urata y cols., 1999]; y estimula la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD), que es la encargada de generar el NADPH, requerido por la GRd [Pierrefiche y Laborit, 1995]. Así, la melatonina estimula otras enzimas antioxidantes como la SOD y la CAT [Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003; León y cols., 2004]. Además ejerce una acción sinérgica con otros antioxidantes como la vitamina E y C [Reiter y cols., 2003].

Algunas de las propiedades antioxidantes de la melatonina son debidas a su efecto genómico en la regulación de la expresión de proteínas y la actividad de enzimas antioxidantes [Antolin y cols., 1996], así como la inhibición de la expresión de enzimas prooxidantes/pro-inflamatorias como la iNOS y la mtNOS [Crespo y cols., 1999; Escames y cols., 2003; Gilad y cols., 1997].

Hace años, Lissoni y cols., propusieron que la melatonina era un potente agente anti-inflamatorio y puede contribuir a la reacción inmune contra el cáncer. Como los radicales libres están implicados en el proceso inflamatorio, la melatonina es un buen candidato por sus propiedades anti-inflamatorias debido a sus características como depurador de radicales libres y antioxidante [Cuzzocrea y cols., 2004]. Además es un agente neuroinmunomodulador e inhibe la traslocación del factor nuclear NF- κ B en el interior del núcleo [Chuang y cols., 1996]. Los efectos inmunoreguladores de la melatonina se han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* [Maestroni, 1996; Gilad y cols., 1998; Guerrero, 2002]. En la actualidad este papel anti-inflamatorio de la melatonina está bien asentado [Escames y cols., 2006; Mayo y cols., 2005].

En resumen, la melatonina es un potente antioxidante, sea por acción directa y/o indirecta, con importantes propiedades para actuar sobre la mitocondria, y en consecuencia, protegerá al mtDNA, las membranas lipídicas y las proteínas mitocondriales del daño oxidativo.

2.3.- Melatonina y mitocondria

El daño excesivo producido por los radicales libres está asociado con el proceso de envejecimiento; en particular el daño molecular a la mitocondria. La mitocondria juega un papel central en el envejecimiento ya que la producción de energía es relegada a esta organela. Dos principales consideraciones aluden al papel de la melatonina en la homeostasis mitocondrial.

En primer lugar, la mitocondria produce gran cantidad de ROS y RNS. En segundo lugar, la mitocondria depende del ciclo del GSH tomado del citoplasma. Así aunque tiene GPx y GRd para mantener el ciclo redox del GSH, este ciclo tiene que funcionar permanentemente para asegurar una reserva de GSH en la mitocondria. Pero además, la melatonina no sólo ayuda a mantener ese almacén, detoxificando radicales libres, también estimula la actividad de los enzimas participantes en el ciclo del glutation, aumentando su reserva y disminuyendo los niveles de GSSG [Martín y cols., 2000a].

La melatonina es capaz de aumentar de forma dosis-dependiente la actividad de los complejos I y IV de la CTE [Martín y cols., 2000b] y de prevenir la reducción de la misma tras el daño ocasionado por algún agente inductor de estrés oxidativo [Martín y cols., 2000b, 2002]. Su capacidad para regular la actividad de estos complejos puede no ser debida sólo al poder antioxidante de la melatonina, ya que teniendo en cuenta su potencial de óxido-reducción (0.74V) [Tan y cols., 2000b], la melatonina podría interactuar con los complejos de la CTE

donando y aceptando electrones, incrementando así el flujo electrónico, cosa que no sucede con otros antioxidantes [Martín y cols., 2002].

La melatonina es capaz de atravesar fácilmente la membrana mitocondrial y se acumula a elevadas concentraciones en dicha organela [Martín y cols., 2000a; Acuña-Castroviejo y cols., 2002, 2003; León y cols., 2004], estabiliza su membrana interna [García y cols., 1999] y puede mejorar la actividad de la CTE [Acuña-Castroviejo y cols., 2001, 2005].

Como consecuencia de su acción sobre la CTE, la melatonina aumenta la producción de ATP [Martín y cols., 2002] y acelera el metabolismo en mitocondrias aisladas de oocitos de rana [de Atenor y cols., 1994]; efecto que puede deberse a que la melatonina inhibe el estado 3 de la respiración mientras que el estado 4 no se ve afectado. La habilidad de la melatonina para reducir el consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado puede proteger a la organela del daño de un excesivo estrés oxidativo [Reyes-Toso y cols., 2003].

Se ha demostrado que la melatonina protege, tanto *in vivo* como *in vitro*, al mtDNA de su oxidación producida por los radicales libres que fisiológicamente “escapan” de la CTE y de la peroxidación lipídica inducida por cianuro y ácido kaínico [Yamamoto y Mohanan, 2002, 2003].

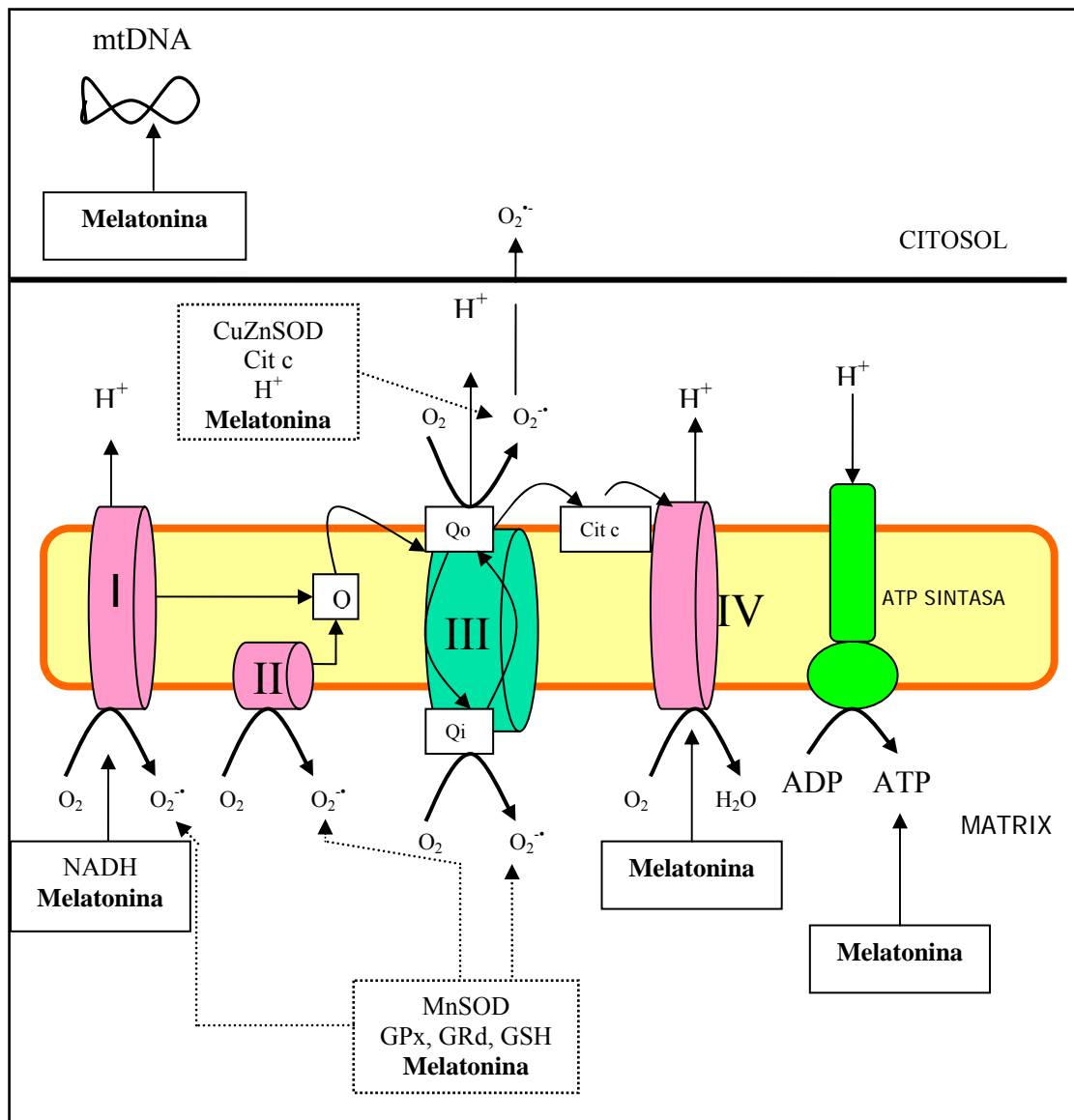


Figura 15. Componentes de la ETC. Los sistemas de defensa antioxidante controlan la producción de ROS durante el metabolismo normal. La melatonina actúa como antioxidante, pero también puede interactuar con los complejos

2.4.- Melatonina y envejecimiento

La melatonina es una de las moléculas conocidas como “geroprotector” lo que significa que “previene contra el envejecimiento”. El ritmo de la melatonina es vigoroso en individuos y animales jóvenes, sin embargo, con el envejecimiento se produce un descenso notable de su síntesis. En personas mayores de 75 años, el ritmo diario de la melatonina es sólo una pequeña fracción del observado en individuos de 20-30 años. La disminución en la secreción de melatonina con el envejecimiento reduce su importante acción antioxidante, y esto puede contribuir al inicio y desarrollo de una gran variedad de enfermedades relacionadas con la edad.

Recientemente se ha considerado a la melatonina como una hormona anti-envejecimiento y se ha propuesto la hipótesis de que el envejecimiento podría ser una consecuencia del fallo pineal. Según esta hipótesis, el envejecimiento sería un síndrome de deficiencia relativa de melatonina o del resultado del daño celular generado por los derivados del óxido nítrico u otro radical libre sobre los que actuaría la melatonina como antioxidante.

Además, se ha evaluado la relevancia de la melatonina producida endógenamente y su relación con el daño oxidativo en bazo, hígado y timo [Lardone y cols., 2006]. Para esto se usan ratones SAMP8, con senescencia acelerada y se observa una relación inversa entre la concentración de melatonina en cada tejido y su daño oxidativo. Así se ve una reducción del daño a proteínas en bazo y timo donde los niveles de melatonina eran altos.

En ratones SAMP8 y sus controles SAMR1 a los 3, 6 y 12 meses de edad [Okatani y cols., 2002b,c; 2003a], la actividad de los complejos I y IV en mitocondrias de hígado en ratones SAMP8 muestran una reducción durante el envejecimiento. En contraste, en el caso de la medida de la función respiratoria en ratones SAMR1 no conlleva reducción [Okatani y cols., 2002b,c]. Asimismo, la concentración de lipoperoxidación en homogenado de hígado y cerebro de SAMP8 es significativamente mayor que en el caso de SAMR1. Sin embargo, la actividad de la enzima antioxidante GPx, a los 12 meses de edad en SAMP8, es significativamente más baja que en SAMR1. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo como resultado de la excesiva generación de radicales libres combinado con la pérdida de eficiencia de los mecanismos de defensa conlleva la alteración de la función mitocondrial en ratones SAMP8 [Okatani y cols., 2002b,c]. Además los niveles de malondialdehído son significativamente más altos en SAMP8 a los 12 meses de edad. Aunque el homogenado de hígado en SAMP8 muestra baja actividad de SOD que SAMR1, no es significativo [Okatani y cols., 2002b]. El tratamiento crónico con melatonina (2 mg/ml en el agua de bebida) redujo significativamente el

contenido neural y hepático de TBARS en SAMP8, y aumentó significativamente la actividad de GPx aunque no afectó a la actividad de SOD [Okatani y cols., 2002b,c]. La melatonina previene el daño oxidativo al DNA en cerebro de hembras SAMP6 [Morioka y cols., 1999], restaura el ratio ADP/O, estado 3 y DNP [Okatani y cols., 2002c] e induce el incremento de la actividad de los complejos I y IV en hígado de ratones SAMP8 [Okatani y cols., 2002b,c].

Por otro lado, se ha demostrado que además la melatonina reduce el estrés oxidativo en eritrocitos y plasma en SAMP8, en gran parte debido a una disminución de los niveles de GSH y un aumento del GSSG y TBARS con la consecuente inducción de las enzimas GPx y GRd [Nogués y cols., 2006].

En conclusión, estos resultados nos sugieren efectos beneficiosos de las acciones de la melatonina durante el proceso de envejecimiento.

— *Objetivos* —

Para realizar un estudio multifactorial del envejecimiento, el presente trabajo pretende estudiar, en ratones SAMP8 de envejecimiento acelerado frente a ratones SAMR1 normales, parámetros de estrés oxidativo y de longevidad tras el tratamiento con melatonina, un conocido antioxidante. Para ello, grupos de estos animales tratados con vehículo y melatonina, se sacrificarán a los 5 y 10 meses de edad para evaluar:

- el daño oxidativo mitocondrial a partir de la medida de la peroxidación lipídica (LPO), la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y reductasa (GRd), así como los niveles intramitocondriales de glutatión.

- la bioenergética mitocondrial a partir de la medida de la actividad los complejos de la cadena respiratoria (CTE) y en el contenido de ATP y el cociente ATP/ADP.

- algunos parámetros relacionados con la respuesta inflamatoria como son: medida de nitritos y citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , INF- γ , GM-GSF).

Los resultados obtenidos, permitirán, por primera vez, obtener una visión global del grado en que el daño mitocondrial por los radicales libres es responsable del envejecimiento, y cuáles son los mecanismos por los que actúan. Asimismo, los resultados nos permitirán evaluar los beneficios del tratamiento crónico con melatonina para prevenir dichos procesos ligados al envejecimiento.

— *Metodología* —

1.- GRUPO EXPERIMENTAL

Para realizar dicho estudio se van a utilizar ratones SAMP8 (ratones con senescencia acelerada) frente a ratones SAMR1 (ratones resistentes a la senescencia acelerada), obtenidos en Kioto (Japón) a través de Harlan, Barcelona, España.

Ambas cepas se encuentran en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada y se mantienen en condiciones estériles, bajo un ambiente de fotoperiodo (ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas), temperatura ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) y humedad ($40 \pm 5\%$) controlados, y con acceso libre al agua y a la comida (dieta estándar de laboratorio). Los animales se estudian a los 5 y 10 meses de edad. Las crías son separadas de sus madres al mes de edad y es en ese momento cuando se inicia el tratamiento con melatonina o con vehículo.

En cada cepa (SAMP8 y SAMR1) los animales se separan en los siguientes grupos experimentales (35 ratones/ grupo):

- a) Grupo R5v, que consiste en ratones SAMR1 tratados con vehículo de 1 a 5 meses de edad;
- b) Grupo P5v, que incluye ratones SAMP8 tratados con vehículos de 1 a 5 meses de edad;
- c) Grupo R10v, que incluye ratones SAMR1 tratados con vehículo de 1 a 10 meses de edad;
- d) Grupo P10v, que consiste en ratones SAMP8 tratados con vehículo de 1 a 10 meses de edad;
- e) Grupo R10m, que incluye ratones SAMR1 tratados con aMT de 1 a 10 meses de edad;
- f) Grupo P10m, que consiste en ratones SAMP8 tratados con aMT de 1 a 10 meses de edad;

La melatonina se disuelve en el mínimo volumen de etanol absoluto y posteriormente en el agua de bebida a una concentración tal que cada animal va a ingerir 10 mg/kg peso/día durante los meses de tratamiento. La concentración de etanol en la solución final fue de 0.066 %. Los biberones se cubrieron con papel de aluminio para protegerlos de la luz y evitar la degradación de la melatonina. El agua de bebida se cambió dos veces por semana.

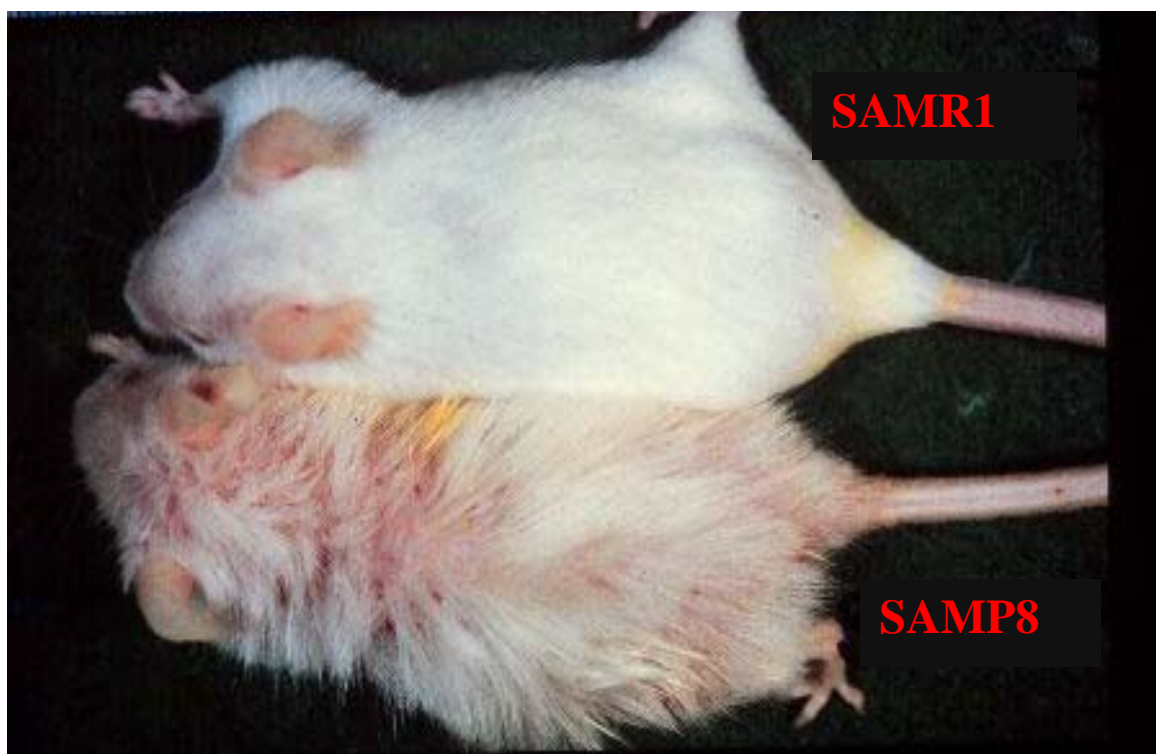


Figura 16. Ratones SAMR1 (resistentes al envejecimiento acelerado) y ratones SAMP8 (sensibles al envejecimiento acelerado) a los 10 meses de edad

Los estudios realizados se llevaron a cabo siguiendo la siguiente metodología:

- Para el estudio del daño oxidativo:
 - Determinación de la peroxidación lipídica (LPO) [Esterbauer y cols., Meth Enzymol 186: 407-421, 1990].
 - Determinación actividad GPx y GRd [Jaskot y cols., J Anal Toxicol 7: 86-88, 1983].
 - Determinación del índice GSSG/GSH [Hissin and Hilf, Anal Biochemistry 74: 214-226, 1976].

- Para el estudio de la bioenergética mitocondrial:
 - Determinación actividad CTE [Brusque y cols., Neurochem Int 40: 593-601, 2002 and Barrientos, Methods 26: 307-316, 2002; Escames y cols., J Pineal Res 40 (1):71-78, 2006.].
 - Determinación contenido ADP, AMP y ATP [Pissarek y cols., Brain Res Protoc 4: 314-321, 1999].

- Para el estudio de los parámetros relacionados con la respuesta inflamatoria:
 - Medida de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias [Bio-Plex Cytokine Assay, Bio Rad].
 - Determinación de los niveles de nitritos [Green y cols., Proc Natl Acad Sci USA 78: 7764, 1981].

Determinación de la concentración de proteínas [Lowry y cols., J Biol Chem 193: 265, 1951].

— *Resultados* —

1.- EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL EN RATONES SAMP8 Y SAMR1 HEMBRAS

1.1.- Diafragma (Exp Gerontol., 2007, Enviado)

Para iniciar el estudio del envejecimiento vamos a evaluar los cambios en el estado redox mitocondrial en mitocondrias de diafragma en hembras SAM, además de comprobar el papel del tratamiento crónico con aMT durante el proceso de envejecimiento.

A) Efectos sobre los niveles de peroxidación lipídica durante el envejecimiento

El grado de peroxidación lipídica es un interesante índice del daño provocado por los RL en las membranas biológicas. En el caso de los SAMR1 a los 5 y 10 meses de edad, tratados con vehículo, no se observan cambios en los niveles de LPO. Si se produce un aumento significativo en el caso de los ratones con senescencia acelerada, SAMP8 ($p < 0.001$). El tratamiento crónico con aMT tiende a disminuir los niveles de LPO en ratones SAMR1, y contrarresta el aumento producido por la edad en los SAMP8 ($p < 0.001$) (Figura 17).

B) Efectos sobre la actividad de GPx y GRd durante el envejecimiento

Es importante ver qué ocurre con la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GRd. Así observamos que durante el envejecimiento en ratones SAM, de los 5 a los 10 meses de edad, la actividad de la GPx disminuyó tanto en SAMR1 como en SAMP8 ($p < 0.001$). El tratamiento con aMT tiende a elevar la actividad de GPx en SAMR1, siendo significativo en el caso de los ratones SAMP8 ($p < 0.001$), que es incluso superior a la observada a los 5 meses de edad ($p < 0.001$). Además, esta actividad es tanto mayor en el caso de los ratones SAMP8 que en los SAMR1 ($p < 0.001$). (Figura 18, A). En el caso de la GRd, enzima de gran importancia para la célula, debido a su participación en la regeneración del GSH, notamos como durante el envejecimiento disminuye significativamente su actividad tanto en los ratones SAMR1 como en los SAMP8 ($p < 0.01$). El tratamiento con aMT contrarrestó parcialmente esta reducción en la actividad de GRd en los SAMR1. En el caso de SAMP8, el aumento de la actividad de la GRd inducido por el tratamiento con aMT fue superior al observado a los 5 meses de edad ($p < 0.001$).

Comparando SAMR1 con SAMP8, se observa que el tratamiento con aMT aumentó más la actividad de la GRd en los ratones SAMP8 que en los SAMR1 ($p < 0.001$). (Figura 18, B).

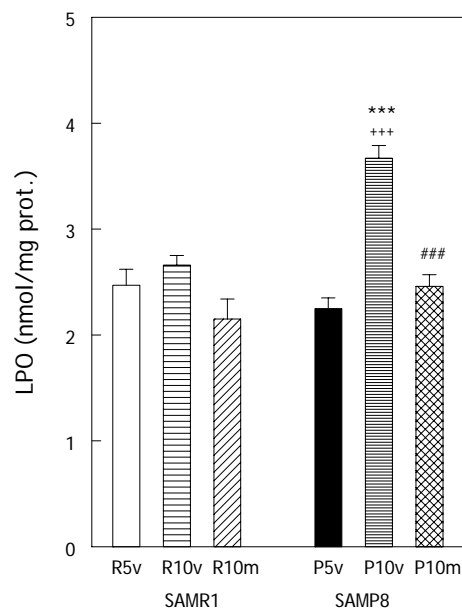


Figura 17. Efectos de la edad y el tratamiento con melatonina en los niveles de LPO en mitocondrias de diafragma de hembras SAMR1 y SAMP8. Los animales son tratados con vehículo (0.066% etanol) o melatonina (10 mg/kg) en el agua de bebida desde el primer mes después del nacimiento y sacrificados a los 4 o 9 meses siguientes. R5v y R10v, ratones SAMR1 tratados con vehículo y sacrificados a los 5 y 10 meses de edad; P5v y R10v, ratones SAMP8 tratados con vehículo y sacrificados a los 5 y 10 meses de edad; R10m y P10m, ratones SAMR1 y SAMP8 respectivamente, tratados con aMT y sacrificados a los 10 meses de edad. *** $p < 0.001$ comparados con R5v y P5v; ### $p < 0.001$ comparados con R10v o P10v; +++ $p < 0.001$ comparados SAMR1 con SAMP8

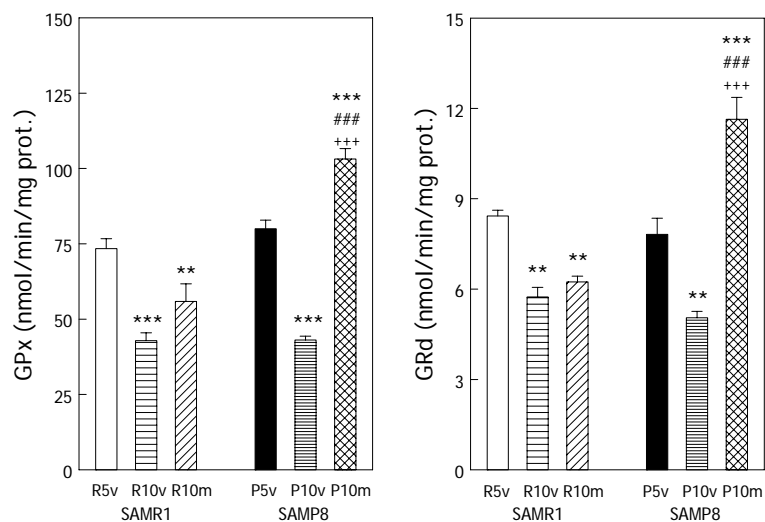


Figura 18. Efectos de la edad y el tratamiento con melatonina en la actividad de la glutación peroxidasa (GPx) (A) y glutación reductasa (GRd) (B) en mitocondrias de diafragma de hembras SAMR1 y SAMP8. (Ver leyenda de la figura 1 para información adicional). ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v y P5v; ### $p < 0.001$ comparados con R10v o P10v; +++ $p < 0.001$ comparados SAMR1 con SAMP8

C) Efectos sobre los niveles intramitocondriales de glutación durante el envejecimiento

La ratio GSH:GSSG es un indicador del estado redox intracelular. Durante el envejecimiento se produce una disminución significativa de dicho cociente en mitocondrias de diafragma en hembras SAMR1 ($p < 0.05$), pero este efecto es contrarrestado mediante el tratamiento crónico con aMT ($p < 0.05$). En el caso de los ratones con senescencia acelerada SAMP8, no hay diferencias significativas a lo largo del proceso de envejecimiento. En este caso, el tratamiento con aMT tiende a aumentar la ratio GSH:GSSG sobre los valores observados a los 5 meses de edad. Esta ratio fue significativamente menor en el caso de los ratones SAMP8 que en los SAMR1 a los 5 meses de edad ($p < 0.05$) (Figura 19, A). En cuanto a los niveles del glutación total (GSH+GSSG) se produjo una disminución en el grupo de ratones SAMR1 tratados con vehículo a los 10 meses de edad ($p < 0.001$). El tratamiento con aMT lo elevó significativamente ($p < 0.05$). No se produjeron cambios significativos en el caso de los ratones SAMP8. (Figura 19, B).

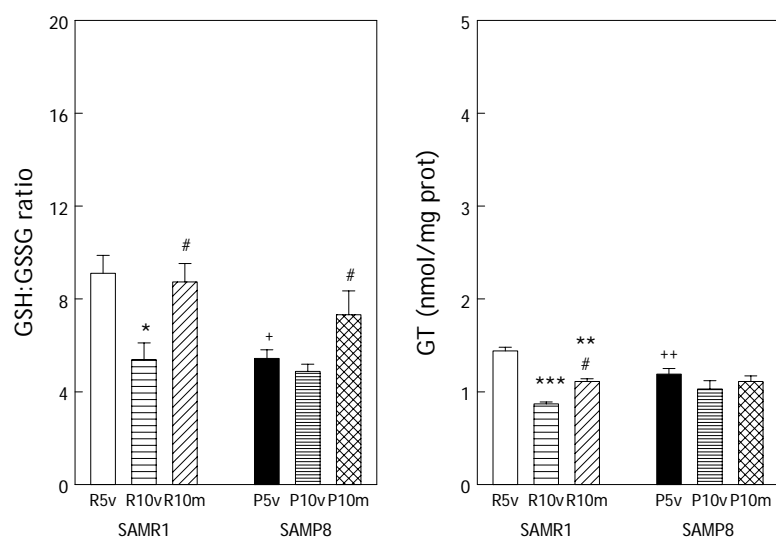


Figura 19. Efectos de la edad y el tratamiento con melatonina en el ratio GSH:GSSG (A) y en el contenido de glutatión total (B). (Ver leyenda de la figura 1 para información adicional). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v y P5v; # $p < 0.05$ comparados con R10v o P10v; + $p < 0.05$ y ++ $p < 0.01$ comparados SAMR1 con SAMP8

D) Efectos en la actividad de los complejos de la CTE durante el envejecimiento

En cuanto a la bioenergética mitocondrial, vamos a estudiar la actividad de los complejos I, II, III y IV como se muestran en la figura 20. No se producen diferencias significativas durante el envejecimiento en la actividad de los complejos I, II y III tanto en ratones SAMR1 como en SAMP8. Como signos de este proceso, sí se observa una disminución significativa en la actividad del complejo IV tanto en ratones SAMR1 ($p < 0.001$) como en SAMP8 ($p < 0.01$). El tratamiento crónico con aMT desde el primer mes al noveno, produce un aumento significativo en la actividad de los complejos II en ratones SAMR1 ($p < 0.05$) y en ratones SAMP8 ($p < 0.01$), en la actividad del complejo III tanto en SAMR1 como en SAMP8 ($p < 0.001$) y un aumento también significativo en la actividad del complejo IV en ratones SAMP8 ($p < 0.01$).

Se produce una disminución significativa en la actividad de los complejos III y IV en los ratones SAMP8 comparados con los SAMR1 a los 10 meses de edad tanto en los tratados con vehículo como en los tratados con aMT.

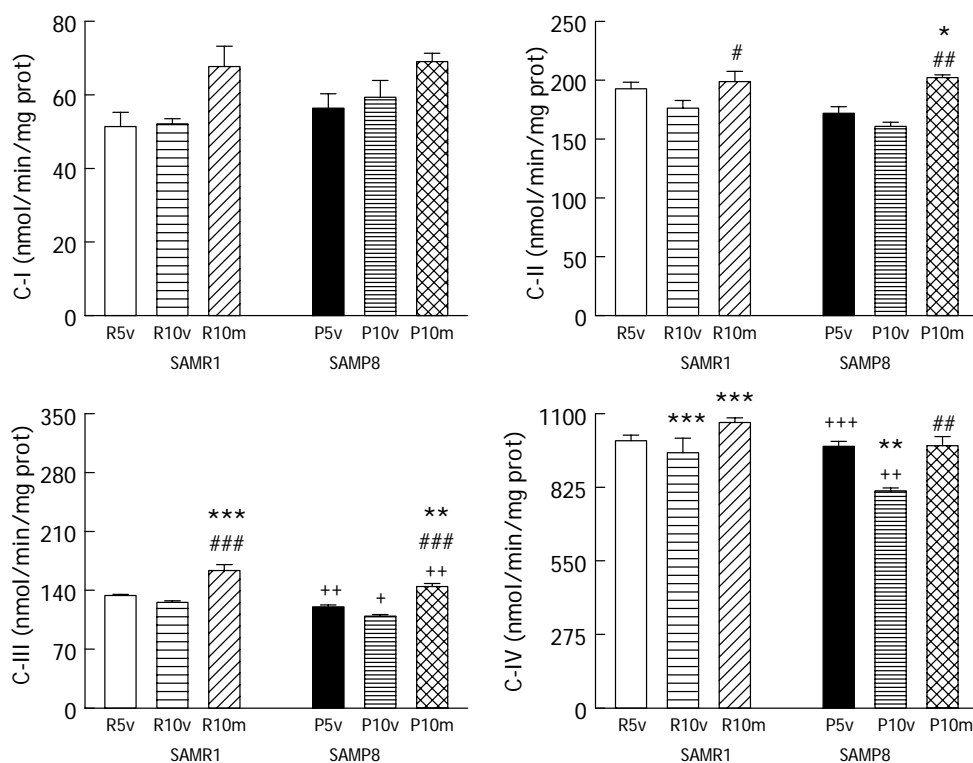


Figura 20. Efectos de la edad y el tratamiento con melatonina en la actividad de los complejos I, II, III y IV en mitocondrias de diafragma de hembras SAMR1 y SAMP8. (Ver leyenda de la figura 1 para información adicional). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v y P5v; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ comparados con R10v o P10v; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ y +++ $p < 0.001$ comparados SAMR1 con SAMP8

E) Efectos en el contenido de ATP y en el cociente ATP/ADP durante el envejecimiento

El aumento de la edad va acompañado de una disminución significativa en el contenido de ATP en ratones SAMP8 ($p < 0.05$). La administración de aMT, invirtió en parte dicha reducción ($p < 0.05$) (Figura 21, A). En cuanto al ratio ATP/ADP también disminuyó en los ratones SAMP8 con la edad ($p < 0.05$), un efecto contrareestado con el tratamiento con aMT ($p < 0.05$) (Figura 21, B).

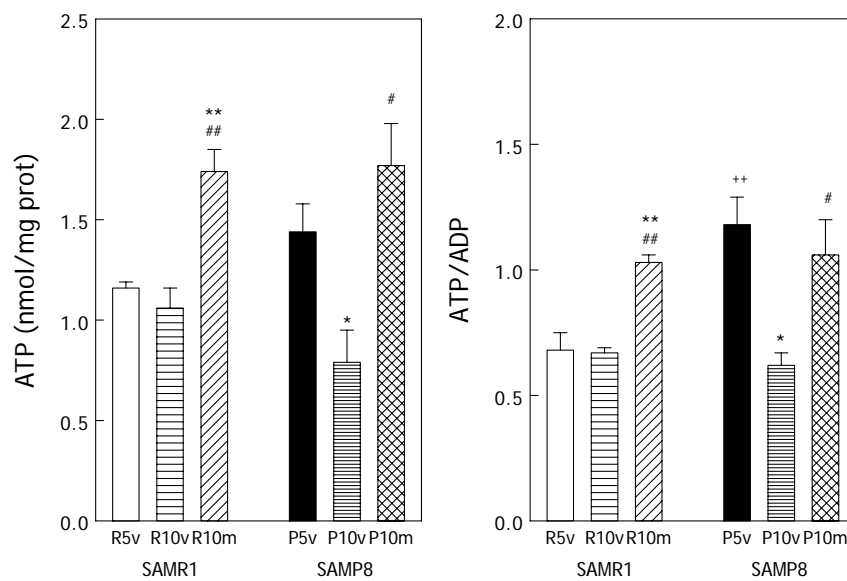


Figura 21. Efectos de la edad y el tratamiento con melatonina en el contenido de ATP (A) y en el ratio ATP/ADP (B) en mitocondrias de diafragma de hembras SAMR1 y SAMP8. (Ver leyenda de la figura 1 para información adicional). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ comparados con R5v y P5v; # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$ comparados con R10v o P10v; ** $p < 0.01$ comparados SAMR1 con SAMP8

1.2.- Corazón

En este caso se han estudiado las mitocondrias de corazón en ratones hembras SAMP8 y SAMR1 a los 5 y 10 meses de edad. El estrés oxidativo mitocondrial fue determinado midiendo los niveles de peroxidación lipídica, glutatión y glutatión disulfido y la actividad de la glutatión peroxidasa y reductasa. La función mitocondrial fue evaluada por la medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y el contenido de ATP. Los resultados muestran un daño oxidativo dependiente del proceso de envejecimiento en el corazón de los ratones SAMP8, acompañado de una reducción de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria, así como de los niveles de ATP. Los resultados respaldan la presencia de estrés oxidativo mitocondrial en los ratones SAMP8 a los 10 meses de edad y sugieren efectos beneficiosos por la intervención farmacológica crónica con melatonina, la cual reduce los cambios funcionales oxidativos en las mitocondrias cardíacas con la edad.

Estos resultados han sido objeto de la siguiente publicación:

Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac
mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice
(**Free Radic Res.**, 41: 15-24, 2006)

Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice

MARÍA I. RODRÍGUEZ¹, MIGUEL CARRETERO¹, GERMAINE ESCAMES¹, LUIS C. LÓPEZ¹,
MARÍA D. MALDONADO², DUN-XIAN TAN², RUSSEL J. REITER², &
DARÍO ACUÑA-CASTROVIEJO^{1,3}

¹*Departamento de Fisiología, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Granada, Spain,* ²*Department of Cellular and Structural Biology, The University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA,* and ³*Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain*

Accepted by Professor M. Jackson

(Received 7 June 2006; in revised form 17 July 2006)

Abstract

Heart mitochondria from female senescence-accelerated (SAMP8) and senescence-resistant (SAMR1) mice of 5 or 10 months of age, were studied. Mitochondrial oxidative stress was determined by measuring the levels of lipid peroxidation, glutathione and glutathione disulfide and glutathione peroxidase and reductase activities. Mitochondrial function was assessed by measuring the activity of the respiratory chain complexes and ATP content. The results show that the age-dependent mitochondrial oxidative damage in the heart of SAMP8 mice was accompanied by a reduction in the electron transport chain complex activities and in ATP levels. Chronic melatonin administration between 1 and 10 months of age normalized the redox and the bioenergetic status of the mitochondria and increased ATP levels. The results support the presence of significant mitochondrial oxidative stress in SAM mice at 10 months of age, and they suggest a beneficial effect of chronic pharmacological intervention with melatonin, which reduces the deteriorative and functional oxidative changes in cardiac mitochondria with age.

Keywords: *Ageing, mitochondria, heart, oxidative damage, melatonin treatment*

Introduction

Ageing is characterized by a loss of physiological capacities of the organism. Among other theoretical and experimental proposals, the free radical theory of ageing [1] suggests that ageing is caused by free radicals produced during aerobic respiration; these radicals induce oxidative damage that accumulates over time [2–4]. Mitochondria, the main source of free radicals in the cell, produce reactive oxygen species (ROS) through the univalent reduction of oxygen as electrons escape the respiratory chain. These ROS include superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and the hydroxyl radical (HO^{\cdot}) [1,2]. Since mtDNA

and proteins are located near the electron transport chain (ETC), these molecules readily sustain oxidative damage from ROS and equally toxic reactive nitrogen species (RNS) [5,6]. These findings connect the general and the mitochondrial theories of ageing, with the latter suggesting that senescence should be accompanied by changes in the redox status of the cell [7].

The senescence-accelerated mouse (SAMP8) is established as a murine model of accelerated ageing [8–11]. SAMP-strain mice show relatively strain-specific age-associated phenotypic pathologies such as a shortened life span and early manifestation of senescence (including loss of activity, alopecia, lack

Correspondence: D. Acuña-Castroviejo, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Avenida de Madrid 11, E-18012 Granada, Spain. Tel: 34 958 246630. Fax: 34 958 246295. E-mail: dacuna@ugr.es

of hair glossiness, skin coarseness, periphthalmic lesions, increased lordokyphosis and systemic senile amyloidosis), similar to several geriatric disorders observed in humans [8–11]. Compared with the senescence resistant, long-lived mice (SAMR1), SAMP8 mice display a shorter lifespan [8,9]. One possible mechanism promoting accelerated aging and death in SAMP8 mice is their hyperoxidative status compared with that in the SAMR1 [10,11]. Many of the studies conducted to test this hypothesis have used the brain as the experimental tissue, although different patterns of age-dependent increases in both lipid peroxidation (LPO) and superoxide dismutase (SOD) activity have been reported in other organs [12–14]. While high redox state and increased electron leakage from brain mitochondria were reported in 3-month-old mice, [13], other studies reported no significant differences in mitochondrial respiration between SAMP8 and SAMR1 until 12 months of age [15]. It was proposed that, at 18 months of age, respiratory control may be insufficient to provide the ATP synthesis necessary for normal cell metabolism [16]. These data suggest the existence of a mild deficiency in the mitochondrial ETC in young mice before age-associated mitochondrial dysfunction develops. The reduced (GSH) to disulfide glutathione (GSSG) ratio, a highly sensitive indicator of the cellular redox state [17], shifts toward oxidation during aging in mitochondria from several tissues including heart, liver, lung and kidney of SAMP8 mice [18–21].

Melatonin (aMT) is a ubiquitously acting direct free radical scavenger and also an indirect antioxidant [22,23]. aMT is highly efficient in detoxifying the devastatingly toxic HO[•] [24,25] and H₂O₂ [26], and it also directly interacts with RNS [27]. aMT also stimulates a host of antioxidative enzymes including SOD, glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GPx); these actions further reduce the oxidation state of cells [23,28]. Multiple lines of recently accumulated evidence suggest that aMT plays a protective role in both initial and advanced stages of conditions whose pathogenesis involves damage by oxygen- and nitrogen-based reactants [29–32]. Considering that some antioxidants have been reported to increase survival of SAMP8 mice [12], the use of aMT as an age-deferring therapy in this species also seems feasible.

Although mitochondrial production of free radicals increases with advancing age [18–21], it is yet unclear the age at which ROS initiate the senescence stage in SAMP8 mice. Because at 3–5 months of age SAMP8 mice show early signs of oxidative stress compared with SAMR1 mice, and at the age of 11 months these signs are more evident [11–13], we considered it worthwhile to assess the differences in the mitochondrial oxidative stress between 5 and 10 months of age, a period of time that may mark the difference between SAMP8 and SAMR1 mice in terms of mitochondrial

oxidative damage. Moreover, there are no data regarding the potentially beneficial role of chronic aMT treatment in terms of reducing age-dependent mitochondrial oxidative damage, and whether this treatment has any yet-undiscovered side effect. To address these questions, we designed a long-term study to evaluate the changes in mitochondrial redox status during age in heart mitochondria from female SAMP8 and SAMR1 mice. Animals were treated with vehicle or aMT from 1 to 10 months of age, and the mitochondrial redox status and ETC activity were assessed. We chose heart mitochondria since this muscle has a high bioenergetic requirement, and their involvement in aging of SAMP8 mice is yet unclear.

Materials and methods

Reagents

N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, EGTA, EDTA, Hepes, bovine serum albumin (BSA), proteinase K, Percoll, sulfanilamide, phosphoric acid, 1,4-dithio DL-threitol (DTT), NADPH, methanesulfonic acid, disulfide and reduced glutathione, glutathione reductase, 5-sulfosalicylic acid, 2-vinylpyridine, cumene hydroperoxide, 5,5'-dithiolbis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and mannitol were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). All other reagents were of the highest purity available.

Animals and treatments

Female SAMP8 and their control SAMR1 mice breeding pairs were obtained from the Council for SAM Research, Kyoto, Japan, through Harlan (Barcelona, Spain). The animals were maintained in the University's facility under a 12–12 h light–dark cycle (lights on at 07:00 h) at 22 ± 1°C and they were given regular chow and tap water, under the supervision of veterinarians. All experiments were performed according to the Spanish Government Guide and the European Community Guide for animal care.

Animals were used at 5 and 10 months of age. Once newborn mice were separated from their mothers (at the age of 1 month), aMT or vehicle treatments were initiated. The animals were separated into the following groups (*n* = 35 animals/group): (a) R5v group, consisting of SAMR1 animals treated with vehicle from 1 to 5 months of age; (b) P5v group, included SAMP8 mice treated with vehicle from 1 to 5 months of age; (c) R10v group, included SAMR1 mice treated with vehicle from 1 to 10 months of age; (d) P10v group, consisted of SAMP8 mice treated with vehicle from 1 to 10 months of age; (e) R10m group, included SAMR1 mice treated with aMT from 1 to 10 months of age, and (f) P10m group, consisting of SAMP8 mice treated with aMT from 1 to 10 months of age. aMT was dissolved in a minimum volume of absolute ethanol and then diluted in the drinking water

to yield a dose of 10 mg/kg b.w. during the months of treatment. The concentration of ethanol in the final solution was 0.066%. Water bottles were covered with aluminum foil to protect from light, and the drinking fluid was changed twice weekly. All mice were killed at the end of their respective treatment period, i.e. 5 or 10 months.

Isolation of mitochondria

Animals were killed by cervical dislocation and heart mitochondria were immediately isolated [29]. All procedures were carried out at 0–4°C. Briefly, the heart was excised, washed with saline, treated with proteinase K (1 mg/ml) for 30 s, washed with buffer A (250 mM mannitol, 0.5 mM EGTA, 5 mM Hepes and 0.1% fatty acid free BSA, pH 7.4, at 4°C), and homogenized (1/10, w/v) in buffer A at 800 rpm with a Teflon pestle. The homogenate was centrifuged at 600g for 5 min at 4°C (twice), and the supernatants were mixed and centrifuged at 10,300g for 10 min at 4°C. Then, the mitochondrial pellets were suspended in 0.5 ml buffer A and poured in ultracentrifuge tubes containing 1.4 ml buffer B (225 mM mannitol, 1 mM EGTA, 25 mM Hepes and 0.1% BSA and pH 7.4, 4°C) and 0.6 ml Percoll. The mixture was centrifuged at 105,000g for 30 min at 4°C. The fraction with a density of 1.052–1.075 g/ml, corresponding to a pure mitochondrial fraction, was collected, washed twice with buffer A at 10,300g for 10 min at 4°C to remove the Percoll, and frozen to –80°C. Mitochondrial protein content was determined in an aliquot of homogenized cardiac mitochondria without BSA [33].

LPO determination

Mitochondrial fractions were thawed, suspended in ice-cold 20 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, and sonicated to break mitochondria membranes. Aliquots of these samples were either stored at –80°C for total protein determination [33] or used for LPO measurements. For this purpose, a commercial LPO assay kit that estimated both malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals (4HDA) was used (Bioxytech LPO-568 assay kit, OxisResearch, Portland, OR, USA) [34]. LPO concentration is expressed in nmol/mg prot.

Measurements of GPx and GRd activities

Mitochondrial fractions were thawed and suspended in 200 µl of buffer A (potassium-phosphate 50 mM and EDTA-K2 1 mM, pH 7.4) and sonicated. To measure GPx activity, 10 µl of each sample were added to 240 µl of a working solution containing buffer A plus 4 mM sodium azide, 4 mM GSH, 0.2 mM NADPH and 0.5 U/ml GRd. After incubation for 4 min at 37°C, the reaction was started by adding 10 µl of cumene hydroperoxide (0.3%) and the

GPx activity was determined following the oxidation of the NADPH for 3 min at 340 nm in an UV spectrophotometer (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany) [35]. GRd activity was measured in samples (35 µl) added to 465 ml of a working solution containing buffer A plus 2 mM GSSG. After incubation for 4 min at 37°C, the reaction was started by adding 8.5 µl of 9.5 mM NADPH solution, and the GRd activity was measured following the oxidation of NADPH for 3 min at 340 nm (UV-1603 Shimadzu spectrophotometer). GPx and GRd activities are expressed as nmol/min/mg prot. In both cases, non-enzymatic NADPH oxidation was subtracted from the overall rates.

Measurements of GSH and GSSG

Both GSH and GSSG were measured by a slight modification of an established fluorometric method [36]. Mitochondrial fractions were deproteinized with ice-cold 10% TCA and centrifuged at 20,000g for 15 min. For GSH measurement, 10 µl supernatant was incubated with 10 µl of an ethanol ophthalmaldehyde solution (1 mg/ml) and 180 µl phosphate buffer (100 mM sodium phosphate, 5 mM EDTA-Na₂, pH 8.0) for 15 min at room temperature. Then, the fluorescence of the samples was measured at 340 nm excitation and 420 nm emissions in a plate-reader spectrofluorometer (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, USA). For GSSG measurement, 30 µl aliquots of supernatants were preincubated with 12 µl N-ethylmaleimide solution (5 mg/ml in distilled water) for 40 min at room temperature, and then alkalized with NaOH 0.1 N. Aliquots of 45 µl were then incubated with 10 µl ophthalmaldehyde solution and 145 µl NaOH 0.1 N for 15 min at room temperature. The fluorescence was then measured. GSH and GSSG concentrations were calculated according to standard curves prepared accordingly. The levels of GSH and GSSG are expressed in nmol/mg prot.

Determination of mitochondrial complexes I, II, III and IV activities

Mitochondrial pellets were thawed, suspended in 350 µl of the incubation medium corresponding to the complex to be measured and immediately sonicated to prepare submitochondrial particles. Mitochondrial protein concentration was measured using BSA as standard [33]. To determine the complex I activity, submitochondrial fractions (0.6 mg/ml) were incubated for 3 min in a medium containing 250 mM sucrose, 50 mM potassium-phosphate, 1 mM KCN, 50 µM decylubiquinone, 0.8 µM antimycin, pH 7.4. The reaction was initiated by the addition of NADH, and the activity of the complex I (NADH CoQ oxidoreductase, expressed as nmol oxidized NADH/min/mg prot) was measured following the rate of the

oxidation of NADH (100 μ M) at 340 nm in a UV1603 Shimadzu spectrophotometer (IZASA, Seville, Spain) [37]. The activity of complex II (succinate: DCIP oxireductase, expressed in nmol reduced DCIP/min/mg prot) was measured in 1 ml medium containing submitochondrial particles (0.03 mg/ml), 100 mM potassium-phosphate, 0.5 M succinate, 0.8 μ M antimycin, 50 μ M rotenone, 2 μ M KCN, 50 μ M DCIP, pH 7.4. The reaction was initiated by the addition of 50 μ M decylubiquinone. The activity of complex II was measured following the rate of reduction of 2, 6-DCIP at 600 nm with 520 nm as reference wavelength [38]. The activity of complex III (ubiquinol: cytochrome *c* reductase, expressed in nmol reduced cytochrome *c*/min/mg prot) was measured in 1 ml medium containing submitochondrial particles (0.03 mg/ml), 35 mM potassium-phosphate, 5 mM MgCl₂, 2.5 mg/ml BSA, 1.8 mM KCN, 50 mM rotenone and 2 mM decylubiquinone, pH 7.5. The reaction was started by adding 125 μ M cytochrome *c* and the activity of complex III was measured following the rate of reduction of cytochrome *c* at 550 nm with 580 nm as the reference wavelength [38]. The activity of complex IV (cytochrome *c* oxidase, expressed as nmol oxidized cytochrome *c*/min/mg prot) was measured in 1 ml medium containing submitochondrial particles (0.1 mg prot/ml) and 50 mM potassium-phosphate, pH 6.8. The reaction was initiated by adding 75 μ M cytochrome *c* previously reduced with sodium borohydride and measuring the absorbance at 550 nm [38].

Measurements of mitochondrial content of adenine nucleotides

Adenine nucleotides were determined by HPLC with a ProPac PA1 column (4 \times 250 mm: Dionex) and a binary gradient of 0.3 M ammonium carbonate and water [39]. Purified mitochondria were rapidly resuspended in ice-cold 0.5 M perchloric acid, mixed during 120 s in vortex (to break the mitochondrial membranes) and centrifuged at 25,000g for 15 min at 2°C to precipitate proteins. Pellets were frozen to -80°C to determine protein concentration [33] and the supernatants were mixed with 8 μ l 5 M potassium carbonate to neutralize the acid and centrifuged at 12,000g for 10 min at 2°C. The resultant supernatants were used for HPLC measurements. After stabilizing the column with the mobile phase, 20 μ l of each sample were injected onto the HPLC system. The mobile phase consisted in water (phase A) and 0.3 M ammonium carbonate pH 8.9 (phase B), and the following time schedule for the binary gradient (flow rate 1 ml/min) was used: 5 min, 50% A and 50% B; 5 min 50–100% B and then maintained 100% B during 25 min; 5 min 100–50% B and then another 5 min with 50% B [39]. For calibration, water was used as blank and 3.125, 6.250, 12.5 and 25 μ g/ml of

each nucleotide (AMP, ADP and ATP) were used for constructing the standard curves. Absorbance of the samples was measured with an UV detector at 254 nm wavelength and the concentration of each nucleotide in the sample was calculated based on the peak area.

Statistics

Data are expressed as the mean \pm SEM of at least six animals analyzed in duplicate. An ANOVA followed by Student's *t*-test was used to compare the means between groups. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Mitochondrial oxidative stress

Figure 1 shows the changes in LPO levels in SAMR1 and SAMP8 mice. Age did not change the cardiac mitochondria levels of LPO in SAMR1 mice, but

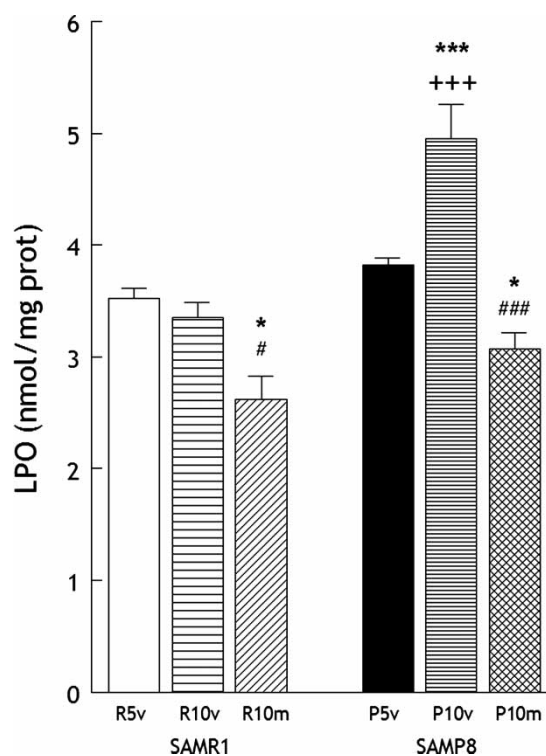


Figure 1. Effect of age and aMT treatment on the LPO levels in heart mitochondria from female SAMR1 and SAMP8 mice. Animals were given vehicle (0.066% ethanol) or aMT (10 mg/kg) in the drinking water from 1 month after birth, and sacrificed 4 or 9 months later (at 5 and 10 months of age, respectively). Results are expressed as a mean \pm SEM of six experiments measured in duplicate. R5v and R10v, SAMR1 animals treated with vehicle and sacrificed at 5 and 10 months of age; P5v and P10v, SAMP8 mice treated with vehicle and sacrificed at 5 and 10 months of age; R10m and P10m, SAMR1 and SAMP8 animals, respectively, treated with aMT and sacrificed at 10 months of age. **p* < 0.05 and ****p* < 0.001 compared with R5v or P5v; #*p* < 0.05 and ###*p* < 0.001 compared with R10v or P10v; +++*p* < 0.001 compared with the same group of SAMR1 mice.

increased them in SAMP8 animals ($p < 0.001$). After aMT treatment, the levels of LPO in SAMR1 mitochondria decreased significantly ($p < 0.05$), reaching lower levels than those found at the age of 5 months. aMT also counteracted the age-dependent increase of LPO levels in SAMP8 mice ($p < 0.001$), and reduced them below the levels detected in mitochondria harvested at 5 months of age ($p < 0.05$).

The activity of GPx did not change in cardiac mitochondria SAMR1 mice with age, whereas it decreased in SAMP8 mice ($p < 0.001$) (Figure 2A). aMT treatment reduced the activity of GPx in SAMR1 mice below its activity at 5 months of age ($p < 0.01$), and partially counteracted the age-dependent GPx activity reduction in SAMP8 mice ($p < 0.01$). The activity of GPx after aMT treatment was significantly higher in mitochondria of SAMP8 than in SAMR1 mice ($p < 0.01$). At 5 months of age, SAMP8 mice showed higher activity of mitochondrial GPx than SAMR1 mice ($p < 0.05$). Age induced significant reductions in GRd activity in both SAMR1 cardiac mitochondria ($p < 0.001$) and SAMP8 ($p < 0.05$) mice (Figure 2B). Treatment with aMT, which partially counteracted the age-dependent reduction in GRd activity in SAMR1 mice, elevated the GRd activity above its activity at 5 months of age in SAMP8 mice ($p < 0.01$).

Age reduced the GSH:GSSG ratio SAMR1 cardiac mitochondria ($p < 0.01$), an effect counteracted by aMT treatment (Figure 3A). In SAMP8 mice, aMT increased the mitochondrial GSH:GSSG ratio above

the values at 5 months of age. The GSH:GSSG ratio in SAMP8 was lower than in SAMR1 mice. Levels of mitochondrial total glutathione were similar in all experimental groups except for the SAMP8 mice treated with aMT, where a significant rise in total glutathione was measured ($p < 0.001$); this increase was mainly due to an elevation in GSH (3.18 ± 0.1 vs. 1.19 ± 0.05 nmol/mg prot, $p < 0.001$) (Figure 3B).

Mitochondrial respiratory chain activity and ATP content

The activities of the mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV are shown in Figure 4. The activity of the complex I (Figure 4A) increased after aMT treatment ($p < 0.01$). aMT treatment also stimulated the activity of the complex I above the values found at 5 months in SAMP8 mice ($p < 0.05$). The activity of complex II significantly decreased with age in SAMR1 and SAMP8 mice, although in this case, aMT treatment was unable to modify these values (Figure 4B). In the case of complex III, its activity dropped with age in SAMR1 and SAMP8 mice, an effect counteracted by aMT administration (Figure 4C). Advancing age was also associated with a reduction in the activity of complex IV in SAMP8 but not in SAMR1 mice (Figure 4D). The activity of complex IV did not change in SAMR1 mice after aMT treatment. However, aMT counteracted the age-dependent decrease in complex IV activity in SAMP8 mice ($p < 0.05$). Increasing age was accompanied by a loss of cardiac mitochondrial ATP content in SAMR1

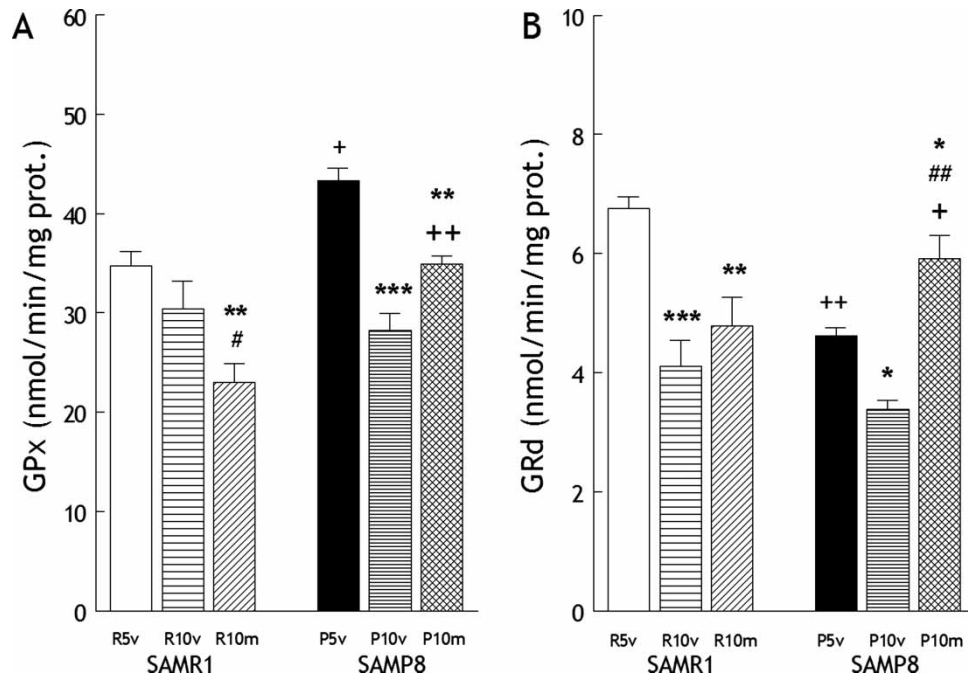


Figure 2. Effect of age and aMT treatment on the glutathione peroxidase (GPx) (A) and glutathione reductase (GRd) (B) activities in heart mitochondria from female SAMR1 and SAMP8 mice. See legend of Figure 1 for additional information. Results are expressed as a mean \pm SEM value of six experiments measured in duplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with R5v or P5v; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ compared with R10v or P10v; + $p < 0.05$ and ++ $p < 0.01$ compared with the same group of SAMR1 mice.

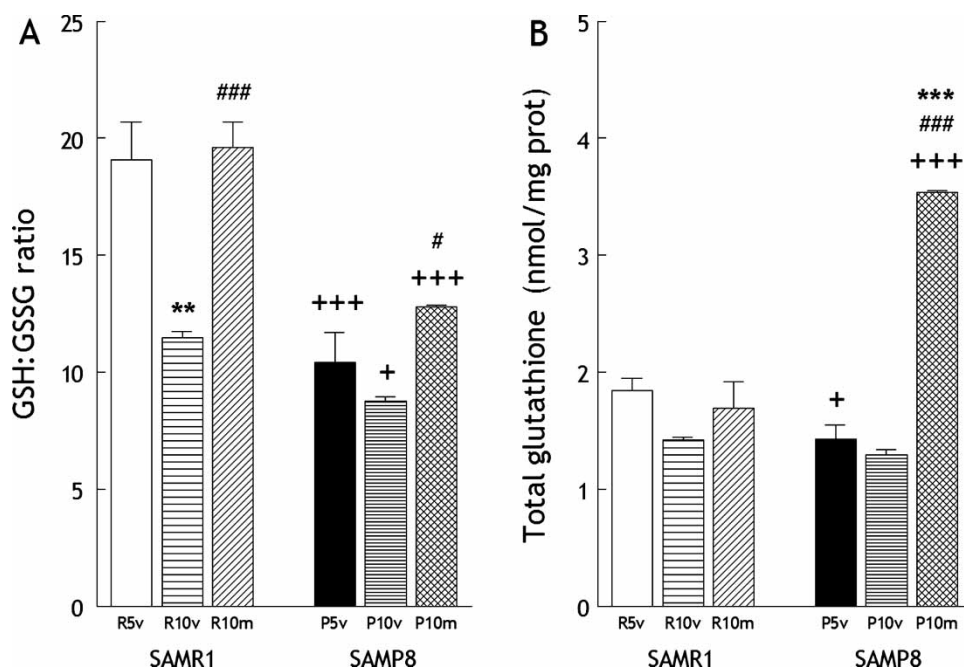


Figure 3. Effect of age and aMT treatment on the reduced to disulfide glutathione (GSH:GSSG) ratio (A) and total glutathione content (B) in heart mitochondria from female SAMR1 and SAMP8 mice. See legend of Figure 1 for additional information. Results are expressed as a mean \pm SEM value of six experiments measured in duplicate. ** p < 0.01 and *** p < 0.001 compared with R5v or P5v; # p < 0.05 and ### p < 0.001 compared with R10v or P10v; + p < 0.05 +++ p < 0.001 compared with the same group of SAMR1 mice.

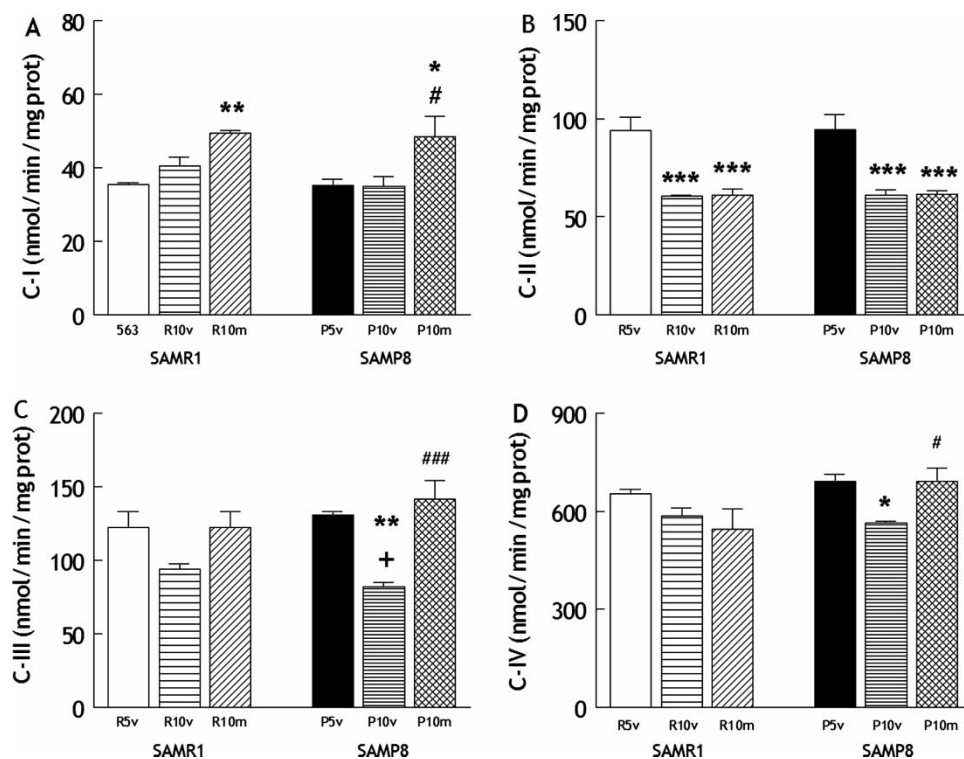


Figure 4. Effect of age and aMT treatment on the complex I (A), II (B), III (C) and IV (D) activities in heart mitochondria from female SAMR1 and SAMP8 mice. See legend of Figure 1 for additional information. Results are expressed as a mean \pm SEM value of six experiments measured in duplicate. * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 compared with R5v or P5v; # p < 0.05 and ### p < 0.001 compared with R10v or P10v.

mice that was more conspicuous in SAMP8 mice (Figure 5A, $p < 0.001$). Administration of aMT reversed, in part, the reduction of cardiac mitochondrial ATP in SAMP8 mice ($p < 0.01$). The ATP/ADP ratio also diminished in SAMP8 with age ($p < 0.01$), an effect counteracted by aMT treatment (Figure 5B, $p < 0.01$).

Discussion

Damage to mitochondria as a result of the intrinsic generation of free radicals is theoretically involved in the process of cellular aging. Our study documents the existence of age-dependent oxidative stress in heart mitochondria of SAMR1 and SAMP8 mice. Accordingly, with most of the oxidative stress markers measured, SAMP8 mice showed significantly higher mitochondrial oxidative damage than the corresponding SAMR1 groups of mice. Moreover, aMT given in the drinking water beginning at 1 month and continuing for 9 months, counteracted the age-dependent oxidative damage and mitochondrial dysfunction in SAMP8 mice, and also corrected the minor alterations present in the cardiac mitochondria of SAMR1 mice. Finally, aMT treatment restored the ability of cardiac mitochondria to produce ATP. The data document that exogenously administered aMT for long intervals protects against age-dependent oxidative stress and cardiac mitochondrial dysfunction. No side-effects of aMT treatment were noted in this study.

Several lines of evidence document an increased susceptibility of SAMP8 mice to oxidative damage; the resulting dysfunction is associated with accelerated aging [11–16,18–21]. Thus, SAM mice represent a good model to study the age-dependent induction of oxidative stress and its role on mitochondrial function in a variety of organs including the heart. Our results show that, especially at the age of 10 months, SAMP8 mice exhibited greater cardiac oxidative stress than did 10-month-old SAMR1 mice. The presence of oxidative stress in mitochondria would be expected to be accompanied by changes in LPO and GSH, damage to the mitochondrial ETC and deficits in ATP production. The present findings show that LPO levels increased in cardiac mitochondria of SAMP8 mice at the age of 10 months, whereas they remained unchanged in SAMR1 mice at the same age. This difference very likely reflects the higher ROS generation in the former due to the accelerated aging [13–15]. The increased LPO is also consistent with the reduced mitochondrial membrane fluidity found in aging female SAMP8 mice [40]. Moreover, it was recently found that MDA, a product of LPO, induces oxidative damage to aconitase and ATP synthase in heart and skeletal muscle [16], a finding also consistent with the reduction in the ATP content in mitochondria from 10-month-old SAMP8 mice as reported herein.

The redox status of a tissue is reliably reflected by the GSH:GSSG ratio [17,41]. Rises in GSSG reflects the gap between the rates of GSSG formation and its

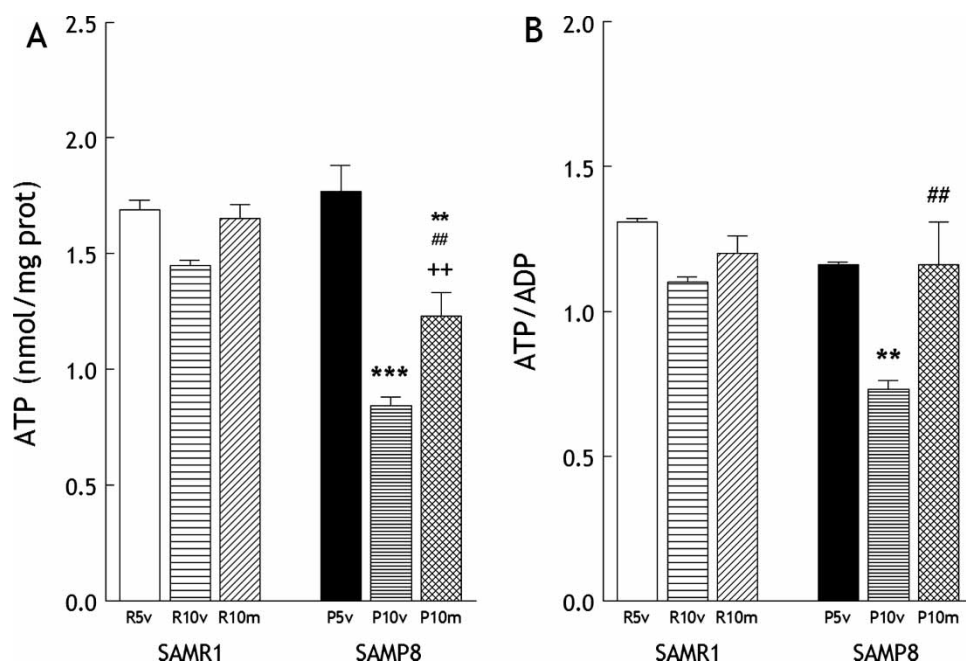


Figure 5. Effect of age and aMT treatment on the ATP content (A) and the ATP/ADP ratio (B) in heart mitochondria from female SAMR1 and SAMP8 mice. See legend of Figure 1 for additional information. Results are expressed as a mean \pm SEM value of six experiments measured in duplicate. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with R5v or P5v; ## $p < 0.01$ compared with R10v or P10v; ++ $p < 0.01$ compared with the same group of SAMR1 mice.

reconversion to GSH, whereas the GSH:GSSG ratio is indicative of the overall redox state. Under normal conditions, a lower oxidant load and a higher biosynthetic activity are associated with high GSH levels. This occurs under conditions of caloric restriction which attenuates the rates of mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 production [42,43]. Our data show that 5-month-old SAMP8 mice already exhibited a lower mitochondrial GSH:GSSG ratio than age-matched SAMR1 mice with this difference being maintained when the animals reached 10 months of age. These findings reflect an oxidizing tendency of the mitochondria due to higher ROS production in SAMP8 [18].

Total glutathione content of the heart mitochondria was generally reduced in SAMP8 mice at 5 and 10 months of age compared with levels in SAMR1 mice; this change was mainly dependent on a reduction in mitochondrial GSH levels. Since mitochondria do not synthesize GSH, its reduction was likely due to a reduced transport of cytosolic GSH into mitochondria, a finding also reported for SOD in SAM mice [19]. During detoxification of H_2O_2 , GPx oxidizes GSH to GSSG. Thereafter, GRd reduces GSSG to GSH to maintain the GSH pool. At 5 months of age, SAMP8 heart mitochondria showed higher GPx activity than did SAMR1 animals, reflecting a condition of higher peroxide production in the former. The subsequent deficit in GSH in 10-month-old SAMP8 mice determined the reduction in GPx activity found in these mice. GRd activity was lower in SAMP8 than in SAMR1 mitochondria at 5 and 10 months of age. GRd is highly sensitive to oxidative stress, which may irreversibly damage the enzyme, reducing its ability to recycle GSH [28]. Again, our data suggest that SAMP8 mice were under higher oxidative stress than were SAMR1 animals.

Major questions remaining are whether the signs of oxidative stress present in cardiac mitochondria of SAMP8 mice are a prelude to mitochondrial failure and, if so, whether they may be in part responsible for the shorter life span in SAMP8 compared to SAMR1 mice. Accompanying ROS induction in mitochondria, the concomitant protein thiolation may represent a subsequent event responsible for many of the alterations including bioenergetics failure that appear later [18]. These alterations may also underlie the age-related impairment of mitochondrial respiration observed in liver mitochondria as well. It has been calculated that, at the age of 18 months, hepatic mitochondria from SAMP8 animals are unable to produce sufficient amounts of ATP for normal cell metabolism [21]. In the present study, we found an age-dependent reduction in the activity of the respiratory complexes II, III and IV in heart mitochondria from SAMP8 mice, whereas only complex II activity was reduced in SAMR1 animals. At 5 months of age, the activities of the four ETC complexes were similar

in SAMR1 and SAMP8 mice. The age-associated damage is greater in mitochondria of SAMP8 mice than in this organelle of SAMR1 animals, possibly as a result of uncoupling caused by membrane damage [21]. The increased LPO levels in 10-month-old SAMP8 mitochondria found herein further support this hypothesis. Subsequent to mitochondrial ETC impairment was the significant reduction in the synthesis of mitochondrial ATP measured in SAMP8 mice at 10 months of age, a finding absent in SAMR1 mice.

The antioxidative properties of aMT and, specifically, its role in reducing mitochondrial oxidative damage, are now apparent. Several studies have reported that acute aMT administration, an antioxidant and free radical scavenger [22–26], counteracted mitochondrial deficiencies in SAM mice [44–46]. *In vitro*, nanomolar concentrations of aMT normalized the GSH pool and increased the activity of antioxidant enzymes including GPx and GRd in GSH-depleted mitochondria [28,32]. aMT also stimulated the activities of the ETC complexes both *in vivo* and *in vitro* [29,47,48], thereby improving the ability of mitochondria to produce ATP [47,49]. Based on careful observations made at the time the animals were killed and considering the beneficial measurements made in cardiac mitochondria, side effects of chronic aMT administration were either non-existent or negligible.

The current findings with chronic aMT administration to SAMP8 mice support the concept that the indoleamine exerts profound protective effects against mitochondrial dysfunction which are results of oxidative stress. In fact, aMT reduced LPO in cardiac mitochondria of SAMP8 mice to values below those found at 5 months of age not only in SAMP8 mice but also in SAMR1. aMT is highly lipophilic, enabling it to readily cross a variety of membranes and enter both cytoplasm and nuclear compartments. When aMT enters cellular membranes, it mainly becomes situated in a superficial position in lipid bilayers near the polar heads of membrane phospholipids [50]. In this position aMT is well situated to function as a free radical scavenger; this may be an important way in which membranes are able to resist oxidative damage. The antioxidative ability of aMT was also reflected by the significant increase in the GSH:GSSG ratio in SAMR1 and SAMP8 mice. These effects of aMT, and its ability to increase total glutathione content in mitochondria, mainly due to an elevation of GSH, may further document a stimulatory action of aMT on the activity of gamma-glutamylcysteine synthetase, the regulatory enzyme of GSH synthesis [51]. Moreover, aMT increased the activity of GPx and GRd in SAMP8 mice, increasing the bioavailability of GSH in the mitochondria.

An unexpected finding was that aMT reduced the activity of GPx in SAMR1 mice. aMT is a direct free

radical scavenger, and several experiments reported that it can substitute for GSH. This is the case of cataract prevention by aMT which occurs in the absence of GSH, after thiol synthesis has been inhibited by buthionine sulfoximine [52]. Thus, in the presence of low oxidative stress and high amounts of aMT, which was probably the situation in SAMR1 mice treated with the indole, aMT scavenged a sufficient number of free radicals resulting in a reduction of the GPx-GSH system.

An additional consequence of chronic aMT administration at mitochondrial level was an improvement of the ETC activities. Except for complex II, aMT treatment increased the activity of the remaining complexes, especially in SAMP8 mice. These mice also showed an increase in the mitochondrial ATP levels and on ATP/ADP ratio. Other studies also showed that aMT enhances the function of mitochondrial ETC [28,29,47,48]. The mechanism underlying this action is unknown, but its repercussion is that aMT may elevate the efficiency of oxidative phosphorylation and ATP synthesis [47,49]. Thus, the effect of chronic aMT administration against the age-dependent mitochondrial oxidative damage should be accompanied by an improvement of the cardiac function and/or mice survival. However, we did not measure any parameter of heart function after aMT administration at this time and so, the beneficial effects of aMT administration in terms of heart function remain to be clarified. Also, we have not data on the effects of aMT on mice survival, because the animals were sacrificed at the age of 10 months. Anyway, these two questions remain to be addressed.

Overall, the results support the view that SAMP8 mice exhibit a relatively higher level of mitochondrial oxidative stress and mitochondrial respiratory chain impairment than do SAMR1 mice. This is consistent with the predictions of the mitochondrial oxidative stress hypothesis of aging [7]. The age-dependent elevation of oxidative stress possibly resulted from the observed reduction of the aMT levels in different tissues of SAMP8 mice as recently reported [53]. Thus, supplemental treatment with chronic aMT in the drinking water counteracted the age-dependent impairment in cardiac mitochondrial function, which was more evident in SAMP8 mice than in the SAMR1 strain. Previously, dietary antioxidants were shown to increase mitochondrial GSH content and GSH:GSSG ratio [54,55], although the diet enriched with a number of antioxidants is essential to obtain these effects. Only a diet supplemented with different types of antioxidants was found to be useful in increasing the mitochondrial GSH pool [55].

Acknowledgements

This work was supported in part by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Spain) through grants G03/137, PI02-1447 and PI03-0817. MIR and MC

are predoctoral fellows from the ISCIII, and LCL is a postdoctoral fellow from the Ministerio de Educación (Spain).

References

- [1] Harman D. Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298–300.
- [2] Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998;78:547–581.
- [3] Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 2001;36:1495–1502.
- [4] Shoal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: An appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med* 2002;33:575–586.
- [5] Ku HH, Brunk UT, Sohal TS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammal species. *Free Rad Biol Med* 1994;15: 621–627.
- [6] Barja G. Rate of generation of oxidative-stress related damage on animal longevity. *Free Rad Biol Med* 2002;33:1167–1172.
- [7] Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: Genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 1998;33:113–126.
- [8] Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM): A novel murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc* 1991;39:911–919.
- [9] Takeda T. Senescence-accelerated mouse (SAM): A biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging* 1999; 20:105–110.
- [10] Hosokawa M. A higher oxidative status accelerates senescence and aggravates age dependent disorders in SAMP strains of mice. *Mech Aging Dev* 2002;123:1553–1561.
- [11] Mori A, Utsumi K, Liu J, Hosokawa M. Oxidative damage in the senescence accelerated mouse. *Ann NY Acad Sci USA* 1998;854:239–250.
- [12] Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Allen KL, Carney JM. Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by *N*-tert-butyl- α -phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:674–678.
- [13] Liu J, Mori A. Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM): A comparison with ddY mice. *Mech Aging Dev* 1993; 71:23–30.
- [14] Matsugo S, Kitagawa T, Minami S, Esashi Y, Oomura Y, Tokumaru S, Kojo S, Matsushima K, Sasaki K. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice. *Neurosci Lett* 2000; 278:105–108.
- [15] Nomura Y, Wang BX, Qi SB, Namba T, Kaneko S. Biochemical changes related to aging in the senescence-accelerated mouse. *Exp Gerontol* 1989;24:59–65.
- [16] Yarian CS, Rebrin I, Sohal RS. Aconitase TP synthase are targets of malondialdehyde modification and undergo an age-related decrease in activity in mouse heart mitochondria. *Biochim Biophys Res Comm* 2005;330:151–156.
- [17] Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. *Methods Enzymol* 2002;348:93–112.
- [18] Rebrin I, Sohal RS. Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevity. *Exp Gerontol* 2004;39: 1513–1519.
- [19] Park JW, Choi CH, Kim MS, Chung MH. Oxidative status in senescence accelerated mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1996;51:B337–B345.
- [20] Nishikawa T, Takahashi TA, Fujibayashi Y, Fujisawa H, Zhu B, Nishimura Y, Ohnishi K, Higuchi K, Hashimoto N,

- Hosokawa M. An early stage mechanism of the age-associated mitochondrial dysfunction in the brain of SAMP8 mice; an age-associated neurodegeneration animal model. *Neurosci Lett* 1998;254:69–72.
- [21] Nakahara H, Kanno T, Inai Y, Utsumi K, Hiramatsu M, Mori A, Packer L. Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Rad Biol Med* 1998;24:85–92.
- [22] Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: Melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2002;2:181–197.
- [23] Antolin IC, Rodríguez RM, Sain JC, Mayo H, Aria M, Kotle MJ, Rodríguez-Colunga J, Toliva D, Menéndez-Peláez A. Neurohormone aMT prevents damage: Effect on gene expression for antioxidative enzymes. *FASEB J* 1996;10:882–890.
- [24] Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. *Biol Signals Recep* 2000;9:137–159.
- [25] Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993;1:57–60.
- [26] Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintaub ST, Qi W. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: A potentially new metabolic pathway of aMT biotransformation. *Free Rad Biol Med* 2000;29:1177–1185.
- [27] Guenther AL, Schmidt SL, Laatsch H, Fotso S, Ness H, Ressmeyer AR, Poeggeler B, Hardeland R. Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: Formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res* 2005;39:251–260.
- [28] Martín M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000;14:1677–1679.
- [29] Escames G, López LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, León J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of sepsis mice. *J Pineal Res* 2005;17:932–934.
- [30] Acuña-Castroviejo D, Escames G, López LC, Hitos AB, León J. Melatonin and nitric oxide: Two required antagonists for mitochondrial homeostasis. *Endocrine* 2005;27:159–168.
- [31] León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. AMT mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005;38:1–9.
- [32] Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001;30:65–74.
- [33] Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–275.
- [34] Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth Enzymol* 1990;186:407–421.
- [35] Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad Biol Med* 1999;27:922–935.
- [36] Hissin PJ, Hilf R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976;74:214–226.
- [37] Barrientos A. *In vivo* and in organelle assessment of OXPHOS activities. *Methods* 2002;26:307–316.
- [38] Brusque AM, Rosa RB, Schuck PF, Dalcin KB, Ribeiro CAJ, Silva CG, Wannmacher CMD, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Briones P, Wajner M. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* 2002;40:593–601.
- [39] Krauss GJ, Pissarek M, Blasing I. HPLC of nucleic acid components with volatile mobile phases: Part 2. Separations on polymeric supports. *J High Result Chromatogr* 1997;20:693–696.
- [40] Karbownik M, Reiter RJ, Garcia JJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC. Melatonin reduces rat hepatic macromolecular damage due to oxidative stress caused by delta-aminolevulinic acid. *Biochim Biophys Acta* 2000;1523:140–146.
- [41] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82(47):95.
- [42] Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation, and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev* 1994;74:121–137.
- [43] Rebrin I, Kamzalov S, Sohal RS. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Rad Biol Med* 2003;35:626–635.
- [44] Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y. Hepatic mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice: Correction by long-term, orally administered physiological levels of aMT. *J Pineal Res* 2002;33:127–133.
- [45] Okatani Y, Eakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y. Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging* 2002;23:639–644.
- [46] Okatani Y, Waskatsuli A, Reiter RJ. Melatonin protects hepatic mitochondrial respiratory Chain activity in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2002;32:143–148.
- [47] Martín M, Macías M, León J, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the complexes I and IV of the electron transport chain and the ATP production in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:348–357.
- [48] López LC, Escames G, Tapias V, Utrilla MP, León J, Acuña-Castroviejo D. Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice. Its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:267–278.
- [49] Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA. Effect of melatonin administration on parameters related to oxidative damage in hepatocytes isolated from old Wistar rats. *J Pineal Res* 2005;38:140–146.
- [50] Bongiorno D, Ceraulo L, Ferrugia M, Filizzola F, Ruggirello A, Liveri VT. Localization and interactions of melatonin in dry cholesterol/lecithin mixed reversed micelles used as cell membrane models. *J Pineal Res* 2005;38:292–298.
- [51] Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma, Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Rad Biol Med* 1999;27:838–847.
- [52] Siu AW, Maldonado M, Sanchez-Hidalgo M, Tan DX, Reiter RJ. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *J Pineal Res* 2006;40:101–109.
- [53] Lardone PJ, Alvarez-García O, Carrillo-Vico A, Vega-Naredo I, Caballero B, Guerrero JM, Coto-Montes A. Inverse correlation between endogenous melatonin levels and oxidative damage in some tissues of SAM P8 mice. *J Pineal Res* 2006;40:153–157.
- [54] Sastre J, Millan A, Garcia de la Asuncion J, Pla R, Pallardo JG, O'Connor E, Martin JA, Droy-Lefaix MT, Viña JA. Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1998;24:298–304.
- [55] Rebrin I, Zicker S, Wedekind KJ, Paetau-Robinson I, Packer L, Sohal RS. Effect of antioxidant-enriched diets on glutathione redox status in tissue homogenates and mitochondria of the senescence-accelerated mouse. *Free Rad Biol Med* 2005;39:549–557.

1.3.- Estudio comparativo de los resultados obtenidos en mitocondrias de corazón y diafragma

Las diferencias existentes en los niveles de estrés oxidativo entre mitocondrias de corazón y de diafragma en hembras SAM se representan en la Tabla 3.

En primer lugar, podemos observar que la LPO es mayor en mitocondrias de corazón que en las de diafragma, excepto en los ratones SAMR1 tratados con aMT donde no se producen diferencias significativas entre ambos tejidos.

El contenido de GSH en mitocondrias de diafragma en hembras SAMR1 es menor que el observado en el corazón, así como en hembras SAMP8 tratadas con aMT. Además, el contenido en GSSG es mayor en los SAMR1 tratados con vehículo a los 5 y 10 meses de edad. La ratio GSH:GSSG fue significativamente menor en todos los grupos en mitocondrias diafragmáticas comparadas con corazón.

Con respecto a las enzimas antioxidantes GPx y GRd, se observa un aumento significativo en todos los grupos en mitocondrias diafragmáticas con respecto al corazón.

Tabla 3. Comparación entre los indicadores de estrés oxidativo en mitocondrias de corazón y diafragma en ratones SAM

Mitocondrias de Corazón vs. Diafragma						
Parámetros						
Estrés Oxidativo	SAMR1 5v	SAMR1 10v	SAMR1 10m	SAMP8 5v	SAMP8 10v	SAMP8 10m
LPO	↑↑	↑↑	=	↑↑↑	↑↑↑	↑
GSH	↑	↑↑	↑↑	=	=	↑↑↑
GSSG	↓	↓	=	=	=	=
GSH:GSSG ratio	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑	↑↑↑
G.T.	=	↑↑	↑	=	=	↑↑↑
GPx	↓↓↓	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
GRd	↓↓	↓↓	↓	↓↓↓	↓	↓↓↓

Fechas arriba ó abajo indican valor mayor o menor, respectivamente, con respecto a las mitocondrias de corazón; = indica que no hay diferencias significativas. ↑ $p < 0.05$; ↑↑ or ↓↓ $p < 0.01$ and ↑↑↑ or ↓↓↓ $p < 0.001$

La comparativa entre los parámetros relacionados con la bioenergética mitocondrial, se muestra en la Tabla 4.

Se observa una disminución significativa de la actividad de los complejos respiratorios con la edad en las mitocondrias de corazón con respecto a las de diafragma en prácticamente todos los grupos de ratones. Como excepciones a esta regla, encontramos que la actividad del complejo I en los ratones SAMR1 tratados con vehículo a los 10 meses de edad y la actividad del complejo III a los 5 meses en SAMR1 y SAMP8 y los SAMP8 tratados con aMT, permanecen iguales.

En cuanto al contenido en ATP y la ratio ATP/ADP, únicamente observamos que es significativamente mayor en mitocondrias de corazón en los ratones SAMR1 a los 5 y 10 meses de edad tratados con vehículo, no habiendo diferencias relacionadas con el envejecimiento de estos tejidos en el resto de los grupos.

Tabla 4. Comparación entre los indicadores de bioenergética mitocondrial en mitocondrias de corazón y diafragma en ratones SAM

Mitocondrias de Corazón vs. Diafragma						
Parámetros						
Bioenergética Mitocondrial	SAMR1 5v	SAMR1 10v	SAMR1 10m	SAMP8 5v	SAMP8 10v	SAMP8 10m
COMPLEJO I	↓	=	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
COMPLEJO II	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
COMPEJO III	=	↓	↓↓	=	↓↓	=
COMPLEJO IV	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
ATP	↑↑↑	↑↑	=	=	=	=
ATP/ADP	↑↑↑	↑↑↑	=	=	=	=

Fechas arriba ó abajo indican valor mayor o menor, respectivamente, con respecto a las mitocondrias de corazón; = indica que no hay diferencias significativas. $\uparrow p < 0.05$; $\uparrow\uparrow$ or $\downarrow\downarrow p < 0.01$ and $\uparrow\uparrow\uparrow$ or $\downarrow\downarrow\downarrow p < 0.001$

2.- RESPUESTA INFLAMATORIA PRODUCIDA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO EN RATONES MACHOS Y HEMBRAS SAMR1 Y SAMP8

Para evaluar la presencia de un proceso inflamatorio durante el envejecimiento hemos estudiado los niveles de óxido nítrico (NO), así como las citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-2, INF- γ , TNF- α y GM-GSF) y anti-inflamatorias (IL-4, IL-5 e IL-10).

Nuestro estudio muestra un aumento de INF- γ y TNF- α , además de una reducción en los niveles de IL-2 en plasma de ratones SAMR1 y SAMP8; mientras que cambios menores se observaron en el resto de las citoquinas.

El tratamiento con aMT dado en el agua de bebida desde el primer mes y continuando hasta el noveno, contrarrestó la producción de las citoquinas pro-inflamatorias y los niveles de óxido nítrico, reduciendo los niveles hasta los encontrados a los 5 meses de edad. Además de reducir los niveles de las citoquinas anti-inflamatorias.

Además, este proceso inflamatorio asociado al envejecimiento conlleva una elevación de los niveles de nitritos, que también son reducidos después de la administración de aMT.

Estos resultados han sido objeto de la siguiente publicación:

Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice
(**J Pineal Res.**, Doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00416.x, 2006)



Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice

Abstract: It is hypothesized that, besides increased free radical production, aging is a process also related to inflammation. Thus, female and male senescence-accelerated (SAMP8) and senescence-resistant (SAMR1) mice of 5 and 10 months of age were studied to assess this hypothesis. Plasma from these mice was processed to determine nitric oxide (NO), and pro-inflammatory [interleukin (IL)-1 β , IL-2, interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor] and anti-inflammatory (IL-4, IL-5 and IL-10) cytokines. The results show the presence of an age-dependent increase in IFN- γ and TNF- α and a reduction in IL-2 levels, with minor changes in the remaining cytokines. Moreover, age was associated with a significant increase in NO levels. Chronic melatonin administration between 1 and 10 months of age counteracted the age-dependent production of pro-inflammatory cytokines and NO, reducing them to the levels found at 5 months of age. Melatonin also reduced the levels of the anti-inflammatory cytokines. The results of this study suggest the existence of an inflammatory process during aging and further support that melatonin behaves as an essential molecule against aging, for its anti-inflammatory properties together with its antioxidative role reported elsewhere.

María I. Rodríguez¹, Germaine Escames¹, Luis C. López¹, Ana López¹, José A. García¹, Francisco Ortiz¹ and Darío Acuña-Castroviejo^{1,2}

¹Departamento de Fisiología, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Granada; ²Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

Key words: aging, cytokines, inflammation, melatonin, nitric oxide, SAM mice, therapy

Address reprint request to Darío Acuña-Castroviejo, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina; Avda. de Madrid 11, E-18012 Granada, Spain.

E-mail: dacuna@ugr.es

Received Xxxxxx xx, 200x;
accepted Xxxxx xx, 200x.

Introduction

Nitric oxide (NO) and cytokines constitute the molecular markers and the intercellular messengers of inflammation. Some cytokines clearly promote inflammation (pro-inflammatory cytokines) and include interleukin-1 β (IL-1 β), IL-2, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interferon gamma (IFN- γ). Other cytokines, including IL-4, IL-5 and IL10, respectively, serve to reduce inflammation and promote healing (anti-inflammatory cytokines). Under pathologic conditions, these anti-inflammatory mediators may either provide insufficient control over pro-inflammatory activities in immune-mediated diseases or overcompensate and inhibit the immune response, rendering the host at risk from systemic infection [1, 2]. Inflammation is a complex normal host defense reaction against both physiological and nonphysiological insults and stressors such as chemicals, drugs, oxidants, or a variety of microbial entities. The inflammatory response includes induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO, and of the pro-inflammatory cytokines, mainly IL-1 and TNF- α in the involved biological fluids [3]. The transcription factor nuclear factor-kappa B (NF- κ B), which is extremely sensitive to oxidants and pro-inflammatory substances [4], activates gene expression of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β [5], IL-6 [6] and TNF- α [7], as well as the pro-inflammatory enzymes, cyclo-oxygenase-2 [4] and iNOS [8].

Melatonin is a known modulator of hemapoiesis and of the immune cell production and function, both in vivo and in vitro. Melatonin shows a remarkable function versatility exhibiting antioxidative [9], oncostatic [10], antiaging [11] and immunomodulatory [12] properties. In vitro studies showed that melatonin acts on the immune cells by regulating cytokine production. Melatonin activates T helper cells by increasing IL-2 production [13] as well as activating monocytes by increasing the production of IL-1, IL-6, TNF- α , reactive oxygen species (ROS), and NO [13–15]. Melatonin also enhances IL-12 production by monocytes driving T-cell differentiation toward the Th1 phenotype and causing an increase of IFN- γ production [16]. In this sense, cytokine production could be considered as one of the main mechanisms to modulate the immune system by melatonin.

The interrelation of ROS and reactive nitrogen species (RNS) and the inflammatory states are related to the aging process. Based on these and other available data, the inflammation hypothesis of aging [17] supports the molecular basis of the inflammatory process as a part of the aging itself. Senescence-accelerated mouse (SAMP8) is currently used to clarify the mechanisms that underlie aging [18–21]. Compared with the senescence resistance, long-lived mice (SAMR1), SAM mice display a shorter lifespan [18, 19]. One mechanism promoting accelerated aging and death in SAM mice is their higher oxidative status [20, 21] compared with normal mice. A relationship between cytokines and aging has been reported, and the expressions of IL-1 β

mRNA and protein levels of IL-1 β , TNF- α and IL-6 were found elevated in 10-month-old SAM mice [22]. These findings suggest that, besides ROS and RNS production, increased expression of pro-inflammatory cytokines may be involved in the aging process. We recently demonstrated [23] that SAM mice exhibit higher level of mitochondrial oxidative stress than SAMR mice, whereas chronic melatonin treatment counteracted the age-dependent impairment in mitochondrial function. Thus, we considered it worthwhile to extend our knowledge on the anti-aging properties of melatonin studying its role against the age-dependent inflammatory status in terms of pro- and anti-inflammatory cytokines and NO levels. The study was carried out in SAMP8 versus SAMR1 mice treated with melatonin in the drinking water from 1 to 10 months of age.

Materials and methods

Chemicals

Sulfosalicylic acid, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucose-6-phosphate, NADPH and nitrate reductase were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). All other reagents were of the highest purity available. Bio-Plex assay buffer, Bio-Plex wash buffer, Bio-Plex detection antibody diluents, and streptavidin-PE (100 \times) were purchased from Bio-Rad (Madrid, Spain).

Animals and treatments

Female SAMP8 and their controls SAMR1 mice breeding pairs were obtained from the Council for SAM Research, Kyoto, Japan, through Harlan (Barcelona, Spain). The animals were maintained in the University's facility under a 12/12 hr light/dark cycle (lights on at 07:00 hr) at 22 \pm 1 $^{\circ}$ C and they were given regular chow and tap water, under the supervision of veterinarians. All experiments were performed according to the Spanish Government Guide and the European Community Guide for animal care.

Animals were used at 5 and 10 months of age. Once newborn mice were separated from their mothers (at the age of 1 month), melatonin or vehicle treatments were initiated. The animals were grouped as follows ($n = 6$ animals/group/gender): (i) R5v group, consisting of SAMR1 animals treated with vehicle from 1 to 5 months of age; (ii) P5v group, included SAMP8 mice treated with vehicle from 1 to 5 months of age; (iii) R10v group, included SAMR1 mice treated with vehicle from 1 to 10 months of age; (iv) P10v group, consisted of SAMP8 mice treated with vehicle from 1 to 10 months of age; (v) R10 m group, included SAMR1 mice treated with melatonin from 1 to 10 months of age, and (vi) P10 m group, consisting of SAMP8 mice treated with melatonin from 1 to 10 months of age. Melatonin was dissolved in a minimum volume of absolute ethanol and then diluted in the drinking water to yield a dose of 10 mg/kg b.w. during the months of treatment. The concentration of ethanol in the final solution was 0.066%. Water bottles were covered with aluminum foil to protect from light, and the drinking fluid

was changed twice weekly. All mice were killed at the end of their respective treatment period, i.e. 5 or 10 months. Plasma samples were obtained using EDTA tubes and then centrifuged at 10,000 g at 4 $^{\circ}$ C for 15 min. Samples were frozen at -80° C until the assays were performed.

Bio-Plex cytokine assay

The Bio-Plex Mouse Cytokine 8-Plex A Panel was used with the Bio-Plex Suspension Array System (Bio-Rad) to profile expression of eight inflammatory mediators (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, GM-CSF, IFN- γ and TNF- α). The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50 μ L of the working solution containing multiple microbeads labeled with specific antibodies against each of the aforementioned cytokines, were added into each well, washed thrice with 100 μ L of Bio-Plex wash buffer, and filtered to dryness. Then, 50 μ L thawed plasma aliquots diluted 1:4 with the specific Bio-Plex sample diluent, were added to each well and incubated for 30 min at room temperature. After a wash step (thrice) with 100 μ L Bio-Plex wash buffer, the beads were incubated with 25 μ L of the detection antibody cocktail for 30 min at room temperature, each antibody specific to a single cytokine. After another three times wash step with 100 μ L of Bio-Plex wash buffer, the beads were incubated with 50 μ L of the streptavidin-phycoerythrin solution for 10 min at room temperature and washed thrice again. The beads were resuspended in each well with 125 μ L of the Bio-Plex assay buffer and the concentrations of each cytokine were determined using the array reader. A parallel standard curve was constructed for each cytokine.

Nitrite determination

Thawed plasma samples were desproteinized with ice-cold 6% sulfosalicylic acid, incubated at room temperature for 30 min and centrifuged at 10,000 g for 15 min. Then, 50 μ L supernatant were incubated with 4 μ L NaOH 1.25%, 36 μ L of a 14 mM phosphate buffer solution containing 50 mU glucose-6-phosphate dehydrogenase, 750 μ M glucose-6-phosphate, and 30 mU nitrate reductase, and 10 μ L NADPH 3 μ M for 60 min at room temperature. The amount of nitrite was measured following the Griess reaction [24] which converts nitrite into a colored azo compound spectrophotometrically detected at 550 nm.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of six samples analyzed in duplicate. An ANOVA followed by Student's t -test was used to compare the mean values between groups. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Figs 1–5 show the age-dependent changes in plasma pro-inflammatory cytokines in SAMR1 and SAMP8 female and male mice. Although IL-1 β levels did not change in any experimental group (Fig. 1), the other pro-inflammatory

7 Fig. 1. Effect of age and melatonin treatment on IL-1 β levels in plasma from female (left) and male (right) SAMR1 and SAMP8 mice. Animals were given vehicle (0.066% ethanol) or melatonin (10 mg/kg) in the drinking water from 1 month after birth, and killed 4 or 9 months later (at 5 and 10 months of age, respectively). R5v and R10v, SAMR1 animals treated with vehicle and killed at 5 and 10 months of age; P5v and P10v, SAMP8 mice treated with vehicle and killed at 5 and 10 months of age; R10 m and P10 m, SAMR1 and SAMP8 animals, respectively, treated with melatonin and killed at 10 months of age.

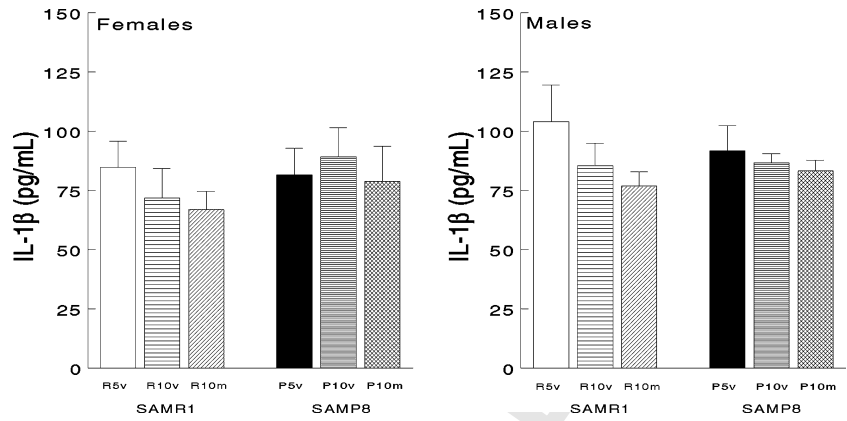


Fig. 2. Effect of age and melatonin treatment on IL-2 levels in plasma from female (left) and male (right) SAMR1 and SAMP8 mice. See legend of Fig. 1 for details. *** $P < 0.001$ vs. R5v or P5v; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ vs. R10v or P10v; + $P < 0.05$ vs. R10 m.

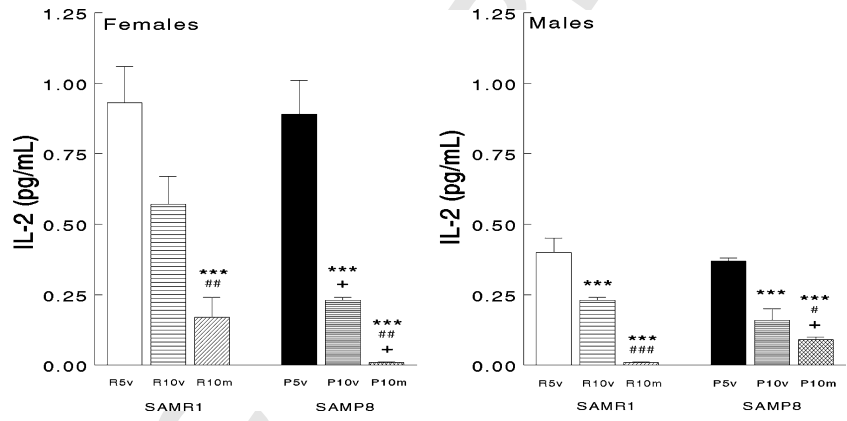


Fig. 3. Effect of age and melatonin treatment on TNF- α levels in plasma from female (left) and male (right) SAMR1 and SAMP8 mice. See legend of Fig. 1 for details. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. R5v or P5v; # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ vs. R10v or P10v.

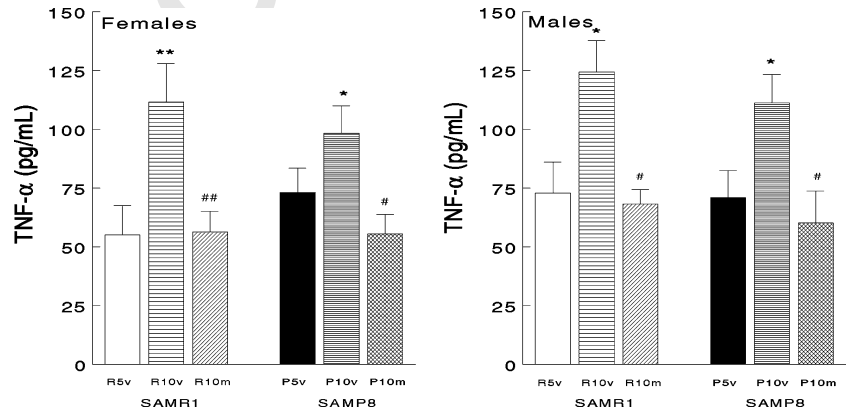
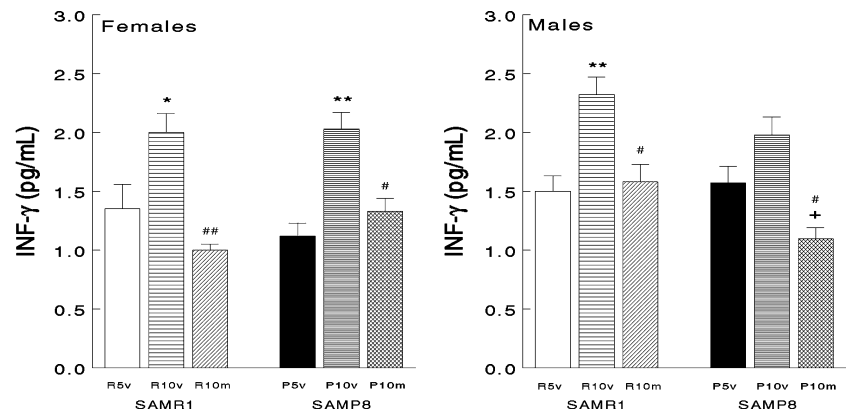


Fig. 4. Effect of age and melatonin treatment on IFN- γ levels in plasma from female (left) and male (right) SAMR1 and SAMP8 mice. See legend of Fig. 1 for details. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. R5v or P5v; # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ vs. R10v or P10v; + $P < 0.05$ vs. R10 m.



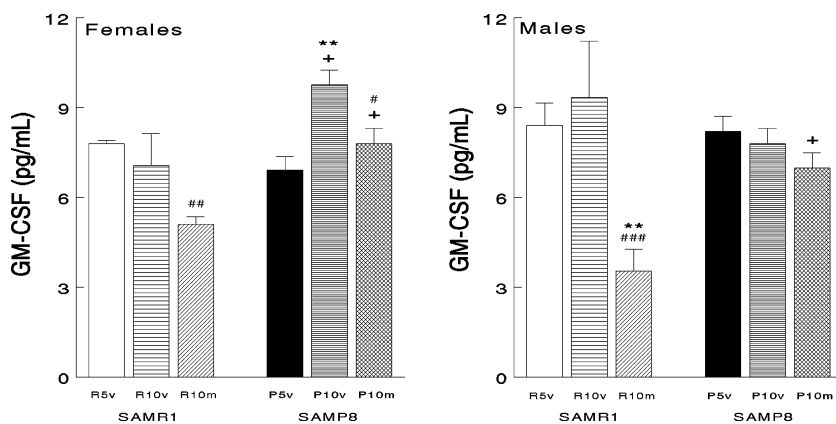


Fig. 5. Effect of age and melatonin treatment on GM-CSF levels in plasma from female (left) and male (right) SAMR1 and SAMP8 mice. See legend of Fig. 1 for details. ** $P < 0.01$ vs. R5v or P5v; ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ vs. R10v or P10v; + $P < 0.05$ vs. R10 m.

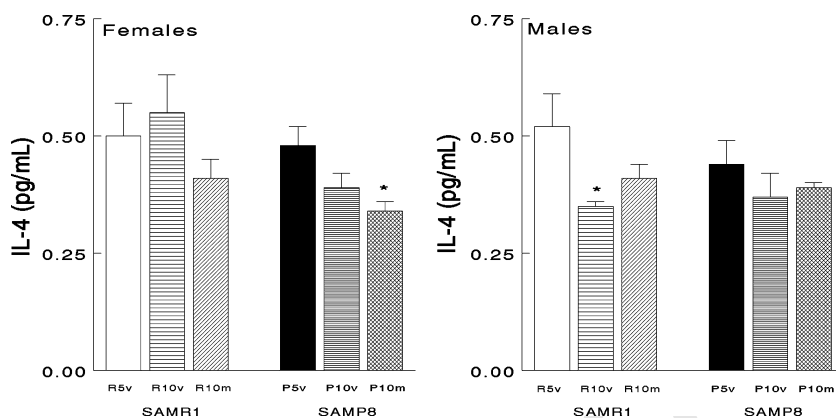


Fig. 6. Effect of age and melatonin treatment on IL-4 levels in plasma from female (left) and male (right) SAMR1 and SAMP8 mice. See legend of Fig. 1 for details. * $P < 0.05$ vs. R5v or P5v.

cytokines showed significant variations. In female rats (Fig. 2, left), a decrease in IL-2 levels was found mainly in SAMP8 mice at 10 months of age ($P < 0.001$). Melatonin administration decreased further the levels of IL-2 in SAMR1 and SAMP8 female mice, although the effect of melatonin was significantly higher in the latter ($P < 0.05$). In males, IL-2 levels decreased at 10 months of age in SAMR1 and SAMP8 mice ($P < 0.001$), and melatonin administration further reduced them (Fig. 2, right). Female SAMP8 ($P < 0.05$) and SAMR1 ($P < 0.01$) mice showed an increase in TNF- α at 10 months of age, an effect counteracted by melatonin treatment (Fig. 3, left). The effect of melatonin was also found in males (Fig. 3, right); in this case, the reduction of TNF- α levels by melatonin was significantly higher in SAMP8 than in SAMR1 mice ($P < 0.05$). Plasma IFN- γ levels also increased at similar extend in both female and male SAMR1 ($P < 0.05$) and SAMP8 ($P < 0.01$) mice at age of 10 months (Fig. 4). In all groups, melatonin treatment restored the levels of this cytokine to control values. Age-dependent changes in GM-CSF levels were less pronounced and only in SAMP8 female mice increased significantly at 10 months of age ($P < 0.01$) (Fig. 5, left). Anyway, melatonin treatment significantly reduced GM-CSF levels below those found at 5 months of age in all mice groups (Fig. 5).

Anti-inflammatory cytokine changes are showed in Figs 6–8. Plasma levels of IL-4 were unaffected by aging except for the decrease ($P < 0.05$) in SAMR1 male mice (Fig. 6, right). The effect of melatonin treatment was only

observed in SAMP8 female mice ($P < 0.05$) (Fig. 6, left). Plasma levels of IL-5 decreased significantly in SAMP8 female ($P < 0.01$) (Fig. 7, left) and male ($P < 0.001$) (Fig. 7, right) mice. The levels of IL-5 were reduced further after melatonin treatment mainly in SAMP8 males ($P < 0.05$). Levels of IL-10 were reduced at 10 months of age in SAMP8 males ($P < 0.05$) (Fig. 8, right). Moreover, IL-10 levels increased in female ($P < 0.05$) (Fig. 8, left) and decreased in male ($P < 0.001$) (Fig. 8, right) SAMR1 mice. In all groups, melatonin administration further reduced IL-10 levels below those found at 5 months of age ($P < 0.001$).

Fig. 9 shows the changes in plasma levels of NOx in the studied groups. In all groups, NOx levels increased at 10 months of age at a similar extend ($P < 0.001$). Treatment with melatonin reduced these levels significantly, although the effect of the indoleamine was more pronounced in SAMP8 groups (Fig. 9).

Discussion

The main finding of this study is the presence of an inflammatory process during aging and the preventive role of chronic melatonin administration on this process. In fact, our study documents the age-dependent increase of pro-inflammatory cytokines, mainly IFN- γ and TNF- α , in plasma of SAMR1 and SAMP8 mice at 10 months of age. Furthermore, melatonin given in the drinking water beginning at 1 month of age and continuing for 9 months

Fig. 7. Effect of age and melatonin treatment on IL-5 levels in plasma from female (left) and male (right) SAMR1 and SAMP8 mice. See legend of Fig. 1 for details. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. R5v or P5v; # $P < 0.05$ vs. P10v; + $P < 0.05$ vs. R10 m.

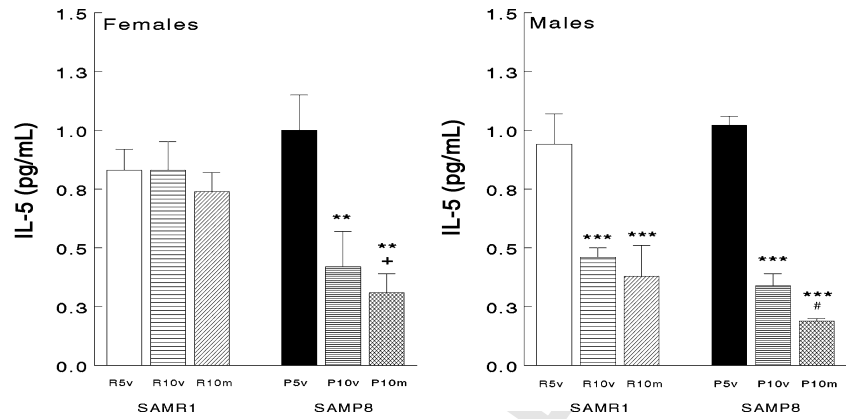


Fig. 8. Effect of age and melatonin treatment on IL-10 levels in plasma from female (left) and male (right) SAMR1 and SAMP8 mice. See legend of Fig. 1 for details. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. R5v or P5v; ### $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ vs. R10v or P10v; + $P < 0.05$ and ++ $P < 0.01$ vs. R10v or R10 m.

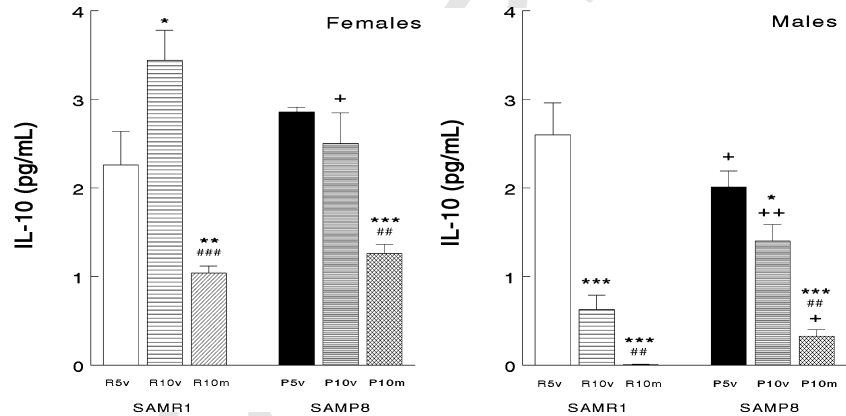
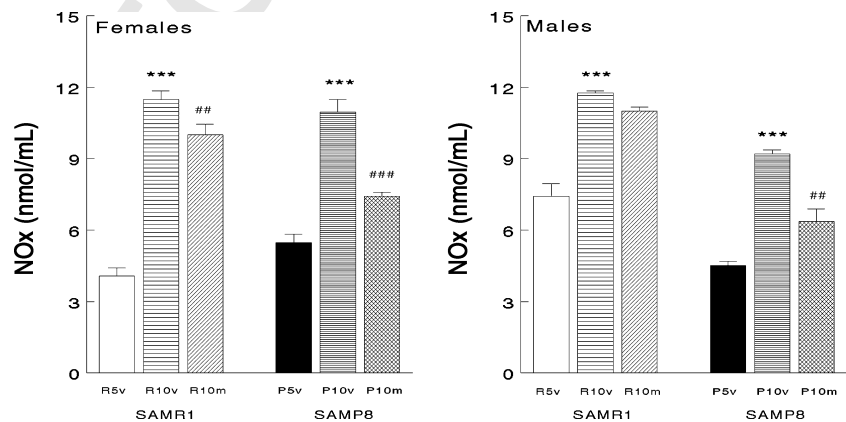


Fig. 9. Effect of age and melatonin treatment on NOx levels in plasma from female (left) and male (right) SAMR1 and SAMP8 mice. See legend of Fig. 1 for details. *** $P < 0.001$ vs. R5v or P5v; ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ vs. R10v or P10v.



counteracted the age-dependent increase in plasma cytokines. The inflammatory process during aging was further supported by the significant increase in the plasma levels of NOx that was also corrected after melatonin administration. These findings support the concept that melatonin exerts profound protective effects against the inflammatory process of aging.

Aging is a multifactorial process involving oxidative and nitrosative stress. The inflammatory process is a physiological protective mechanism that acts in response to cellular injury or tissue destruction. Thus, free radical-mediated cell damage during aging may induce a chronic pro-inflammatory response. As it was recently reported with the same

experimental paradigm, SAMP8 mice show an increased oxidative damage, resulting in dysfunction associated with accelerated aging [23, 25, 26]. Here, we study whether this oxidative stress is accompanied by an inflammatory status, measuring plasma levels of NOx and pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-2, IFN- γ , TNF- α , and GM-CSF that promote inflammation, and levels of anti-inflammatory cytokines as IL-4, IL-5 and IL-10 that suppress the activity of pro-inflammatory cytokines. Many inflammatory conditions are associated with production of comparative cytotoxic effects. iNOS is expressed typically in response to immunological stimuli and produces nanomols, rather than picomols, of NO. NO may act as cytostatic and

cytotoxic molecule for fungal, bacterial, helminthic, and protozoal organisms as well as tumor cells. High levels of NO and peroxynitrite (formed the reaction between NO and superoxide anion) produced as a consequence of iNOS induction, are particularly cytotoxic [27]. In short, the production of NO can result from an immune response against macrophage activation of tumoral cells, from induction of iNOS in tumoral cells themselves, or from the vasodilatation of blood vessel cells by pro-inflammatory cytokines through endothelial NOS. Cytokines could also effect the production of NO by neuronal NOS, which may be inhibited by antioxidants and/or anti-inflammatory compounds including melatonin and its metabolites [28, 29]. Our data show that the levels of NOx increased in SAMR1 and SAMP8 mice at 10 months of age. In addition, the levels of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α increased significantly at 10 months of age. IFN- γ is considered a pro-inflammatory cytokine because it enhances TNF- α activity and induces iNOS and NO. IL-1 β and TNF- α are inducers of endothelial adhesion molecules, which are essential for the adhesion of leukocytes to the endothelial surface prior to migration into the tissues. In this regard, it was reported that SAM mice had an elevated expressions of IL-1 β , TNF- α and IL-6 at 10 months of age, especially in the hippocampus, a finding related to the age-related neural dysfunction and/or learning and memory deficiency in SAMP8 mice [22]. The increase in these pro-inflammatory cytokines may be also due to the block of anti-inflammatory cytokines such as IL-4 and IL-10 that suppress the production of IL-1 β and TNF- α . Therefore, a 'balance' between pro- and anti-inflammatory cytokines is thought to determine the outcome of disease. This is also applicable to aging. In fact, our findings show that the levels of the anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-5, and IL-10 decreased at 10 months of age. Together, these data are indicative of a pathologic condition in SAM mice along the age, because anti-inflammatory cytokines provide insufficient control over pro-inflammatory ones.

In recent years, much attention has been devoted to the possible interaction between melatonin and the immune system [12, 13, 30]. Lissoni et al. [33] proposed that melatonin is a potent anti-inflammatory agent. As free radicals are thought to be involved in the inflammatory process, melatonin is a good candidate for exerting anti-inflammatory properties for its antioxidative and free radical scavenging features [9, 34–36]. Melatonin has been proposed to regulate the immune system by affecting cytokine production in immunocompetent cells [16]. ROS plays a role in the regulation of cytokine release as melatonin inhibits the release of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in acute inflammation and post-ischemia–reperfusion injury [12, 13]. Melatonin also stimulates the production of progenitor cells for granulocytes and macrophages (GM-CFU) and it has a general stimulatory action on hemopoiesis [37]. Moreover, melatonin prevents the expression of iNOS and inhibits directly the catalytic activity of NOS [28, 38–40], scavenges ONOO⁻ [41, 42], and it possesses specific effects related to activation of melatonin receptors. Melatonin does not react directly with NO, but instead the indole lowered the nitrite/nitrate

production by reducing iNOS expression in LPS-activated macrophages through the inhibition of NF- κ B activation [29, 38, 43, 44]. In connection with its anti-inflammatory properties, we found that melatonin reduced pro-inflammatory cytokines production including TNF- α , IFN- γ , IL-2 and GM-CSF in SAM mice. It is probably that the anti-inflammatory role of melatonin makes it unnecessary the increase in the anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-5 and IL-10, because this property of the indoleamine is sufficient to compensate the inflammatory process of aging.

Two additional comments should be added. First, no major differences between female and male mice were found in the studied parameters. The antioxidative and neuro-protective roles of estrogens elsewhere reported seem to be insufficient to exert any significant effect until 10 months of age. Secondly, no significant differences among cytokines and/or NOx levels were detected between SAMR1 and SAMP8 mice. This finding suggests that the process of aging in SAMP8 mice is similar to that in SAMR1 at least until 10 months of age. It is probably that differences in the measured parameters appear later in SAMP8 compared with SAMR1 mice.

In conclusion, our results show the presence of an inflammatory component in response to aging in SAM mice. Herein, we suggest that aging should be considered not only a consequence of free radical damage but also a process involving an inflammatory response. Thus, an inflammatory/free radical theory of aging should be considered. In this regard, melatonin behave as an outstanding molecule against aging, because its antioxidant/anti-inflammatory properties. The beneficial effects of melatonin administration against age described here and reported elsewhere [23, 25, 26, 45], with the age-dependent reduction in pineal and extrapineal melatonin production in SAM mice [11, 46], strongly support the relationships between melatonin levels and aging. Because of this, melatonin may also has potential clinical applicability for some age-related disorders.

Acknowledgments

This study was partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (grants no. G03/137 PI03/0817), and Consejería de Educación, Junta de Andalucía (CTS-101). L.C.L. is a postdoctoral fellow from the Ministerio de Educación (Spain), and F.O. is a predoctoral fellow from the ISCIII (Ministerio de Sanidad, Spain).

References

- MUNOZ C, CARLET J, FITTING C et al. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 1991; **88**:1747–1754.
- KASAI T, INADA K, TAKAKUWA T et al. Anti-inflammatory cytokine levels in patients with septic shock. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; **98**:34–42.
- DIANZANI MU. *Trattato di Patologia generale*. Torino, Italy, Unione Tipografico-Editrice Torinese, 1996; pp. 1230–1348.
- KIM HJ, KIM KW, YU BP, CHUNG HY. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF- κ B activation and I κ B α degradation. *Free Radic Biol Med* 2000; **28**:683–692.

5. GOTO M, KATAYAMA KI, SHIRAKAWA F, TANAKA I. Involvement of NF- κ B p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1 β gene at two subregions of the upstream enhancer element. *Cytokine* 1999; **11**: 16–28.
6. LEBERMANN TA, BALTIMORE D. Activation of the interleukin-6 gene expression through the NF- κ B transcription factor. *Mol Cell Biol* 1990; **10**:2327–2334.
7. YAO J, MACKMAN N, EDGINGTON TS, FAN ST. Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor- α promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF- κ B transcription factors. *J Biol Chem* 1997; **272**:795–801.
8. TAYLOR BS, DE VERA ME, GANSTER RW et al. Multiple NF- κ B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1998; **273**:15148–15156.
9. TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B, MANCHESTER LC, REITER RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; **1**:57–60.
10. BLASK DE, DAUCHY RT, SAUER LA. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine* 2005; **27**:179–188.
11. REITER RJ. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays* 1992; **14**:169–175.
12. CARRILLO-VICO A, REITER RJ, LARDONE PJ et al. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Invest Drugs* 2006; **7**:423–431.
13. GARCÍA-MAURIÑO S, GONZÁLEZ-HABA MG, CALVO JR et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN γ production by human circulating CD4⁺ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1997; **159**:574–581.
14. BARJAVEL MJ, MAMDOUH Z, RAGHBATE N, BAKOUCHE O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol* 1998; **160**:1191–1197.
15. MORREY KM, MCLACHLAN JA, SERKIN CD, BAKOUCHE O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol* 1994; **153**:2671–2680.
16. GARCÍA-MAURIÑO S, POZO D, CARRILLO-VICO A et al. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci* 1999; **65**:2143–2150.
17. CHUNG HY, KIM HJ, KIM JW, YU BP. The inflammatory hypothesis of aging: molecular modulation by caloric restriction. *Ann N Y Acad Sci* 2001; **928**:327–335.
18. TAKEDA T, HOSOKAWA M, HIGUCHI K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc* 1991; **39**:911–919.
19. TAKEDA T. Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging* 1999; **20**:105–110.
20. HOSOKAWA M. A higher oxidative status accelerates senescence and aggravates age dependent disorders in Samp strains of mice. *Mech Ageing Dev* 2002; **123**:1553–1561.
21. MORI A, UTSUMI K, LIU J, HOSOKAWA M. Oxidative damage in the senescence accelerated mouse. *Ann N Y Acad Sci* 1998; **854**:239–250.
22. KYI KYI Tha, YASUNOBU Okuma, HIROYUKI Miyazaki et al. Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM) P8. *Brain Res* 2000; **885**:25–31.
23. RODRÍGUEZ MI, CARRETERO M, ESCAMES G et al. Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic Res* 2006; doi:10.1080/10715760600936359.
24. GREEN LC, RUIZ DE LUZURIAGA K et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; **78**:7764–7768.
25. CANUDAS AM, GUTIERREZ-CUESTA J, RODRÍGUEZ MI et al. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* 2005; **126**:1300–1304.
26. NOGUÉS R, GIRALT M, ROMEU M et al. Melatonin reduces oxidative stress in erythrocytes and plasma of senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2006; **41**:142–149.
27. FLOYD RA, HENSLEY K. Nitron inhibition of age-associated oxidative damage. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **899**:222–237.
28. LEÓN J, ESCAMES G, RODRÍGUEZ MI et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by *N*¹-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem* 2006; **98**:2023–2033.
29. MAYO JC, SAINZ RM, TAN DX et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and *N*¹-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005; **165**:139–149.
30. ESQUIFINO AI, PANDI-PERUMAL SR, CARDINALI DP. Circadian organization of the immune response: a role for melatonin. *Clin Appl Immunol Rev* 2004; **4**:423–433.
31. MAESTRONI GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Invest Drugs* 2001; **10**:467–476.
32. CARRILLO-VICO A, GUERRERO JM, LARDONE PJ et al. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005; **27**:189–200.
33. LISSONI P, ROVELLI F, MEREGALLI S et al. Melatonin as a new possible anti-inflammatory agent. *J Biol Regul Homeost Agents* 1997; **11**:157–159.
34. ACUÑA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G, CARAZO A et al. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem Res* 2001; **30**:65–74.
35. LEÓN J, ACUÑA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G et al. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; **38**:1–9.
36. REITER RJ, TAN DX, MANCHESTER LC et al. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; **34**:237–256.
37. MAESTRONI GJ, CONTI A. Melatonin and the immunohematopoietic system therapeutic and adverse pharmacological correlates. *Neuroimmunomodulation* 1996; **3**:325–332.
38. ESCAMES G, LEÓN J, MACÍAS M et al. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 2003; **17**:932–934.
39. ESCAMES G, LÓPEZ LC, TAPIAS V et al. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 2006; **40**:71–78.
40. LEÓN J, MACÍAS M, ESCAMES G et al. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenes. *Mol Pharmacol* 2000; **58**:967–975.
41. ALLEGRA M, REITER RJ, TAN DX et al. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 2003; **34**:1–10.
42. GUENTHER AL, SCHMIDT SI, LAATSCH H et al. Reactions of the melatonin metabolite AMK (*N*¹-acetyl-5-methoxykynur-

- amine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res* 2005; **39**:251–260.
43. CRESPO E, MACÍAS M, POZO D et al. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J* 1999; **13**:1537–1546.
44. ESCAMES G, LÓPEZ LC, ORTIZ F et al. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol* 2006; doi:10.1016/j.exger.2006.09.002.
45. REITER RJ, TAN DX, MAYO JC et al. Melatonin, longevity and health in the aged: an assessment. *Free Radic Res* 2002; **36**:1323–1329.
46. LARDONE PJ, ALVAREZ-GARCIA O, CARRILLO-VICO A et al. Inverse correlation between endogenous melatonin levels and oxidative damage in some tissues of SAM P8 mice. *J Pineal Res* 2006; **40**:153–157.

— *Discusión* —

CONSIDERACIONES PREVIAS

Para realizar el estudio multifactorial del envejecimiento, nuestro objetivo fundamental era demostrar la relación existente entre los distintos parámetros de estrés oxidativo así como de la bioenergética mitocondrial en mitocondrias de corazón y diafragma de ratones hembras SAMP8, ratones sensibles al envejecimiento, frente a ratones controles resistentes al envejecimiento, SAMR1.

Como el aumento en la producción de radicales libres durante el envejecimiento va asociado a un proceso inflamatorio crónico, vamos a evaluar también los cambios de las citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, así como los niveles de óxido nítrico en el plasma de dichos ratones.

Por otro lado, vamos a comprobar la respuesta en estos ratones cuando son tratados crónicamente con 10 mg/kg melatonina en el agua de bebida durante 9 meses. Para realizar este trabajo, los ratones se sacrificaron a los 5 y a los 10 meses de edad, ya que parece que entre los 3 y los 5 meses de edad los ratones SAMP8 muestran signos tempranos de estrés oxidativo comparados con los SAMR1 y es a los 11 meses de edad cuando esos signos serán más evidentes [Mory y cols., 1998; Butterfield y cols., 1997; Liu y Mori, 1993].

Por todo ello, consideramos conveniente ver las diferencias existentes en cuanto al estrés oxidativo mitocondrial cardíaco y diafragmático en hembras SAM, entre los 5 y 10 meses de edad, un periodo que puede marcar las diferencias entre ambos grupos en términos de daño oxidativo mitocondrial, así como la respuesta inflamatoria producida en estas cepas de ratones SAM.

1.- EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL EN RATONES SAMP8 Y SAMR1 HEMBRAS

1.1.- Diafragma (Exp Gerontol., 2007, Enviado)

Como hemos visto anteriormente, el daño a la mitocondria como resultado de la generación intrínseca de radicales libres está teóricamente relacionado con el proceso de envejecimiento celular. En este caso vamos a estudiar parámetros de estrés oxidativo y bioenergética mitocondrial en diafragma de ratones hembras SAMR1 y SAMP8, así como el efecto del tratamiento crónico con melatonina en la función mitocondrial.

El diafragma es el más importante músculo inspirador en mamíferos y juega un papel crítico en el mantenimiento de una adecuada ventilación alveolar. Desafortunadamente, se ha mostrado que la capacidad de generar la fuerza diafragmática disminuye con la edad [Bou-Resli y cols., 1991; Criswell y cols., 1997; Gosselin y cols., 1994; Polkey y cols., 1997; Tolep y cols., 1995].

El estrés oxidativo es una condición donde se altera el balance entre el estado redox oxidante y antioxidante (o reacciones de oxidación y reducción), inclinando el equilibrio hacia el estado oxidado [Sies, 1985]. De acuerdo con los resultados obtenidos, se demuestra la existencia de estrés oxidativo en mitocondrias diafragmáticas, tanto en SAMR1 y SAMP8, asociado al proceso de envejecimiento. Los ratones SAMP8 muestran un mayor daño oxidativo mitocondrial que los ratones SAMR1. Además, el tratamiento con aMT dado en el agua de bebida desde el primer hasta el noveno mes, contrarresta el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial en los ratones SAMP8, y también corrige las menores alteraciones observadas en los SAMR1. Como consecuencia de esos efectos, el tratamiento con aMT restaura la habilidad de la mitocondria para producir ATP. Una observación importante es que la administración exógena de aMT por largos periodos de tiempo, protege contra el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial a lo largo del proceso de envejecimiento, ya que no se observan efectos negativos asociados a este tratamiento.

Múltiples líneas de evidencia sugieren que los ratones SAMP8 presentan un incremento de vulnerabilidad al daño oxidativo [Karbownik y cols., 2000]. Nosotros sugerimos que, especialmente a los 10 meses de edad, los ratones SAMP8 tienen un mayor estrés oxidativo diafragmático que los SAMR1. Este daño oxidativo en la mitocondria exige cambios en la LPO y GSH, daño a la ETC mitocondrial y déficit en la producción de ATP. Nomura y cols., en 1989 observaron en el cerebro que la cantidad de LPO aumenta a los 11 meses de

edad en los SAMP8 comparado con los 3 meses de edad. En nuestro estudio encontramos que los niveles de LPO aumentaron significativamente en mitocondrias de los ratones SAMP8 a los 10 meses, mientras que no cambiaron en el caso de los SAMR1. Estas diferencias pueden deberse al envejecimiento acelerado en los SAMP8 [Liu y Mori, 1993; Matsugo y cols., 2000; Nomura y cols., 1989]. El aumento de la LPO también está de acuerdo con la reducción de la fluidez de la membrana mitocondrial encontrada en hembras SAMP8 durante el envejecimiento [Yarian y cols., 2005]. Además, recientemente se ha encontrado que el MDA, un producto de la LPO, induce daño oxidativo a la aconitasa y ATP sintasa en corazón y músculo esquelético [Yarian y cols., 2005], un hecho que esta de acuerdo con la reducción en el contenido de ATP en las mitocondrias de SAMP8 a los 10 meses de edad.

El sistema de defensa mitocondrial incluye la SOD y el ciclo del glutatión. Cuando el $O_2^{\cdot-}$ dismuta a H_2O_2 , la GPx transforma H_2O_2 en H_2O . En este proceso, GSH es oxidado a GSSG y la enzima GRd restaura los niveles de GSH. El estado redox del glutatión de un tejido es dependiente de dos factores: de la cantidad de GSH y del ratio entre GSH y GSSG [Jones, 2002; Droge, 2002]. Un aumento en el GSSG refleja el equilibrio entre la formación de GSSG y su reconversión a GSH, mientras que la ratio GSH:GSSG es indicativo del estado redox global. El GSH es un ubicuo tripéptido, la mayor fuerza reductora para mantener el equilibrio redox intracelular y regular las defensas celulares. Bajo condiciones normales, una baja carga oxidante y una alta actividad biosintética están asociadas con altos niveles de GSH. Esto ocurre bajo condiciones de restricción calórica que atenúan la tasa de producción mitocondrial de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 [Sohal y cols., 1994; Rebrin y cols., 2003]. En nuestro estudio, ya a los 5 meses de edad, los ratones SAMP8 muestran un bajo ratio GSH:GSSG comparados con los SAMR1. Este hecho refleja una tendencia oxidante de la mitocondria debido a la alta producción de ROS en los SAMP8 [Rebrin y Sohal, 2004]. El contenido de glutatión total en mitocondrias diafragmática disminuye en los SAMP8 a los 5 meses de edad comparados con los niveles de los SAMR1. Este cambio se debe fundamentalmente a la reducción de los niveles de GSH. Ya que la mitocondria no sintetiza GSH, su disminución se debe probablemente a una reducción del transporte de GSH citosólico hacia la mitocondria, un hecho que también se ha observado para la SOD en ratones SAM [Park y cols., 1996].

A los 5 meses de edad, la mitocondrias diafragmáticas de los SAMP8 tiende a aumentar la actividad de la GPx comparada con los SAMR1, reflejando una situación hacia la formación de peróxido de hidrógeno. La actividad de la GPx disminuye a los 10 meses de edad tanto en SAMR1 como en SAMP8. Por otro lado, la actividad de GRd disminuye tanto en SAMR1 como en SAMP8 a los 10 meses de edad. La enzima GRd es un sensible indicador del estrés oxidativo, que puede ser dañado irreversiblemente, reduciendo su habilidad para reciclar

GSH [Martín y cols., 2000a]. Otra vez más, nuestros datos vuelven a sugerir que los SAMP8 están bajo un mayor estrés oxidativo que los SAMR1.

Pero una cuestión importante es ver si estos signos de estrés oxidativo presentes en mitocondrias diafragmáticas son el preludio de un fallo mitocondrial. Para ello estudiamos la actividad de los complejos respiratorios y el contenido de nucleótidos en mitocondrias diafragmáticas en ratones SAM.

Los resultados obtenidos muestran una disminución de la actividad de los complejos respiratorios II, III y IV en mitocondrias diafragmáticas de los SAMP8 y SAMR1. Tanto a los 5 como a los 10 meses de edad, la actividad de los complejos III y IV disminuyeron en los SAMP8 comparados con los SAMR1. Esto demuestra que el daño asociado al envejecimiento es mayor en mitocondrias de los SAMP8, probablemente debido a un mayor daño en esta organela como resultado de un desacoplamiento causado por un daño a la membrana [Nakahara y cols., 1998]. De acuerdo con esta hipótesis estaría el aumento de los niveles de LPO observado en las mitocondrias de los SAMP8 a los 10 meses de edad.

El hecho más importante en este trabajo es el papel de la aMT en la reducción del daño oxidativo mitocondrial. Muchos estudios han demostrado que la administración aguda de aMT, un antioxidante y depurador de radicales libres [Tan y cols., 2000a,b, 2002; Turjanski y cols., 2001; Antolin y cols., 1996] contrarresta las deficiencias mitocondriales en los ratones SAM [Okatani y cols., 2002a,b,c]. La aMT es un depurador de radicales libres y debe considerarse como un componente del sistema antioxidante endógeno [Reiter y cols., 1998, 2000]. Una molécula de aMT puede depurar 2 moléculas de radicales libres, bien un radical hidroxilo y un anión superóxido o dos radicales hidroxilos [Nishikawa y cols., 1998; Castillo y cols., 2005]. Además, la aMT es una molécula lipofílica, lo que le permite cruzar las membranas celulares, enriqueciendo los compartimentos intracelulares [Costa y cols., 1997; Menéndez-Peláez y cols., 1993a]. Experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que la aMT influencia la homeostasis mitocondrial. Bajo condiciones normales, la aMT reduce los niveles de hidroperóxido mitocondrial y estimula la actividad de dos enzimas envueltas en el balance GSH-GSSG, como GPx y GRd [Martín y cols., 2000; Acuña-Castroviejo y cols., 2001]. Así, la aMT aumenta la actividad de los complejos de la ETC [Escames y cols., 2005; Martín y cols., 2002; López y cols., 2006] y, en consecuencia, aumenta la producción de ATP.

Los resultados obtenidos muestran cómo la administración crónica de aMT en los SAMP8 previene la disfunción mitocondrial como resultado del estrés oxidativo. De hecho, la aMT reduce la LPO en mitocondrias diafragmáticas incluso por debajo de los valores encontrados a los 5 meses de edad tanto en SAMR1 como en SAMP8. Como hemos visto, la

aMT es una molécula lipofílica que cruza las membranas celulares con facilidad enriqueciendo los compartimentos subcelulares [Menéndez-Peláez y cols, 1993a], incluyendo la mitocondria, donde puede acumularse a altas concentraciones [Acuña-Castroviejo y cols., 2003]. Además, la aMT interacciona con los lípidos de membrana [Costa y cols., 1997] y estabiliza la membrana interna mitocondrial [García y cols., 1999]. Por lo que en esta posición la aMT estaría bien situada para actuar como depurador de radicales libres y así las membranas podrán resistir el daño oxidativo.

La capacidad antioxidante de la aMT también se refleja por el significativo aumento de la ratio GSH:GSSG en SAMR1 y SAMP8. Este efecto y su habilidad para elevar el contenido del glutatión total en la mitocondria, principalmente debido a una elevación del GSH, pueden estar relacionados con el efecto estimulante de la aMT sobre la actividad de la gamma-glutanilcisteina sintetasa, la enzima reguladora de la síntesis del GSH [Barrientos, 2002]. Además, la aMT aumentó la actividad de GPx y GRd en SAMP8, incluso por encima de los valores a los 5 meses de edad, elevando su biodisponibilidad en la mitocondria.

Además, el tratamiento crónico con aMT mejora la actividad de la ETC, especialmente en los SAMP8. Por otro lado, los SAMP8 presentan un aumento de los niveles mitocondriales de ATP y de la ratio ATP/ADP. Estos datos están avalados por numerosos estudios que indican un efecto importante de la aMT sobre la actividad de la cadena respiratoria [Martín y cols., 2000b, 2002; Escames y cols., 2005; López y cols., 2006].

En general, los resultados sugieren que el estrés oxidativo debido a la generación de radicales libres combinado con una pérdida en la eficiencia de los sistemas de defensa contra el estrés oxidativo puede resultar en la alteración de la función mitocondrial observada en los SAMP8. Estas observaciones estarían de acuerdo con las predicciones hechas por la teoría mitocondrial del envejecimiento [Miquel, 1998]. El aumento del estrés oxidativo con la edad puede deberse a una reducción de los niveles de aMT en diferentes tejidos en los SAMP8, como se ha demostrado recientemente [Lardone y cols., 2006]. En consecuencia, es lógico suponer que el tratamiento suplementario crónico con aMT en el agua de bebida va a prevenir la disfunción mitocondrial asociada a la edad, que es más evidente en los SAMP8 que en los SAMR1. Estos datos sugieren que el uso de aMT debe mejorar las alteraciones mitocondriales relativas a la edad en humanos.

1.2.- Corazón (Free Radic Res., 41:15-24, 2006)

El otro órgano que hemos estudiado para evaluar el daño mitocondrial asociado al envejecimiento es el corazón. Su elevada actividad energética durante la vida implica una elevada producción de radicales libres, que deben ser eficazmente neutralizados para mantener su función. Pero a su vez, el envejecimiento puede afectar a los mecanismos cardíacos de defensa antioxidante, disminuyendo la capacidad de producir ATP y, por tanto, la eficiencia cardíaca.

Nuestros resultados muestran cómo la LPO aumenta en mitocondrias cardíacas en ratones SAMP8 hembras durante el envejecimiento, mientras que no cambia en el caso de los SAMR1 a la misma edad. Esta diferencia puede reflejar la alta generación de ROS en este grupo debido al envejecimiento acelerado [Liu y Mori, 1993; Matsugo y cols., 2000; Nomura y cols., 1989]. El aumento de la LPO es también consistente con la reducción de la fluidez de la membrana encontrada durante el envejecimiento en hembras SAMP8 [Karbownik y cols., 2000]. Además, como ya vimos, el daño inducido por el MDA, un producto de la LPO, sobre la aconitasa y la ATP sintasa en corazón y músculo esquelético [Yarian y cols., 2005], puede explicar la reducción en el contenido de ATP en las mitocondrias de SAMP8 a los 10 meses de edad observado en nuestro estudio.

Por otro lado, la ratio GSH:GSSG, que refleja el estado redox de un tejido [Jones, 2002; Droge, 2002], disminuye en ratones SAMP8 a los 5 meses de edad comparados con los SAMR1, diferencia que se mantiene a los 10 meses de edad. Este hecho vuelve a reflejar una tendencia oxidante en la mitocondria debido a la alta producción de ROS en los SAMP8 [Rebrin y Sohal, 2004]. En cuanto al contenido del glutatión total, en mitocondrias de corazón, generalmente disminuye en los SAMP8 a los 5 meses de edad comparado con los niveles observados en los SAMR1, lo que depende de la disminución de los niveles del GSH mitocondrial. Al igual que comentamos para el diafragma, ya que la mitocondria no sintetiza GSH, su descenso probablemente dependa de un bajo transporte del GSH desde el citosol, como ocurre en otros casos.

En relación a los enzimas del ciclo del glutatión, a los 5 meses de edad las mitocondrias cardíacas de los SAMP8 presentan una mayor actividad de la GPx que los SAMR1, reflejando mayor producción de peróxido. En consecuencia, el déficit en el GSH encontrado a los 10 meses de edad en SAMP8 refleja la reducción de la actividad de GPx. La actividad de la GRd es menor en SAMP8 que en SAMR1 tanto a los 5 como a los 10 meses de

edad. Otra vez más, nuestros resultados sugieren que los ratones SAMP8 están bajo un mayor estrés oxidativo que los SAMR1.

Otra cuestión importante es ver si esos signos de estrés oxidativo presentes en mitocondrias cardíacas de los ratones SAMP8 son el preludio de fallo mitocondrial y si es así, si pueden ser en parte responsables del acortamiento de la esperanza de vida en los ratones SAMP8 comparados con los SAMR1.

Junto a la inducción de ROS en la mitocondria, la tiolación de proteínas puede representar un evento subsiguiente responsable de muchas de las alteraciones incluyendo el daño bioenergético que aparecerá más tarde [Rebrin y Sohal, 2004]. Esas alteraciones pueden subyacer al daño a la respiración mitocondrial que se observa en mitocondrias de hígado. Se ha calculado que a los 18 meses de edad, las mitocondrias hepáticas de los ratones SAMP8 son incapaces de producir suficiente cantidad de ATP para el metabolismo normal de la célula [Nakahara y cols., 1998]. En el presente estudio encontramos una reducción relacionada con la edad de la actividad de los complejos respiratorios II, III y IV en mitocondrias de corazón de SAMP8, mientras que únicamente la actividad del complejo II disminuyó en los SAMR1. A los 5 meses de edad, la actividad de los cuatro complejos de la ETC fueron similares tanto en SAMR1 como en SAMP8; por lo que el daño asociado a este proceso de envejecimiento es mayor en mitocondrias de los SAMP8 que en los SAMR1, posiblemente como resultado de un desacoplamiento causado por el daño a la membrana [Nakahara y cols., 1998]. El aumento de los niveles de LPO en las mitocondrias de los ratones SAMP8 a los 10 meses de edad apoya esta hipótesis. El daño a la ETC está relacionado con la reducción en la síntesis de ATP medida en los SAMP8 a los 10 meses de edad, hecho que no ocurre en el caso de los SAMR1.

Las propiedades antioxidantes de la aMT, especialmente para reducir el daño oxidativo mitocondrial, se han confirmado en nuestro estudio. En efecto, muchos estudios han demostrado que la administración aguda de aMT, un antioxidante y depurador de radicales libres [Antolin y cols., 1996; Tan y cols., 1993, 2000a,b, 2002], contrarresta las deficiencias mitocondriales encontradas en ratones SAM [Okatani y cols., 2002a,b,c]. In vitro, concentraciones nanomolares de aMT normalizaron el contenido de GSH y aumentaron la actividad de enzimas antioxidantes incluyendo GPx y GRd en mitocondrias deplecionadas de GSH [Martín y cols., 2000a; Acuña-Castroviejo y cols., 2001]. Además, hemos visto que también estimula la actividad de los complejos de la ETC tanto in vivo como in vitro [Escames y cols., 2005; Martín y cols., 2002; López LC y cols., 2006], y la producción de ATP [Martín y cols., 2002; Castillo y cols., 2005].

La administración de aMT reduce la LPO en mitocondrias cardiacas por debajo de los valores encontrados a los 5 meses de edad, no sólo en los SAMP8 también en los SAMR1. Este efecto depende de la capacidad lipofílica de la aMT, que le permite intercalarse entre las cabezas polares de los fosfolipidos de membrana [Bongiorno y cols., 2005].

La habilidad antioxidante de la aMT también se refleja en el significativo aumento de la ratio GSH:GSSG en los ratones SAMR1 y SAMP8. Estos efectos de la aMT se acompañaron de un aumento del contenido del glutation total, principalmente debido a una elevación del GSH. De nuevo aquí podemos sugerir un efecto estimulante de la aMT sobre la síntesis de GSH [Urata y cols., 1999]. Por otra parte, la aMT aumenta la actividad de la GPx y GRd en ratones SAMP8, elevando la biodisponibilidad del GSH para la mitocondria.

Un hecho interesante es que la aMT reduce la actividad de la GPx en ratones SAMR1. La aMT es un depurador directo de radicales libres, y muchos experimentos documentan que puede ser sustituta del GSH. Es el caso de la prevención de cataratas por la aMT que ocurre en ausencia de GSH, después de que la síntesis del tiol ha sido iniciada por butiimina sulfoximina [Siu y cols., 2006]. Así, en presencia de bajo estrés oxidativo y alta cantidad de aMT, que es probablemente la situación de los SAMR1 tratados con el indol, la aMT depura un número suficiente de radicales libres resultando en una reducción en el sistema GPx-GSH.

Una consecuencia adicional, pero no menos importante, de la administración crónica de aMT es la mejora de la actividad de la ETC. Si se exceptúa el complejo II, la aMT aumenta la actividad de los restantes complejos, especialmente en los ratones SAMP8. Además, las mitocondrias de estos ratones presentan un aumento de los niveles mitocondriales de ATP y en el ratio ATP/ADP. Numerosos estudios han demostrado que la aMT realza la función de la ETC [Martín y cols., 2000b, 2002; Escames y cols., 2005; López y cols., 2006]. Los mecanismos subyacentes de esta acción no se conocen bien, pero su repercusión es que la aMT puede elevar la eficiencia de la fosforilación oxidativo y la síntesis de ATP [Martín y cols., 2002; Castillo y cols., 2005]. Así, los efectos de la administración crónica de aMT podrían estar acompañados de una mejora en la función cardiaca y en la supervivencia de los ratones. Aunque no hemos medido ningún parámetro de la función del corazón después de la administración de aMT, la mejora bioenergética que supuso el tratamiento con aMT debe reflejarse en un adecuado mantenimiento de la contractilidad miocárdica.

En resumen, estos resultados revelan que los ratones SAMP8 muestran mayores niveles de daño oxidativo y daño en la cadena respiratoria mitocondrial comparados con los SAMR1. Estos datos, junto a los obtenidos en mitocondrias de diafragma, apoyan las predicciones hechas por la hipótesis del estrés oxidativo mitocondrial en el envejecimiento

[Miquel., 1998]. Por otro lado, el tratamiento suplementario crónico con aMT en el agua de bebida fue muy eficaz para contrarrestar el daño en la función mitocondrial asociada al envejecimiento, que es más evidente en el caso de los corazones de ratones SAMP8 que en los SAMR1.

1.3.- Estudio comparativo de los resultados obtenidos en mitocondrias de corazón y diafragma

Aunque el envejecimiento es un proceso que depende en gran medida de la producción de radicales libres, no todos los órganos y tejidos envejecen al mismo tiempo, ya que ni producen la misma cantidad de radicales libres ni tienen la misma eficacia de sus sistemas de defensa antioxidante. Por ello, hemos comparado aquí si el envejecimiento afecta de manera diferente a las mitocondrias de los dos tejidos estudiados, diafragma y corazón. Asimismo, comparamos también la eficacia del tratamiento crónico con aMT sobre la función de dichas mitocondrias.

En cuanto a los parámetros de estrés oxidativo (Tabla 3), los datos obtenidos de la comparación entre corazón y diafragma pueden ser agrupados en dos características principales:

- a) las mitocondrias de diafragma muestran un menor estrés oxidativo que las de corazón en términos de niveles de LPO, aunque tienen una menor ratio GSH:GSSG.
- b) las actividades de las enzimas GPx y GRd son mayores en el diafragma que en el corazón.

Las diferencias observadas en la ratio GSH:GSSG indican que existen diferentes estados redox en mitocondrias de diferentes tejidos, como se había sugerido anteriormente [Rebrin y Sohal, 2004]. En conjunto, estos parámetros nos indican que las mitocondrias diafragmáticas están mejor protegidas contra el estrés oxidativo que las de corazón. Las diferencias entre los tejidos en términos de resistencia al estrés oxidativo son importantes y pueden estar relacionadas con la función de esos tejidos. Ambos, corazón y diafragma, son músculos que operan rítmicamente, aunque la frecuencia de contracciones del músculo cardíaco es entre 3-4 veces mayor que la del diafragma. Esto significa que la producción de

ROS/RNS en mitocondrias de corazón será mayor que en las del diafragma. Aunque por este motivo el corazón debería tener un sistema antioxidante más eficiente, nuestros resultados muestran que el diafragma está más protegido frente al estrés oxidativo que el corazón, lo cual también puede depender de esa menor producción de radicales libres.

Otra cuestión importante es ver si esos signos, más abundantes, de estrés oxidativo presentes en mitocondrias cardíacas en ratones SAM son el preludio de fallo mitocondrial. La producción de ROS/RNS en la mitocondria, conlleva una tiolación de proteínas, que a su vez altera la función de éstas, lo que se reflejará en el daño bioenergético que aparecerá más tarde [Rebrin y Sohal, 2004]. Estas alteraciones pueden ser la base del daño de la CTE. En nuestro estudio hemos medido la actividad de los complejos respiratorios I, II, III y IV; así como el contenido de ATP (Tabla 4). Los resultados muestran la existencia de una mayor disminución de la actividad de todos los complejos respiratorios en mitocondrias cardíacas con respecto a las diafragmáticas, mientras que el contenido de ATP y el ratio ATP/ADP se mantiene. Estos datos nos indican también una mayor tendencia a la disfunción bioenergética mitocondrial en el caso del corazón.

Los resultados de este estudio indican que las mitocondrias cardíacas están peor protegidas frente al estrés oxidativo y la bioenergética mitocondrial durante el envejecimiento en ratones SAM. Independientemente de esas diferencias, los resultados también indican la presencia de signos importantes de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en ambos tejidos, lo que puede estar relacionado directamente con una reducción en la funcionalidad de estos tejidos.

2.- RESPUESTA INFLAMATORIA PRODUCIDA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO EN RATONES MACHOS Y HEMBRAS SAMR1 Y SAMP8
(*J Pineal Res.*, Doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00416.x, 2006)

El objetivo principal de este estudio es evaluar la presencia de un proceso inflamatorio durante el envejecimiento, así como el papel anti-inflamatorio de la administración crónica de aMT. Nuestro estudio indica un aumento de citoquinas pro-inflamatorias, principalmente, INF- γ y TNF- α , en plasma de ratones SAMR1 y SAMP8 a los 10 meses de edad. Además, el tratamiento con aMT dado en el agua de bebida desde el primer mes y continuando hasta el noveno, contrarresta totalmente dicho aumento. Este proceso inflamatorio asociado al envejecimiento conlleva una elevación de los niveles de nitritos, que también son reducidos después de la administración de aMT. Estos resultados apoyan el concepto de que la aMT no sólo tiene un efecto antioxidante importante, sino que también ejerce un potente efecto anti-inflamatorio. Ambos efectos son la base del efecto protector de la aMT frente al envejecimiento.

El envejecimiento es un proceso multifactorial relacionado con el estrés oxidativo y nitrosativo. El proceso inflamatorio es un mecanismo protector fisiológico que actúa en respuesta a un daño celular o destrucción de tejidos. Así, el daño celular por los radicales libres durante el envejecimiento puede inducir una respuesta crónica pro-inflamatoria. Como se ha visto recientemente con el mismo paradigma experimental, los ratones SAMP8 muestran un aumento del daño oxidativo, resultando en una disfunción asociada con el envejecimiento acelerado [Rodríguez y cols., 2006; Canudas y cols., 2005; Nogués y cols., 2006]. Aquí se pretende estudiar si el estrés oxidativo está acompañado por un estado inflamatorio, midiendo los niveles de nitritos y citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-2, INF- γ , TNF- α y GM-CSF en plasma, que promueven la inflamación y los niveles de citoquinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-5 y IL-10 que suprimen la actividad de citoquinas pro-inflamatorias. Muchos procesos inflamatorios están asociados con efectos citotóxicos semejantes. La iNOS se expresa típicamente en respuesta a un estímulo inmunológico y produce nanomoles, más que picomoles de NO \cdot , que son los niveles en reposo. El NO \cdot puede actuar como una molécula citostática y citotóxica para bacterias, hongos, helmintos y organismos protozoarios así como en células tumorales. Como consecuencia de la inducción de la iNOS, se producen altos niveles de NO \cdot y ONOO $^-$ (formados de la reacción entre el NO \cdot y O $_2^-$), estos últimos particularmente citotóxicos [Floydra y cols., 2000]. La producción de NO es múltiple y puede resultar de una respuesta inmune contra la activación de macrófagos y células tumorales, por la inducción de iNOS en células tumorales por ellos mismos, o de la vasodilatación de las células sanguíneas por citoquinas pro-inflamatorias, a consecuencia de la activación de la NOS endotelial (eNOS). Las citoquinas también pueden afectar a la producción de NO \cdot por la NOS

neuronal (nNOS), que puede inhibirse por antioxidantes y/o por anti-inflamatorios incluyendo la aMT y sus metabolitos [León y cols., 2006; Mayo y cols., 2005]. Nuestros datos muestran que los niveles de nitritos aumentan en SAMR1 y SAMP8 a los 10 meses de edad. También, los niveles de citoquinas pro-inflamatorias como INF- γ y TNF- α aumentaron significativamente a los 10 meses de edad. INF- γ es considerado una citokina pro-inflamatoria porque realza la actividad de TNF- α e induce iNOS y NO $^{\cdot}$. IL-1 β y TNF- α son inductores de moléculas de adhesión endoteliales, que son esenciales para la adhesión de leucocitos a la superficie endotelial antes de la migración en los tejidos. En este respecto, se ha visto que los ratones SAM tienen una expresión elevada de IL-1 β , TNF- α y IL-6 a los 10 meses de edad, especialmente en el hipocampo, un hecho que está relacionado con la disfunción neuronal y/o deficiencias de aprendizaje y memoria encontradas en los ratones SAMP8 [Kyikiytha y cols., 2000]. El incremento de estas citoquinas pro-inflamatorias puede ser debido al bloqueo de las anti-inflamatorias como IL-4 y IL-10, que suprimen la producción de IL-1 β y TNF- α . Se piensa que el balance o equilibrio entre citoquinas pro- y anti-inflamatorias determinan el resultado de la enfermedad. Esto también sería aplicable al envejecimiento. De hecho, nuestros resultados muestran que los niveles de citoquinas anti-inflamatorias disminuyeron a los 10 meses de edad. Estos datos indican una condición patológica de los ratones SAM a lo largo de la edad, porque las citoquinas anti-inflamatorias proveen un control insuficiente sobre las pro-inflamatorias.

En los últimos años se le ha dedicado mucha atención a la posible interacción entre la aMT y el sistema inmune [Carrillo-Vico y cols., 2006; García-Mauriño y cols., 1997; Esquifino y cols., 2004]. Lissoni y colaboradores [Lissoni y cols., 1997] proponen que la melatonina es un potente agente anti-inflamatorio. Ya que los radicales libres están relacionados con el proceso inflamatorio, la administración de aMT puede tener un efecto beneficioso doble, al reducir el estrés oxidativo y la inflamación [Reiter y cols., 2001, 2003; Acuña-Castroviejo y cols., 2001; León y cols., 2005]. Se ha propuesto que la aMT regula el sistema inmune al afectar a la producción de citoquinas en las células inmunocompetentes [García-Mauriño y cols., 1997].

Los ROS juegan un papel importante en la regulación de las citoquinas ya que la aMT inhibe las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α y IL-1 β en la inflamación aguda y en la lesión post-isquemia reperusión [Carrillo-Vico y cols., 2006; García-Mauriño y cols., 1997]. La aMT también estimula la producción de los precursores de granulocitos y macrófagos (GM-CFU) y tiene una acción estimuladora de la hematopoyesis [Maestroni y cols., 1996]. Además, la aMT inhibe la expresión de la iNOS e inhibe directamente la actividad catalítica de la nNOS [León y cols., 2000, 2006; Escames y cols., 2003, 2006], depura ONOO $^{\cdot}$ [Allegra y cols., 2003; Guenther y cols., 2005]. Aunque la aMT tiene cierta capacidad para depurar NO $^{\cdot}$, su efecto

principal para reducir los niveles de NO[•] depende de su capacidad para inhibir la NOS. En este sentido, la aMT inhibe la expresión de la iNOS en macrófagos activados con LPS por la inhibición de la activación de NFκB [Mayo, 2005; Escames y cols., 2003, 2006; Crespo y cols., 1999]. En conexión con estas propiedades anti-inflamatorias, encontramos que la aMT redujo la producción de citoquinas pro-inflamatorias incluyendo TNF-α, INF-γ; IL-2 y GM-CSF en los ratones SAM. Es probable que el papel anti-inflamatorio de la aMT le haga innecesario el aumento de citoquinas anti-inflamatorias IL-4, IL-5 e IL-10, porque la propiedad de esta indolamina es suficiente para compensar el proceso inflamatorio durante el envejecimiento.

3.- COMENTARIOS FINALES

Aquí debemos hacer dos comentarios adicionales. Primero, no se encontraron diferencias importantes entre hembras y machos en los parámetros estudiados. Por tanto, el papel antioxidante y neuroprotector achacado a los estrógenos parece no ser suficiente para ejercer un efecto significativo a los 10 meses de edad. En segundo lugar, no se detectan diferencias significativas entre las citoquinas y/o los niveles de nitritos entre SAMR1 y SAMP8. Estos datos sugieren que el proceso inflamatorio que subyace al envejecimiento en los ratones SAMP8 es similar al de los SAMR1 al menos hasta los 10 meses de edad. Probablemente estas diferencias en los parámetros medidos aparezcan más tarde en los SAMP8 comparados con los SAMR1.

La aMT se comporta como una molécula excepcional contra el envejecimiento, a causa de sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias. Los efectos beneficiosos de la administración crónica de aMT frente al envejecimiento aquí descritos y en trabajos anteriores [Rodríguez y cols., 2006; Canudas y cols., 2005; Nogués y cols., 2006; Reiter y cols., 2002b], junto a la reducción de la producción de aMT pineal y extrapineal en ratones SAM durante el envejecimiento [Reiter, 1992; Lardone y cols., 2006], proporciona una base experimental importante para relacionar los niveles de aMT y el estrés oxidativo/nitrosativo del envejecimiento. Es por esto por lo que la administración de aMT tiene aplicabilidad clínica potencial para algunos desórdenes relacionados con la edad.

Por otro lado, nuestros resultados revelan que los ratones SAMP8 muestran mayores niveles de daño oxidativo y daño en la cadena respiratoria mitocondrial que los SAMR1. Estos datos avalan las predicciones hechas por la hipótesis del estrés oxidativo mitocondrial en el envejecimiento [Miquel, 1998]. Se ha descrito que los antioxidantes en la dieta aumentan el contenido mitocondrial de GSH y en la ratio GSH:GSSG [Sastre y cols., 1998; Rebrin y cols.,

2005]. Sin embargo, sólo una dieta suplementada con diferentes tipos de antioxidantes es útil para provocar esos efectos [Rebrin y cols., 2005]. Nosotros, con nuestro estudio, demostramos que la aMT, administrada regularmente, es capaz por si sola y sin necesidad de otro antioxidante, de contrarrestar el estrés oxidativo y nitrosativo producido durante el envejecimiento. Además, a diferencia de otros antioxidantes, la aMT también contrarresta la inflamación dependiente del propio envejecimiento. En definitiva, consideramos que la aMT es un antioxidante/anti-inflamatorio excepcional cuyo uso regular ayudará significativamente en el mantenimiento de un saludable proceso de envejecimiento.

— *Conclusiones* —

- 1^a Se aprecian evidencias significativas de estrés oxidativo y daño en la cadena respiratoria en mitocondrias de corazón y diafragma a los 10 meses de edad, lo que apoya la Teoría Mitocondrial del Envejecimiento. Especialmente a los 10 meses de edad, los ratones SAMP8 muestran mayor daño en mitocondrias de corazón y diafragma que los SAMR1.
- 2^a El envejecimiento en los ratones SAM se asocia también a una reacción inflamatoria, dando lugar a un aumento de NO^{*} y citoquinas pro-inflamatorias.
- 3^a La administración exógena de aMT desde el destete impide el deterioro de la función mitocondrial asociada al envejecimiento, ya que contrarresta el estrés oxidativo hasta niveles incluso por debajo de los encontrados a los 5 meses de edad.
- 4^a La administración crónica de aMT en el agua de bebida contrarresta también el estrés nitrosativo y la reacción inflamatoria del envejecimiento. A este respecto, la aMT se comporta como una molécula excepcional frente al envejecimiento, a causa de sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias.
- 5^a En consecuencia, el envejecimiento debe ser considerado no sólo bajo la Teoría Mitocondrial del Envejecimiento, por los radicales de oxígeno, sino también como consecuencia de un proceso inflamatorio y daño por radicales de nitrógeno. Es por ello por lo que se debe considerar el envejecimiento bajo una Teoría Inflamatoria-Mitocondrial que aquí proponemos.
- 6^a La mejoría de la bioenergética mitocondrial, y la reducción de la inflamación debidas a la aMT sugieren que su administración podría ser beneficiosa para retrasar dichos fenómenos asociados al envejecimiento humano.

— *Bibliografia* —

- Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ (2001) Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 30: 65-74.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter RJ (2002) Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem* 2: 133-151.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, León J, Carazo A, Khaldy H (2003) Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Advances in experimental Medicine and Biology* 527: 549-557.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, López LC, Hitos AB, León J (2005) Melatonin and nitric oxide: two required antagonists for mitochondrial homeostasis. *Endocrine* 27: 159-68.
- Aimoto T, Rohde BH, Chiou GC, Lauber JK (1985) N-acetyltransferase activity in the eyes of glaucomatous chickens. *J Ocular Pharmacol* 1: 149-60.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615.
- Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA (2003) The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 34: 1-10.
- Ames BN, Shigenaga AM, Hagen TM (1995) Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta* 1271: 165-70.
- Andrew PJ, Mayer B (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43: 521-31.
- Anggard E (1994) Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 343: 1199-1206.
- Antolin I, Mayo JC, Sainz RM, del Brio M de L, Herrera F, Martín V, Rodríguez C (2002) Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res* 943: 163-73.
- Antolin IC, Rodríguez RM, Sainz JC, Mayo H, Aria M, Kotle MJ, Rodríguez-Colunga J, Toliva D, Menéndez-Peláez A (1996) Neurohormone aMT prevents damage: Effect on gene expression for antioxidative enzymes. *FASEB J* 10: 882-890.
- Axelrod J, Weissbach H (1961) Purification and properties of hydroxyindole-O-methyltransferase. *J Biol Chem* 236: 211-3.
- Axelrod J (1974) The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184: 1341-8.
- Babior BM, Woodman RC (1990) Chronic granulomatous disease. *Semin Hematol* 27: 247-259.
- Barja G (1999) Mitochondrial oxygen radical generational leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomemb* 31: 347-66.
- Barrientos A (2002) In vivo and in organelle assessment of OXPHOS activities. *Methods* 26: 307-316.
- Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-37.
- Bongiorno D, Ceraulo L, Ferrugia M, Filizzola F, Ruggirello A, Liveri VT (2005) Localization and interactions of melatonin in dry cholesterol/lecithin mixed reversed micelles used as cell membrane models. *J Pineal Res* 38: 292-298.
- Bou-Resli MN, Gumaa KA, Al-Zaid NS (1991) Changes in collagen content of the diaphragm in rats of different ages. *Acta Physiol Hung* 77: 147-152.
- Brusque AM, Borba R, Schuck PF, Dalcin KB, Ribeiro CA, Silva CG, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Briones P, Wajner M (2002) Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* 40: 593-601.
- Busciglio J, Yanker BA (1995) Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* 378: 776-779.
- Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Allen KL, Carney JM (1997) Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl- α -phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 674-678.
- Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev M (1995) Melatonin protects neurons from

singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* 18: 222.

Cahill GM, Berharse JC (1989) Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1098-102.

Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallas M (2005) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* 126: 1300-1304.

Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernández-Montesinos R, Guerrero JM, Pozo D (2006) The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs* 7: 423-431.

Castelluccio C, Baracca A, Fato R, Pallotti F, Maranesi M, Barzanti V, et al. (1994) Mitochondrial activities of rat heart during ageing. *Mech Ageing Dev* 76: 73-88.

Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA (2005) Effect on melatonin administration on parameters related to oxidative damage in hepatocytes isolated from old Wistar rats. *J Pineal Res* 38: 140-146.

Chuang JI, Mohan N, Meltz ML, Reiter RJ (1996) Effect on melatonin on NF- κ B DNA-binding activity in the rat spleen. *Cell Biol Int* 20: 687-92.

Chung HT (1998) Reactive nitrogen and oxygen species transducers as well as effects. *Ajou Med J* 85-95.

Chung HY, Kim HJ, Kim JW, Yu BP (2001) The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by caloric restriction. *Ann NY Acad Sci* 928: 327-335.

Coleman R, Weiss A, Finkelbrand S, Silbermann M (1988) Age and exercise-related changes in myocardial mitochondria in mice. *Acta Histochem* 83: 81-90.

Costa EJX, Shida CS, Biaggi MH, Ito AS, Lamy-Freund MT (1997) How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. *FEBS Lett* 416: 103-106.

Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F, Guerrero JM, Acuña-Castroviejo D (1999) Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J* 15: 164-170.

Criswell D, Powers S, Herb R, Dodd S (1997) Mechanism of specific force deficit in the senescence rat diaphragm. *Respir Physiol* 107: 149-155.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Calabrò G, Dugo L, De Sarro A, van De Loo FA, Caputi AP (2000) Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1859-66.

Cuzzocrea S, Thiemermann C, Salvemini D (2004) Potential therapeutic effect on antioxidant therapy in shock and inflammation. *Curr Med Chem* 11: 1147-1162.

De Almeida EA, Martinez GR, Klitzke CF, de Medeiros MH, Di Mascio P (2003) Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen ($O_2^1\Delta$) produces N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine. *J Pineal Res* 35: 131-137.

De Atenor MS, de Romero IR, Brauckmann E, Pisano A, Legname AH (1994) Effects of the pineal gland and melatonin on the metabolism of oocytes in vitro and on ovulation in *Bufo arenarum*. *J Exp Zool* 268: 436-441.

De la Asunción JG, Millán A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, y + (1996) Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 10: 333-8.

Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.

Erren TC, Reiter RJ, Piekarski C (2003) Light, timing of biological rhythms, and chronodisruption in man. *Naturwissenschaften* 90: 485-94.

Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo (2003) Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthases in rats. *FASEB J* 17: 365-375.

- Escames G, López LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, León J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D (2005) Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of sepsis mice. *J Pineal Res* 17: 932-934.
- Escames G, López LC, Tapias V, Utrilla MP, Reiter RJ, Hitos AB, León J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D (2006) Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 40: 71-78.
- Escames G, López LC, Ortiz F, Ros Eduardo, Acuña-Castroviejo D (2006) Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol*. 41: 1165-73.
- Esquifino AI, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP (2004) Circadian organization of the immune response: a role for melatonin. *Clin Appl Immunol Rev* 4: 423-433.
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 186: 407-21.
- Estrabrook RW (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements of ADP:O ratios. *Meth Enzymol* 10:41.
- Feldman ML, Navaratnam V (1981) Ultrastructural changes in atrial myocardium of rat. *J Anatomy* 133: 7-17.
- Floydra y Hensley (2000) Nitron inhibition of age-associated oxidative damage. *Ann N Y Acad Sci* 899: 222-237.
- Frenzel H, Fiemann J (1984) Age dependent structural changes in the myocardium of rats. A quantitative light and electron microscopic study on the right and left chamber wall. *Mech Ageing Dev* 27: 29-41.
- Fujiwara M, Shibata M, Watanabe Y, Nikiwa T, Hirata F, Mizuno N, Hayaishi O (1978) Indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem* 253: 6081.
- García JJ, Reiter RJ, Pie J, Ortiz GG, Cabrera J, Sainz RM, Acuña-Castroviejo D (1999) Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *Bioenerg Bimembr* 31: 609-616.
- García-Mauriño S, González-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sánchez-Margalet V, Goberna R and Guerrero JM (1997) Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN- γ production by human circulating CD4⁺ cells: A possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 159: 574-581.
- Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C (1997) Melatonin is scavenger of peroxynitrite. *Life Sci* 60: PL169-74.
- Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL, Szabo C (1998) Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF κ B activation. *FASEB J* 12: 685-693.
- Gosselin LE, Johnson BD, Sieck GC (1994) Age-related changes in diaphragm muscle contractile properties and myosin heavy chain isoforms. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 174-178.
- Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, Tannenbaum SR (1981) Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7764-8.
- Grisham MB (1994) Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 344: 859-861.
- Guenther AL, Schmidt SI, Laatsch H, Fotso S, Ness H, Ressmeyer AR, Poeggeler B, Hardeland R (2005) Reactions of the melatonin metabolite AMK(N¹-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res* 39: 251-260.
- Guerrero JM, Reiter RJ. (2002) Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2: 167-179.
- Halliwel B, Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX (1993) The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 17: 347-57.

- Hardeland R, Poeggeler B (2003) Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 34: 233-241.
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.
- Harman D (1972) The biological clock: The mitochondria. *J Am Geriatr Soc* 20: 145-147.
- Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman AB, Billiar TR, Tweardy DJ (1998) Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med* 187: 917-928.
- Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Senoh S (1974) In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem* 249: 1311-3.
- Hissin PJ, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74: 214-26.
- Jaskot RH, Charlet EG, Grose EC, Grady MA, Roycroft JH (1983) An automated analysis of glutathione peroxidase, S-transferase, and reductase activity in animal tissue. *J Anal Toxicol* 7: 86-8.
- Jones DP (2002) Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol* 348: 93-112.
- Karbownik M, Reiter RJ, Garcia JJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC (2000) Melatonin reduces rat hepatic macromolecular damage due to oxidative stress caused by delta-aminolevulinic acid. *Biochim Biophys Acta* 1523: 140-146.
- Kasai T, Inada K, Takakuwa T, Yamada Y, Inoue Y, Shimamura T, Taniguchi S, Sato S, Wakabayashi G, Endo S (1997) Anti-inflammatory cytokine levels in patients with septic shock. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 98: 34-42.
- Khaldy H, Escames G, León J, Vives F, Luna JD, Acuña-Castroviejo D (2000) Comparative effects of melatonin, L-deprenyl, Trolox and ascorbate in the suppression of hydroxyl radical formation during dopamine autoxidation in vitro. *J Pineal Res* 29: 100-7.
- Kotler M, Rodríguez C, Sainz RM, Antolin I, Menéndez-Peláez A (1998) Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res* 24: 83-9.
- Kowald A, Kirkwood TB (1996) A network theory of ageing: the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process. *Mutat Res* 316: 209-36.
- Kvetnoy I (2002) Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. *Neuro Endocrinol Lett* 1: 92-6.
- Kyikyitha Tha, Yasunobu O, Hiroyuki M, Toshihiko M, Takashi Uehara, Rieko H, Yuka H, Yasuyuki N (2000) Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM) P8. *Brain Res* 885: 25-31.
- Lardone PJ, Alvarez-García O, Carrillo-Vico A, Vega-Naredo I, Caballero B, Guerrero JM, Coto-Montes A (2006) Inverse correlation between endogenous melatonin levels and oxidative damage in some tissues of SAMP8 mice. *J Pineal Res* 40: 153-157.
- Lee HC, Pang CY, Hsu HS, Wei YH (1994) Ageing-associated tandem duplications in the D-loop of mitochondrial DNA of human muscle. *FEBS Lett* 354: 79-83.
- León J, Macía M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martín M, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D (2000) Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol Pharmacol* 58: 967-975.
- León J, Acuña-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ (2004) Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 75: 795-790.
- León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ (2005) Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 38: 1-9.
- León J, Escames G, Rodríguez MI, López LC, Tapias V, Entrena A, Camacho E, Carrion MD, Gallo MA, Espinosa A, Tan DX, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D (2006) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N¹-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem* 98: 2023-2033.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 80: 2587-2592.

Lissoni P, Rovelli F, Meregalli S, Fumagalli L, Musco F, Brivio F, Bibrio O, Esposti G (1997) Melatonin as a new possible anti-inflammatory agent. *J Biol Regul Homeost Agent* 11: 157-159.

Liu J, Mori A (1993) Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM): a comparison with ddY mice. *Mech Aging Develop* 71: 23-30.

López LC, Escames G, Tapias V, Utrilla MP, León J, Acuña-Castroviejo D (2006) Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 267-278.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.

Macias M, Rodriguez-Cabezas MN, Reiter RJ, Osuna A, Acuña-Castroviejo D (1999) Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res* 27: 86-94.

Maestroni GJ, Conti A (1996) Melatonin and the immune-hepatopoietic system therapeutic and adverse pharmacological correlates. *Neuroimmunomodulation* 3: 325-332.

Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B (1996) Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med* 21: 307-15.

Martín GM, Spregue CA, Epstein CJ (1970) Replicative lifespan of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue and genotype. *Lab Invest* 23: 86-92.

Martín M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuña-Castroviejo D (2000a) Melatonin but not vitamin C and D maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 14: 1677-9.

Martín M, Macias M, Escames G, Reiter RJ, Agapito GG, Ortiz D, Acuña-Castroviejo D (2000b) Melatonin-induced increases activity of the respiratory

Cain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res* 28: 242-8.

Martín M, Macias M, Leon J, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D (2002) Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 348-357.

Matsugo S, Kitagawa T, Minami S, Esashi Y, Oomura Y, Tokumaru S, Kojo S, Matsushima K, Sasaki K (2000) Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice. *Neurosci Lett* 278: 105-108.

Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martín V, Rodríguez C (2002) Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 59: 1706:1713.

Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland Rüdiger, León L, Rodríguez C, Reiter RJ (2005) Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N¹-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 165: 139-149.

McCord CO, Allen EP (1917) Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 23: 207.

McInnes IB, Leung B, Wei XQ, Gemmell CC, Liew FY (1998) Septic arthritis following *Staphylococcus aureus* infection in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 160: 308-315.

Medvedev ZA (1990) An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* 65: 375-398.

Menéndez-Peláez A, Howes KA, Gonzalez-Brito RJ, Reiter RJ (1987) N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-o-methyltransferase activity and melatonin levels in the Harderian glands of the female syrian hamster: changes during the light: dark cycle and the effect of 6-parachloro-phenylalanine administration. *Biochem Biophys Res Commun* 145: 1231-8.

Menéndez-Peláez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, Tan DX (1993a) Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 54: 1-10.

Menéndez-Peláez A, Reiter RJ (1993b) Distribution of melatonin in mammalian tissues: The

relative importance of nuclear versus cytosolic localisation. *J Pineal Res* 15: 59-69.

Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 15: 575-591.

Miquel J, Quintanilha AT, Weber H, eds. (1989) Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. Boca Raton, FL: CRC Press.

Miquel J, de Juan E, Sevilla I (1992) Oxygen-induced mitochondrial damage and aging. *EXS* 62: 47-57.

Miquel J. An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging (1992) *Mutat Res* 275: 209-16.

Miquel J, Martínez M (1996) Envejecimiento y muerte neuronal inducida. En Luquín MR, Jiménez-Jiménez FJ, Martínez-Villa E, Molina JS, Bermejo-Pareja F, Coria-Balanzat F, eds. Mecanismos de muerte neuronal y neuroprotección en enfermedades neurológicas. *Neurología* 11: 7-12.

Miquel J (1998) An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 33: 113-126.

Moncada SH (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2011.

Mori A, Utsumi K, Liu J, Hosokawa M (1998) Oxidative damage in the senescence accelerated mouse. *Ann NY Acad Sci USA* 854: 239-250.

Morioka N, Okatani Y, Wakatsuki A (1999) Melatonin protects against age-related DNA damage in the brains of female senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 27: 202-9.

Muller Hocker J (1992) Mitochondria and ageing. *Brain Pathol.* 2: 149-58.

Muñoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavillon JM (1991) Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 88: 1747-1754.

Nakahara H, Kanno T, Inai Y, Utsumi K, Hiramatsu M, Mori A, Packer L (1998) Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Rad Biol Med* 24: 85-92.

Nishikawa T, Takahashi JA, Fujibayashi Y, Fujisawa H, Zhu BH, Nishimura Y, Ohnishi K, Higuchi K, Hashimoto N, Hosokawa M (1998) An early stage mechanism of the age-associated mitochondrial dysfunction in the brain of SAMP8 mice: an age-associated neurodegeneration animal model. *Nerosci Lett* 254: 69-72.

Nogués R, Giralt M, Romeu M, Mulero M, Sanchez-Martos V, Rodríguez E, Acuña-Castroviejo D, Mallo J (2006) Melatonin reduces oxidative stress in erythrocytes and plasma of senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 41: 142-149.

Nomura Y, Wang BX, Qi SB, Namba T, Kaneko S (1989) Biochemical changes related to aging in the senescence-accelerated mouse. *Exp Gerontol* 24: 49-55.

Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y (2002a) Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging* 23: 639-644.

Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ (2002b) Melatonin protects hepatic mitochondrial respiratory chain activity in senescence-accelerated mice. *Journal of Pineal Research* 32: 143-148.

Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y (2002c) Hepatic mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice: correction by long-term, orally administered physiological levels of melatonin. *Journal of Pineal Research* 33: 127-133.

Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y (2003a) Acutely administered melatonin restored hepatic mitochondrial physiology in old mice. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 35: 367-375.

Okatani Y, Wakatsuki A, Enzan H, Miyahara Y (2003b) Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *European Journal of Pharmacology* 469: 145-152.

Orgel LE (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci USA* 49: 517-21.

Orgel LE (1970) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. A correction. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1476.

Ozawa T (1995) Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271: 177-89.

- Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E (1998) Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int* 32: 69-75.
- Pang SF, Yu HS, Suen HC, Brown GM (1980) Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm. *J Endocrinol* 87: 89-93.
- Paradies G, Ruggiero FM (1990) Age-related changes in the activity of the pyruvate carrier and in the lipid composition in rat-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1016:207-12.
- Park JW, Choi CH, Kim MS, Chung MH (1996) Oxidative status in senescence accelerated mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 51: B337-B345.
- Pieri C, Marra M, Moroni F, Pecchioni R, Marcheselli F (1994) Melatonin: a peroxyl radicals scavenger more potent than vitamin E. *Life Sci* 55:PL271.
- Pierrefiche G, Laborit H (1995) Oxygen radicals, melatonin and aging. *Exp Gerontol* 30: 213-27.
- Pissarek M, Reinhardt R, Reichelt C, Manaenko A, Krauss G, Illes P (1999) Rapid assay for one-run determination of purine and pyrimidine nucleotide contents in neocortical slices and cell cultures. *Brain Res Protoc* 4: 314-21.
- Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR (1994) Melatonin: a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 738: 419-20.
- Polkey MI, Harris M, Hughes P, Hamnegard C, Lyons D, Green M, Moxham J (1997) The contractile properties of the elderly human diaphragm. *An J Respir Crit Care Med* 155: 1560-1564.
- Pryor W, Squadrito G (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with the superoxide anion. *Am J Physiol* 264: L699-L722.
- Rajindar SS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 273: 59-63.
- Rebrin I, Kamzalov S, Sohal RS (2003) Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Rad Biol Med* 35: 626-635.
- Rebrin I, Sohal RS (2004) Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevities: *Exp Gerontol* 39: 1513-1519.
- Rebrin I, Zicker S, Wedekind KJ, Paetau-Robinson I, Packer L, Sohal RS (2005) Effect of antioxidant-enriched diets on glutathione redox status in tissue homogenates and mitochondria of the senescence-accelerated mouse. *Free Radic Biol Med* 39: 549-557.
- Reiter RJ (1991a) Melatonin: that ubiquitously acting pineal hormone. *News Physiol Sci* 6: 223.
- Reiter RJ (1991b) Pineal gland. Interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *TEM* 2: 13-19.
- Reiter RJ (1991c) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev* 12: 151-180.
- Reiter RJ (1992) The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays* 14: 169-175.
- Reiter RJ (1998) Neuroendocrinology of melatonin. En: Miles A, Phibrick DRS, Thompson C (eds) *Melatonin: clinical perspectives*. Oxford University Press, Oxford UK. pág 1.
- Reiter RJ, Tan DX, Acuña-Castroviejo D, Burkhardt S, Karbownik M (2000a) Melatonin: mechanisms and actions as an antioxidant. *Curr Top Biophys* 24: 171-183.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E (2000b) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biom Sci* 7: 444-458.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W (2001) Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 34: 237-256.
- Reiter RJ, Tan DX (2002a) Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann NY Acad Sci* 957: 341-344.

- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Lopez-Burillo S (2002b) Melatonin, longevity and health in the aged: an assessment. *Free Rad Res* 36: 1323-1329.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Lopez-Burillo S, Sainz RM and Mayo JC (2003) Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol* 527: 539-548.
- Reyes-Toso CF; Ricci CR, de Mignone IR, Reyes P, Linares LM, Albornoz LE, Cardinali DP, Zaninovich A (2003) In vitro effect of melatonin on oxygen consumption in liver mitochondria of rats. *Neuro Endocrinol Lett* 24: 341-4.
- Richter C (1995) Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relation-ship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 27: 647-53.
- Rodríguez MI, Carretero M, Escames, López LC, Maldonado MD, Tan Dun-Xian, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D (2006) Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radical Res* 41: 15-24.
- Rodríguez MI, Rodríguez MI, Escames G, López LC, López Ana, Ortiz Francisco, Acuña-Castroviejo D (2006) Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.*, Doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00416.x
- Rodríguez MI, Escames G, López LC, García JA, Ortiz F, López A, Acuña-Castroviejo D (2006) Mitochondrial oxidative damage during aging in senescent accelerated mice: Efficacy of chronic melatonin administration. *Mech Ageing Dev.* (En prensa).
- Rodríguez MI, López LC, Escames G, López A, García JA, Ortiz F, Acuña-Castroviejo D (2007) Age-dependent changes in mitochondrial redox status in senescence-accelerated mice are counteracted by chronic melatonin administration. *Exp Gerontol.* (Enviado).
- Ruggiero FM, Cafagna F, Petruzzella V, Gadaleta MN, Quagliariello E (1992) Lipid composition in synaptic and nonsynaptic mitochondria from rat brains and effect of aging. *J Neurochem* 59: 487-91.
- Sastre J, Millan A, Garcia de la Asuncion J, Pla R, Juan G, Pallardo O'Connor E, Martin JA, Droy-Lefaix MT, Viña J (1998) A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 24: 298-304.
- Sastre J, Pallardo FV, Pla R, Pellin A, Juan G, O'Connor JE, et al. (1996) Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology* 24: 1199-205.
- Schapira AH, Cooper JM (1992) Mitochondrial function in neurodegenerative and aging. *Mut Res* 275: 133-43.
- Schon EA (1994) Mitochondrial DNA and the genetics of mitochondrial disease. In Schapira AHV, DiMauro S, eds. *Mitochondrial disorders in neurology.* Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Sheldrake AR (1974) The ageing, growth, and death of cells. *Nature* 250: 381-5.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10771-8.
- Sies H (1985) Oxidative stress: introductory remarks in oxidative stress. Academic Press, Orlando FL 1985; pp- 1-8.
- Siu AW, Maldonado M, Sanchez-Hidalgo M, Tan DX, Reiter RJ (2006) Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *J Pineal Res* 40: 101-109.
- Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H (1994) Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation, and antioxidant defences during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Develop* 74: 121-137.
- Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfler A, Semmler J, Liebmann PM (2001) Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 30: 243-247.
- Szilard L (1959) On the nature of the aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 45: 30-45.
- Szmuskowicz AW, Heinzelman RV (1960) Synthesis of N-acetylmethoxy-tryptamine. *J Org Chem* 25: 287.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ (1993) Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1: 57-60.

- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer, Limson BF, Wintraub ST, Qi W (2000a) Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 29: 1177-1185.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR (2000b) Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signal Recept* 9: 137-159.
- Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Seno S (2001) N1-acetyl-N2-formyl-5-metoxkykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 15: 2294-2296.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC et al. (2002) Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *CurrTop Med Chem* 2; 181-197.
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Poeggeler B, Lopez-Burillo S, Sainz RM, Mayo JC, León J, Reiter RJ (2003) Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res* 34: 249-259.
- Tan S, Wood M, Maher P (1998) Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *J Neurochem* 71: 95-105.
- Tha KK, Okima Y, Miyazaki H, Murayama T, Uehara T, Hatakeyama R, Hayashi Y, Nomura Y (2000) Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM)P8. *Brain Research* 885: 25-31.
- Tolep K, Higgins N, Muza S, Criner G, Kelsen SG (1995) Comparison of diaphragm strength between healthy adult and elderly young men. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 677-682.
- Tomás-Zapico, Coto-Montes A (2005) A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 39: 99-104.
- Turjanski AG, Sáenz DA, Doctorovich F, Estrin DA, Rosenstein RE (2001) Nitrosation of melatonin by nitric oxide: a computational study. *J Pineal Res* 31: 97-101.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Lida T, Cho S, Honma K, Kondo T (1999) Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Rad Biol Med* 27: 838-847.
- Vanneste J, van den Bosch de Aguilar P (1981) Mitochondrial alterations in the spinal ganglion neurons in ageing rats. *Acta Neuropathol* 54: 83-7.
- Warner HR, Butler RN, Sprott RL & Schneider EL (EDS.). *Modern Biological Theories of Aging*. New York: Raven Press.
- Weissbach H, Redfield BG, Axelrod J (1960) Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochim Biophys Acta* 43: 352-353.
- Yakes FM, van Houten B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 514-9.
- Yamamoto HA, Mohanan PV (2002) Melatonin attenuates brain mitochondrial DNA damage induced by potassium cyanide in vivo and in vitro. *Toxicol Lett* 179: 29-36.
- Yamamoto HA, Mohanan PV (2003) Ganglioside GT1B and melatonin inhibit brain mitochondrial DNA damage and seizures induced by kainic acid in mice. *Brain Res* 964: 100-106.
- Yarian CS, Rebrin I, Sohal RS (2005) Aconitase and ATP synthase are targets of malondialdehyde modification and undergo an age-related decrease in activity in mouse heart mitochondria. *Biochim Biophys Res Comm* 330: 151-156.
- Zang LY, Cosma G, Gardner H, Vallynathan V (1998) Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1425: 469-77.
- Zucchini C, Pugnali A, Pallotti F, Solmi R, Crimi M, Castaldini C, et al. (1995) Human skeletal muscle mitochondria in aging: Lack of detectable morphological and enzymic defects. *Biochem Mol Biol Int* 37: 607-16.