

**PREVENCIÓN DEL ENVEJECIMIENTO
MITOCONDRIAL EN RATONES CON
SENESCENCIA ACELERADA
MEDIANTE MELATONINA: ESTUDIOS
EN CEREBRO Y PULMÓN**



**GRUPO DE INVESTIGACIÓN CTS-101:
COMUNICACIÓN INTERCELULAR**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

PARQUE TECNOLÓGICO DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD DE GRANADA



MIGUEL CARRETERO COCA

GRANADA, 2010



Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Miguel Carretero Coca
D.L.: GR 1344-2011
ISBN: 978-84-694-1063-9

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

CERTIFICA QUE **D. Miguel Carretero Coca**, Licenciado en Farmacia, ha realizado bajo su dirección y en el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **“Prevención del envejecimiento mitocondrial en ratones con senescencia acelerada mediante melatonina: Estudios en cerebro y pulmón”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 18 de Noviembre de 2010

Vº Bº Director

El interesado

Darío Acuña Castroviejo

Miguel Carretero Coca

Dña. GERMAINE ESCAMES, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE **D. Miguel Carretero Coca**, Licenciado en Farmacia, ha realizado bajo su dirección y en el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **“Prevención del envejecimiento mitocondrial en ratones con senescencia acelerada mediante melatonina: Estudios en cerebro y pulmón”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 18 de Noviembre de 2010

Vº Bº Director

El interesado

Germaine Escames

Miguel Carretero Coca

A mis padres

**“No dejamos de jugar
porque envejecemos,
envejecemos porque
dejamos de jugar”**

Bernard Shaw

Agradecimientos

Quisiera en primer lugar mostrar mi agradecimiento al Dr. Darío Acuña Castroviejo, que al permitir mi incorporación a su grupo inició todo este periplo investigador. También me gustaría reconocer mi admiración por su forma de trabajar, en la que me gustaría destacar la libertad que otorga a los miembros del laboratorio para organizarse en sus experimentos, los seminarios que realizamos, y el apoyo que brinda en todo momento a la gente con la que trabaja. Me gustaría también destacar la facilidad con la que se expresa y transmite sus conocimientos.

Agradezco a la Dra. Germaine Escames toda la intensa labor que ella desarrolló y que ha sido la base desde la que se ha ido alzando gran cantidad del trabajo realizado en la consecución de esta tesis. Añado a su ayuda científica mi gratitud por haberme hecho partícipe de todas sus experiencias y reflexiones sobre este mundo de la investigación, que me ha sido de gran ayuda y refuerzo.

Me gustaría acordarme de todos los compañeros con los que he compartido tantas horas, tanto las de trabajo como las de ocio, gracias a las cuales hemos creado vínculos de amistad, respeto y deporte. Han sido un gran apoyo, y aunque la distancia, el tiempo y la rutina han hecho mella en nuestra relación, no les olvidaré, ni a aquellos a los que cariñosamente llamaba Maestro como a los jóvenes Padawan, los cuales ya han demostrado conocimientos y aptitudes para ser los próximos Maestros.

Cómo no, agradecer a mis padres, Lourdes y Miguel, su labor en mi educación, así como su apoyo en mis decisiones, como también en su interés en mi trabajo, y su determinación para ayudarme a llegar a la situación en la que me encuentro. Para mí ambos han sido un referente, un ejemplo a seguir, tanto en la faceta laboral como en la humana, aunque es en esta última en la que son personas realmente excepcionales, únicas. Espero atesorar sus actitudes ante la vida y asimilarlas para poder vivir de la manera en la que ellos nos han orientado y, sobre todo, en el aspecto de la práctica deportiva, en la que, sin riesgo de exagerar, son inagotables. Quiero agradecer a mi padre el que hiciera la primera lectura correctora al borrador de esta tesis.

Me gustaría reconocer el quehacer de mis hermanos, Rafael y Javier, en la finalización de esta tesis, ya que por su excelente carrera universitaria, y, a lo que todo apunta y ya de hecho se está reflejando en publicaciones y títulos de máster, promete ser el inicio de una intensa labor investigadora, me han motivado, al menos, para prolongar en el tiempo el quedarme rezagado frente a sus méritos. Agradecerles a

ambos el que sean mis amigos, compañeros, colegas o rivales, según la faceta que ocupen en el resto de actividades que compartimos.

Añado mi agradecimiento a Alex y Bea, las novias de mis hermanos, también investigadoras, por narrarme sus experiencias en los laboratorios y hacerme recordar las mías propias. Quiero también reconocer el esfuerzo que hizo Bea para que se pudiera entregar la documentación necesaria para registrar y presentar esta tesis.

Una mención especial en este apartado merece Laura, por toda su paciencia, compañía, apoyo, cariño, y sobre todo, por soportarme, aguantarme y hasta tolerarme, tareas que, reconozco, no son sencillas. Laura, no te preocupes, ya aclararemos a la gente que haga falta que ser doctor no significa obligatoriamente ser médico.

Agradezco al Dr. Matías Bedmar Moreno el que me reenviase los correos en los que se buscaban personas para la realización de la tesis doctoral, ya que fue de esta manera como contacté con el Dr. Darío Acuña Castroviejo y su grupo de investigación.

Quisiera recordar aquí a todas aquellas personas que se han interesado por la evolución de esta tesis, animándome a concluirla. Incluyo a quienes, con gran sentido del humor, me lanzaban pullas acerca del tiempo requerido para la finalización de la misma, atribuyendo al menos varios eones a la realización de este trabajo.

Doy las gracias a mis amigos y amistades, que, ya sea electrónicamente, mediante juegos de mesa, juegos de estrategia, gracias a diversas actividades deportivas, o bien en sesiones de tapeo (menos de las que los cánones del apego exhortan, y menos también de las que nos hubiera gustado) han entrado a formar parte de mi vida, enriqueciéndola, y consiguiendo sonrisas, abrazos y buenos ratos en general.

Por último, agradecer a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía que me concediera la beca para la formación de doctores en centros de investigación y universidades andaluzas, que sirvió para financiar una parte de este trabajo.

Beca y proyectos de investigación que han financiado este estudio:

1. Beca Predoctoral:

Ayuda para la formación de doctores en centros de investigación y universidades andaluzas, 2004-2006.

2. Proyectos de investigación

1. Red Temática de Investigación Cooperativa: Bases moleculares y celulares del daño oxidativo en el envejecimiento. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo. G03-137, 2003-2005. IP.: Darío Acuña Castroviejo
2. Mecanismo de acción de la melatonina. PAI (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía). CTS101-2006, 2006. 2007. IP.: Darío Acuña Castroviejo.
3. Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF). Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo. RD06/0013/0008, 2007-2011. IP.: Darío Acuña Castroviejo.
4. Bases moleculares de la inhibición de la óxido nítrico sintasa inducible durante la sepsis por la melatonina y análogos sintéticos: Efecto de la edad. PAI (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía). P07-CTS-03135 (Proyecto de Excelencia), 2008-2012. IP.: Darío Acuña Castroviejo.

3. Publicaciones científicas

Rodríguez MI, Carretero M, Escames G, López LC, Maldonado MD, Tan DX, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. (2007) Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Rad. Res.* 41 (1):15-24.

Carretero M, Escames G, López LC, Venegas C, Dayoub JC, García L, Acuña-Castroviejo D. (2009) Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J. Pineal Res.* 47 (2):192-200.

Carretero M, López LC, del Pino-Zumaquero A, Doerrier C, García-Corzo J, Tresguerres JA, Acuña-Castroviejo D, Escames G. (2010) Melatonin protects against oxidative damage and ATP depletion in lung mitochondria of aged mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol.*, enviado.

Rivas I, León J, López LC, Ruiz M, Carretero M, Escames G, Valera MD, Acuña-Castroviejo D. (2005) Melatonin prevents rotenone-induced mitochondrial complex I inhibition, oxidative damage and cell death in PC12 cells. XXXIII Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences 61:141, (Abstract).

Rodríguez MI, Utrilla MP, Tapias V, Carretero M, Ruiz M, Escames G, Arana C, Acuña-Castroviejo D. (2005) Bioenergetic and oxidative damage in mitochondria from SAM mice. XXXIII Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences 61:221, (Abstract).

ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$: Oxígeno singulete

3-OHaMT: 3-hidroximelatonina

4HDA: 4-hidroxialquenal

8-oxo-dG: 8-hidroxideoxiguanosina

AFMK: N₁-acetil-N₂-formil-5-

metoxikinuramina

AMK: N-acetil-5-metoxikinurenamina

aMT: melatonina

C3-OHM: 3-hidroximelatonina cíclica

CAT: catalasa

COX: Ciclooxygenasa

ETC: cadena de transporte electrónico

DB: Decilubiquinona

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

GPx: glutatión peroxidasa

GRd: glutatión reductasa

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HO[•]: radical hidroxilo

HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

LOO[•]: radical peroxilo

MDA: malondialdehído

mtDNA: DNA mitocondrial

mtNOS: óxido nítrico sintasa mitocondrial

NAT: N-acetiltransferasa

nDNA: DNA nuclear

NO[•]: óxido nítrico

NO₂[•]: radical dióxido de nitrógeno

NOS: óxido nítrico sintasa

O₂^{-•}: anión superóxido

ONOO⁻: peroxinitritos

ROS: especies reactivas de oxígeno

RL: radicales libres

RNA: ácidos ribonucleicos

RNS: especies reactivas de nitrógeno

SAM: Senescence-accelerated mouse

SAMP: SAM prone

SAMR: SAM resistant

SOD: superóxido dismutasa

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1.- ENVEJECIMIENTO	1
1.1.- Teoría de los Radicales Libres: Harman, 1956	5
1.2.- Teoría mitocondrial: Miquel y cols., 1975	10
1.2.1.- DNA mitocondrial y envejecimiento	11
1.2.2.- Alteraciones y mecanismos de reparación mitocondriales.....	12
1.2.3.- Alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial con la edad	14
1.2.4.- Alteraciones estructurales mitocondriales asociadas con la edad	15
1.3.- Teoría inflamatoria: Chung y cols., 2001	16
2.- MELATONINA	17
2.1.- Metabolismo de la melatonina	17
2.1.1.- Biosíntesis de la melatonina.....	18
2.1.2.- Metabolismo de la melatonina	20
2.2.- Mecanismos de protección de la melatonina	23
2.3.- Melatonina y mitocondria	28
2.4.- Melatonina y envejecimiento	31

HIPÓTESIS

1.- HIPÓTESIS	37
----------------------------	----

OBJETIVOS

1.- OBJETIVOS	41
----------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES	45
2. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS	46
3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	46
4. DETERMINACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN (LPO)	47

5. DETERMINACIÓN DE NITRITOS (NO ₂).....	48
6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GPX Y GRd.....	48
7. DETERMINACIÓN DE GSH Y GSSG.....	48
8. DETERMINACIÓN DE LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL	49
9. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO MITOCONDRIAL DE NUCLEÓTIDOS DE ADENINA.....	50
10. ESTADÍSTICA	51

RESULTADOS

1. CEREBRO	55
1.1- Efectos sobre la peroxidación lipídica durante el envejecimiento:	55
1.2- Efectos sobre los valores de nitritos durante el envejecimiento:	56
1.3- Efectos sobre la actividad de la enzima GPx durante el envejecimiento:	57
1.4- Efectos sobre la actividad de la enzima GRd durante el envejecimiento:	58
1.5- Efectos sobre la ratio GSH:GSSG durante el envejecimiento:	59
1.6- Efectos sobre la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones durante el envejecimiento:	60
1.7- Efectos sobre el contenido de ATP durante el envejecimiento:	61
1.8- Efectos sobre la ratio ATP/ADP durante el envejecimiento:	63
2. PULMÓN	65
2.1- Efectos sobre la peroxidación lipídica durante el envejecimiento:	65
2.2- Efectos sobre los valores de nitritos durante el envejecimiento:.....	65
2.3- Efectos sobre la actividad de la enzima GPx durante el envejecimiento:	66
2.4- Efectos sobre la actividad de la enzima GRd durante el envejecimiento:	67
2.5- Efectos sobre la ratio GSH:GSSG durante el envejecimiento:	68
2.6- Efectos sobre la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones durante el envejecimiento:	69
2.7- Efectos sobre el contenido de ATP durante el envejecimiento:	73

2.8- Efectos sobre la ratio ATP/ADP durante el envejecimiento: 74

DISCUSIÓN

1. EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA BIOENERGÉTICA EN EL CEREBRO DE RATONES SAMR1 Y SAMP8 87

2. EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA BIOENERGÉTICA EN EL PULMÓN DE RATONES SAMR1 Y SAMP8 93

CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES 101

BIBLIOGRAFÍA

1. BIBLIOGRAFÍA 105

INTRODUCCIÓN

1.- ENVEJECIMIENTO

En la actualidad existen unos 540 millones de personas mayores de 60 años. Para el año 2020 habrá unos 1.000 millones de personas. De ellos, 700 millones corresponderán a los países desarrollados, mientras que el resto pertenecerá al Tercer Mundo. En España el 19,6% de la población tiene más de 60 años y más de 80 años, el 3%. En el año 2025, los mayores de 60 años alcanzarán el 21,2 % según la proyección de población. En Europa y Norteamérica la tendencia hacia el envejecimiento de la población es más intensa que en otros países.

España será el país de la Unión Europea con mayor proporción de jubilados (35,6%) y menos personas en edad de trabajar (52,9%) sobre el total de la población en el año 2050. Cabe resaltar que en los países más desarrollados, la esperanza de vida al nacimiento promedio es de casi 76 años en el quinquenio 2000-2005 la cual podría aumentar a 81 años a mediados de este siglo, a la vez que en los países en desarrollo se estima que aumentará de 63,4 a 73,1 años, durante el mismo periodo (figura 1). Estos países en desarrollo tampoco se están rejuveneciendo, ya que la disminución de las tasas de natalidad y el aumento de la longevidad están invirtiendo la pirámide de edad. En resumen, la población mundial avanza hacia un proceso acelerado de envejecimiento.

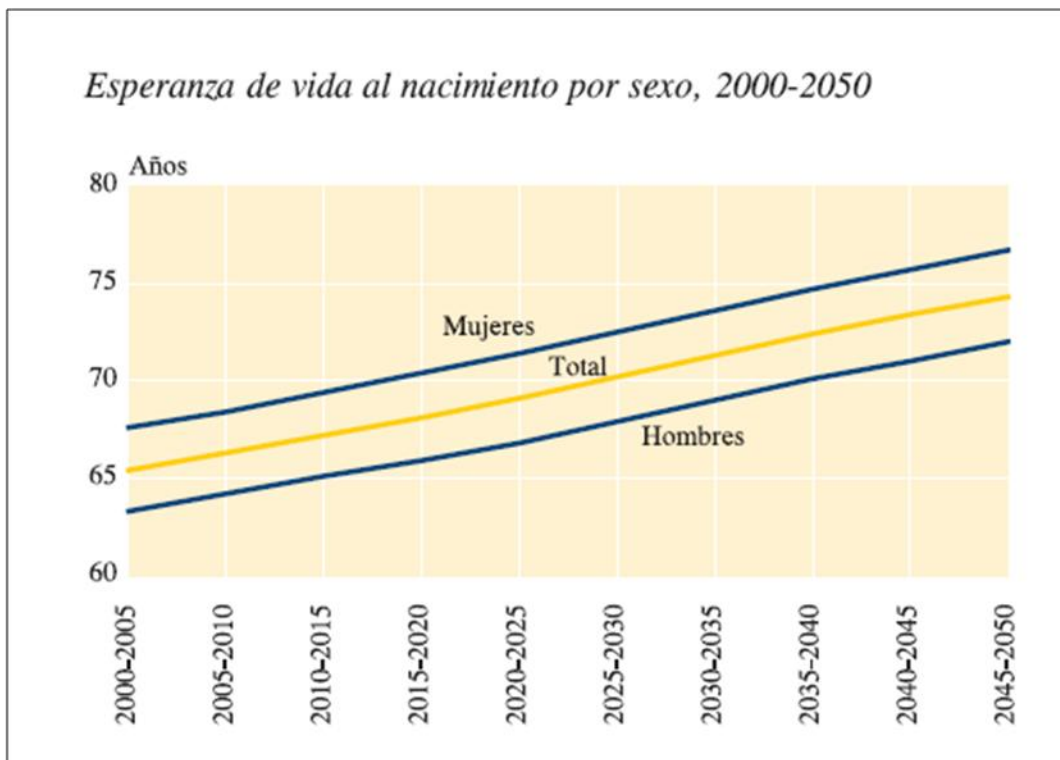


Figura 1. Esperanza mundial de vida media al nacimiento, por sexo, 2000-2050.

En la actualidad, un 45% de los mayores de 65 años requiere de asistencia, y esta proporción aumenta conforme se eleva la longevidad (figura 2). Estos cambios demográficos están obligando a los países a desarrollar nuevas medidas de protección social y financiera necesarias para enfrentarse con éxito al problema del enorme coste financiero que supondrá el gasto sanitario debido al aumento de la población anciana. Entre el abanico de herramientas necesarias para afrontar esta situación, la investigación debe ser prioritaria, ya que conociendo los fenómenos que inducen el envejecimiento, se pueda poner en marcha las medidas preventivas que mejoren la calidad de vida de esas personas mayores, lo que redundará, aparte de en la felicidad personal, en una menor necesidad de asistencia sanitaria y, por tanto, de gasto sanitario.

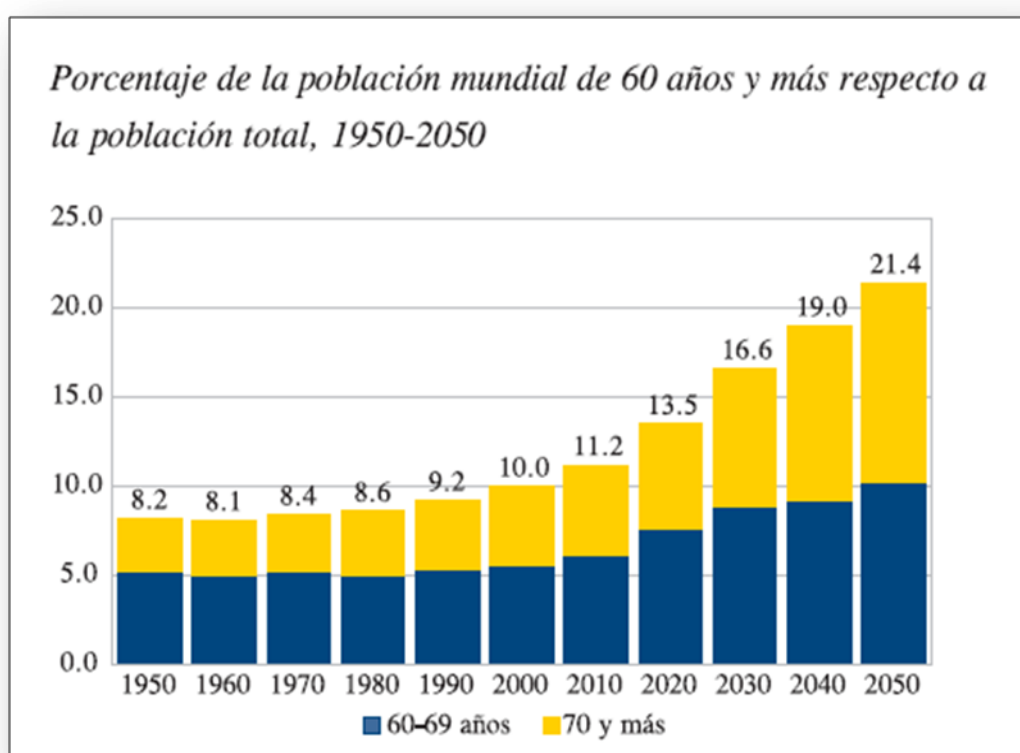


Figura 2. *Porcentaje de la población mundial de 60 años y más respecto a la población total, 1950-2050.*

El proceso de envejecimiento ha intrigado a la comunidad científica y ciudadana a lo largo de la historia. Los mecanismos subyacentes a este proceso no son bien conocidos, aunque se piensa que intervienen diversos factores. Se puede definir el envejecimiento como un proceso multifactorial que incluye una pérdida celular progresiva, déficits endocrinos y metabólicos, disminución de defensas, y pérdida funcional que incrementa el riesgo de muerte. Los cambios acaecidos durante el envejecimiento serían responsables tanto del proceso mismo de envejecimiento fisiológico como de enfermedades asociadas con la edad como cáncer, enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, degenerativas, etc.

Este proceso de envejecimiento ha sido, y está siendo, un objetivo prioritario en la investigación científica, sobre todo para aplicar medios enfocados no tanto a demorar su aparición, como a la prevención de las patologías asociadas al mismo.

Teorías del envejecimiento

Actualmente se dispone de teorías más o menos basadas en datos empíricos para la comprensión del envejecimiento. Estas 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 hasta 300 teorías y clasificaciones para explicar el proceso de envejecimiento [Warner y cols., 1987; Medvedev, 1990], que podemos clasificar en dos grupos siendo las más aceptadas las siguientes:

Teorías estocásticas: es un conjunto de teorías en las se da una serie de variables aleatorias, por lo que el envejecimiento será producto del azar y se estudiará mediante cálculos probabilísticos.

Entre ellas destacan:

- Teorías genéticas, como la teoría de la regulación genética, la teoría de la diferenciación terminal y la teoría de la inestabilidad del genoma, que dan al entorno de la célula la responsabilidad en los daños provocados aleatoriamente al DNA.

- Teoría de la mutación somática propuesta por Szilard en 1959. Propone una acumulación de mutaciones en el nDNA de células somáticas, teniendo como resultado el envejecimiento.

- Teoría de los radicales libres propuesta por Harman en 1956. Defiende que el envejecimiento se da por la suma de efectos perjudiciales fortuitos causados a tejidos por reacciones de radicales libres durante la respiración aerobia.

- Teoría error-catástrofe propuesta por Orgel en 1963 y modificada en 1970. Esta hipótesis postula que conforme avanza la edad, surgen errores en los mecanismos de síntesis de proteínas, lo que provoca la producción de proteínas anormales. Si estas proteínas anormales se incluyen en la maquinaria que sintetiza nuevas proteínas, causarían incluso más errores en las próximas generaciones 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. Esta teoría propone 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. Shelldrake en 1974 postuló: “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, las células tendrían que seguir creciendo y dividiéndose, disminuyendo así su ruptura, y por tanto, la acumulación de productos dañinos para la célula.

- Teoría inmunológica. Esta teoría postula que el genoma nuclear actúa de manera similar a un “reloj molecular” o “reloj celular”, siendo responsable de programar los cambios que irán apareciendo en el devenir de un organismo a lo largo de su vida.

Teorías deterministas: estas teorías sugieren que algunos de los procesos del envejecimiento están programados de manera inherente en el genoma de cada organismo. Cabe resaltar entre ellas:

- Teoría de la capacidad replicativa finita de las células. En un principio se creía que las células humanas con capacidad de proliferación en el organismo, se replicarían indefinidamente en los cultivos celulares. Más tarde, Martin y cols., en 1970 demostraron que la capacidad de duplicarse de éstas desciende progresivamente con la edad del donante. El telómero podría ser el reloj que determina la disminución en la capacidad proliferativa de las células.

- Teorías evolutivas. Estas teorías se pueden dividir en tres grupos. El primer grupo propone que el envejecimiento es una adaptación necesaria, programado como desarrollo. El segundo postula que existen mutaciones perjudiciales que se activan tarde biológicamente, y que son las responsables del envejecimiento. Por último, el tercer grupo apunta que la senescencia es el resultado de un desajuste que se da entre la supervivencia tardía y la fecundidad temprana.

Actualmente, la hipótesis del envejecimiento más importante es la del estrés oxidativo. Esta teoría se cimenta en 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].

Otra teoría, relacionada con la anterior, es la que atañe a la principal fuente energética celular, la mitocondria. Gracias a una prolífica investigación realizada en la última década, se ha observado en la organela la existencia de cuantiosas alteraciones estructurales, funcionales y genéticas asociadas con el envejecimiento [Schapira y cols., 1992; Muller y cols., 1992], con lo que se defiende que, con el tiempo, estas lesiones mitocondriales crónicas son la causa de la degeneración celular.

1.1.- Teoría de los Radicales Libres. [Harman, 1956]

Esta teoría postula que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de efectos perjudiciales fortuitos causados a los tejidos por reacciones de radicales libres producidos durante la respiración aerobia.

Pese a ser la teoría de mayor aceptación en los últimos años, permanecen preguntas sin respuesta definitiva, como, por ejemplo si los radicales libres contribuyen a la iniciación y/o a la propagación del envejecimiento.

Un radical libre es aquella especie química que tiene un electrón desapareado en su orbital más externo, lo que le confiere un alto poder para reaccionar con otras moléculas cercanas, captando (radicales oxidantes, como el HO^\bullet) o cediendo (radicales reductores, como el COO^\bullet) un electrón, para eliminar ese orbital incompleto. La molécula afectada por el radical libre queda inestable, de forma que pueden establecerse reacciones en cadena por medio de varias especies químicas que se oxidan y reducen secuencialmente, quedando las moléculas finalmente dañadas (figura 3). Los radicales libres más dañinos son las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS)

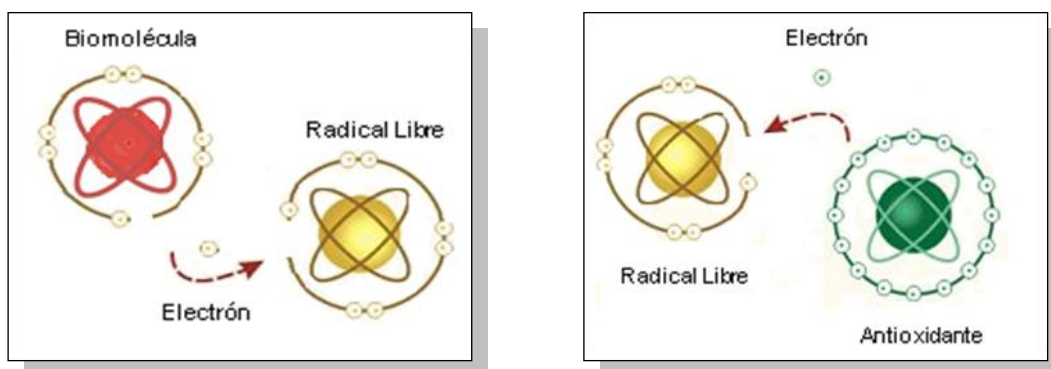


Figura 3. Interacción de radicales libres con biomoléculas (izquierda) ó con antioxidantes (derecha)

Producción de radicales libres

Los radicales libres proceden en su mayoría de fuentes endógenas, resultado de los procesos fisiológicos propios del organismo, como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio. Por ello, son generados en múltiples compartimentos y por múltiples enzimas celulares. En menor proporción, los radicales libres se forman en el organismo como respuesta a la exposición a agentes exógenos. El acúmulo de radicales libres produce un estrés oxidativo que daña estructuras celulares (ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y

proteínas), lo cual conduce a una disminución en la resistencia al ambiente y un incremento en la fragilidad celular que provoca la muerte de las células.

La mayor producción de radicales libres, (hasta en un 90%), se da en la mitocondria. La generación de ROS es consecuencia de la fosforilación oxidativa, proceso que usa NADH o FADH para generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Esta energía es invertida en fosforilar ADP a través de la vía F1-F0 ATPasa. En algunos lugares de la cadena de transporte electrónico, clásicamente atribuido a los complejos I y III [Kushnareva y cols., 2002; Chen y cols., 2003] (figura 4), los electrones procedentes de NADH y FADH pueden reaccionar directamente con oxígeno u otros aceptores de electrones y formar radicales libres [Balaban y cols., 2005]. Con la respiración aerobia, la mayoría del O_2 es reducido a agua por acción del complejo IV, debido a la adición de 4 electrones por molécula. Los pasos intermedios de esta reducción son la formación de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^{\bullet}), correspondientes a la reducción por uno, dos o tres electrones respectivamente [Acuña-Castroviejo y cols., 2001]. Se cree que entre un 2 y un 4 % del O_2 usado en la respiración aerobia deriva a radical libre, aunque puede que este porcentaje sea un orden de magnitud menor (entre 0,2 y 0,4%) [Di Lisa y cols., 2005]. Estos radicales libres son mediadores del envejecimiento y de otras patologías [Muravchick, 2008]

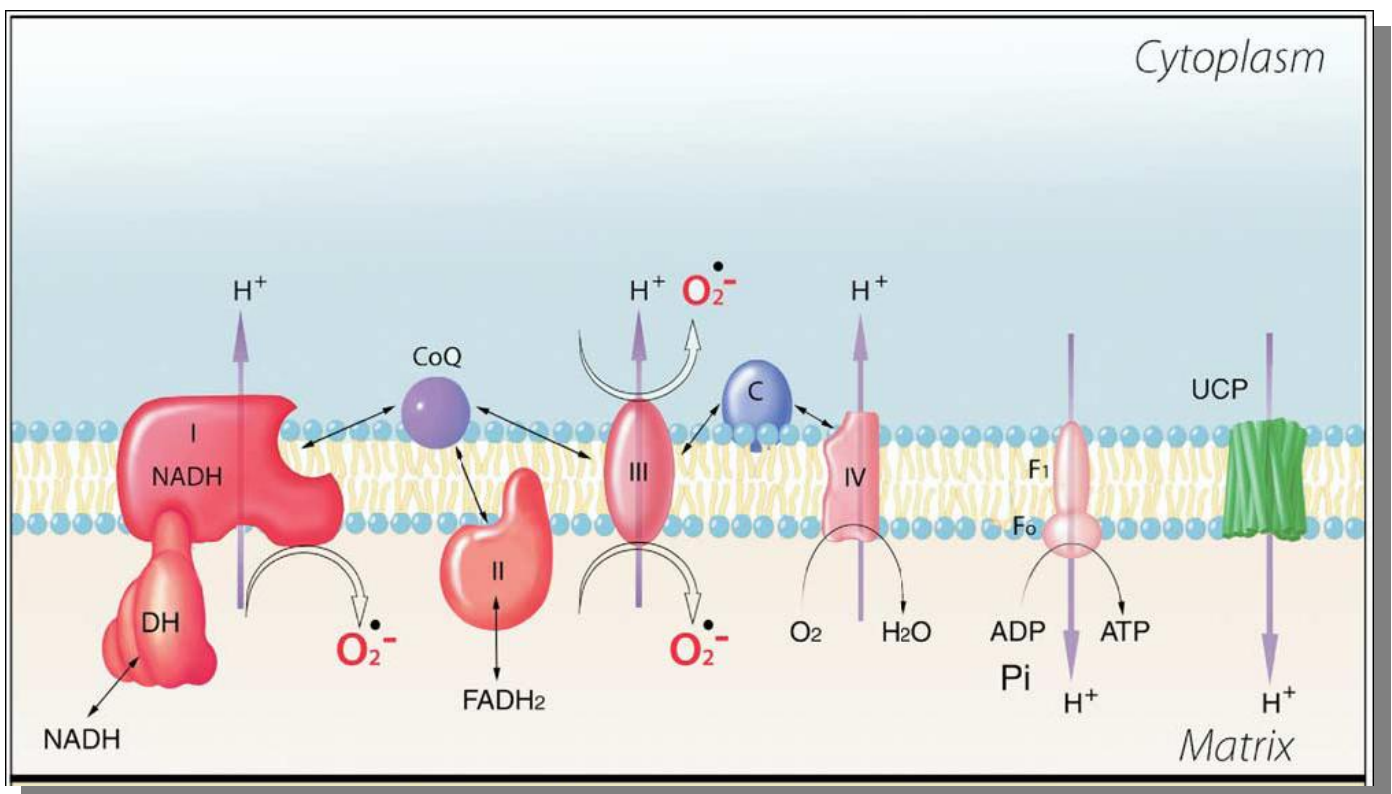


Figura 4. Complejos de la cadena respiratoria donde se producen el radical libre anión superóxido.

Se pensaba que estas reacciones eran improductivas para el organismo, aunque más recientemente se ha propuesto que los ROS mitocondriales tienen un papel importante en procesos de señalización REDOX-dependiente [Balaban y cols., 2005]. Los radicales libres son también generados y utilizados por células como los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos, los eosinófilos y los fibroblastos para eliminar organismos extraños al organismo como bacterias y virus.

Otras fuentes endógenas de radicales libres son las enzimas, como la familia de las NADH oxidasas, las ciclooxigenasas, el citocromo P-450, el metabolismo de lípidos en los peroxisomas, etc. [Shigenaga y cols., 1994]

Los factores exógenos que llevan a la producción de ROS son radiaciones ionizantes, rayos ultravioleta, contaminación ambiental, humo de cigarrillos, algunos fármacos, los aditivos químicos en alimentos procesados, los pesticidas etc.

Las reacciones por las que se forman los ROS anteriormente mencionados, así como los RNS son:

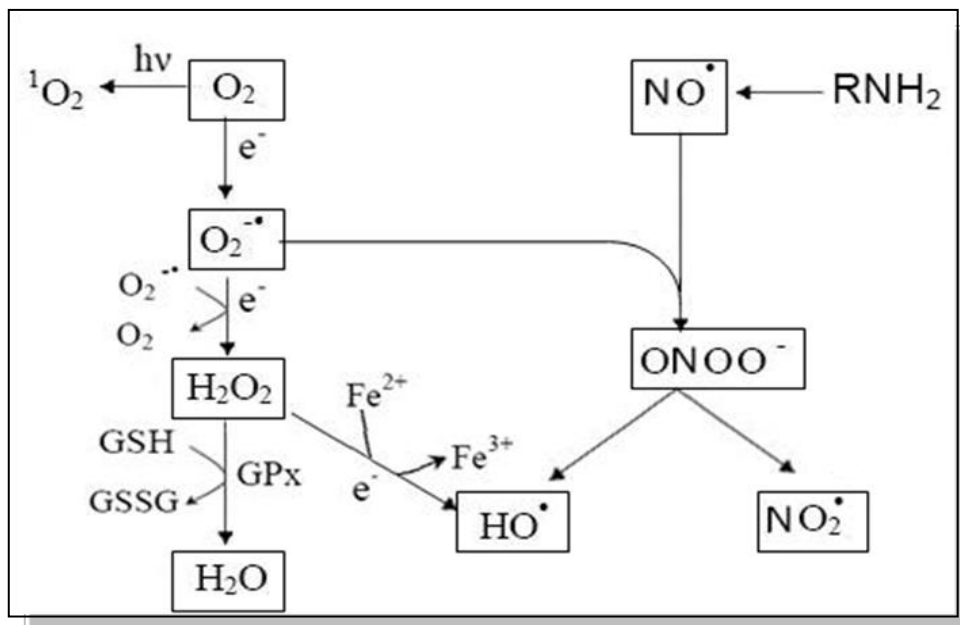


Figura 5. Generación de ROS y RNS.

Los RNS como el óxido nítrico (NO^\bullet) se forman en la 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 permiten diferenciarlas destacan 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].

El NO^\bullet es un radical libre gaseoso, importante mediador en muchos procesos fisiológicos y patológicos, que se forma por oxidación del nitrógeno guanidínico de la L-arginina por la NOS. Puede funcionar como donador de electrones (oxidante) o como un aceptor de electrones (antioxidante). Este NO^\bullet es poco reactivo y no puede nitrar proteínas irreversiblemente, pero es capaz de reaccionar con otros compuestos intermedios que pueden afectar a la función de proteínas y afectar con ello la del organismo entero. Por ejemplo, el NO^\bullet reacciona con $\text{O}_2^{\bullet-}$, produciendo el muy oxidante anión peroxinitrito (ONOO^-). Este anión *per se* no es un radical, pero sí es un poderoso agente nitrosante. Además, este ONOO^- puede producir HO^\bullet y el radical de dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet) [Álvarez y Radi, 2001; Álvarez y Radi, 2003]. Conforme aumenta la concentración de NO^\bullet se inhiben los complejos IV, III, y I [Ghafourifar y Richter, 1999], dañando de forma grave la CTE, lo que eleva a su vez la producción de ROS y RNS, formándose un círculo vicioso. Los ONOO^- inhiben irreversiblemente varios enzimas mitocondriales y los complejos I y II entre otros [Acuña-Castroviejo y cols., 2001]. Los niveles de NO^\bullet se cuantifican indirectamente midiendo la cantidad de nitritos (NO_2^-), ya que el NO^\bullet es muy inestable, reacciona rápidamente con agua y pasa a NO_2^- .

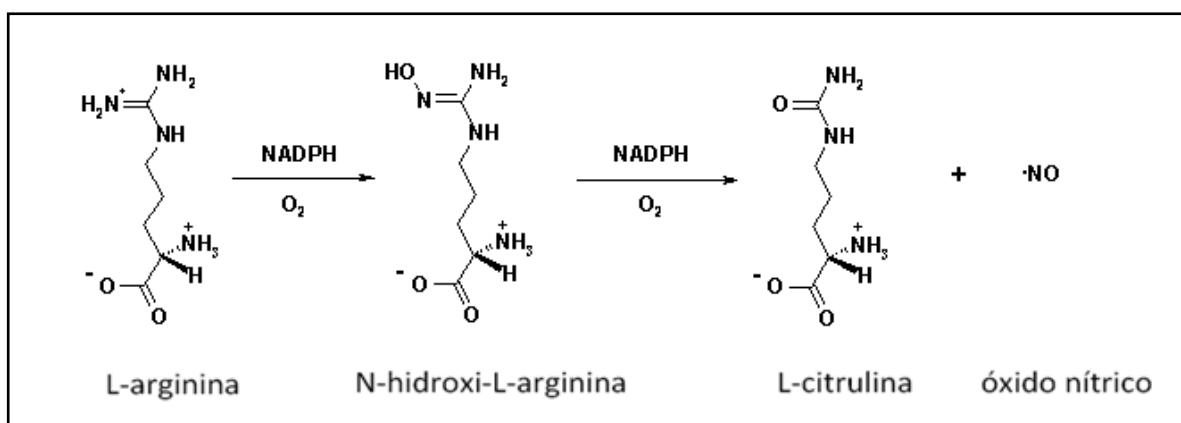


Figura 6. Síntesis de NO^\bullet catalizada por la enzima NOS

El estrés oxidativo se produce cuando existe un desequilibrio entre la producción de radicales libres y los agentes antioxidantes que los neutralizan, por lo que los radicales libres provocan daños en macromoléculas y en la célula, llevando a la muerte celular. Cuando un radical libre inicial modifica una biomolécula después de transferir o capturar un electrón se pueden establecer reacciones en cadena por medio de varios transportadores que se oxidan y se reducen secuencialmente. El daño es transmitido por medio de los transportadores, que incluso pueden ser moléculas circulantes. El incremento de radicales libres conduce a un deterioro celular que se refleja de manera muy acentuada durante el envejecimiento.

El organismo dispone de sistemas de defensa antioxidante para neutralizar el exceso de radicales libres. Al aumentar la producción de radicales libres, estos mecanismos se activan para controlar y estabilizar el ambiente redox intra o extracelular. Un antioxidante es aquella sustancia que, presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retarda o previene 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.

Los sistemas de defensa antioxidante se dividen en tres grupos, según su mecanismo de acción:

- **Primarios:** son aquellos que previenen la formación de nuevos radicales libres, transformándolos en moléculas menos perjudiciales para el medio antes de que puedan reaccionar con éste, o bien evitan la propia formación del radical libre a partir de otras moléculas. De esta manera actúan las enzimas glutatión peroxidada (GPx), glutatión reductasa (GRd), catalasa (CAT), glutatión S-transferasa, y otras proteínas que se unen a metales, con lo que limitan la disponibilidad del mismo para formar radicales. En la mitocondria, el $O_2^{\bullet-}$ es convertido a peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa, el cual es luego convertido a agua. Las acciones negativas del peróxido de hidrógeno, tanto en la mitocondria como en el citosol son impedidas por la enzima GPx ya que elimina el peróxido de hidrógeno a agua oxidando glutatión reducido (GSH), produciendo glutatión oxidado (GSSG). La GRd convierte de nuevo en GSH el GSSG [Harper y cols., 2004], siendo el NADPH el responsable del mantenimiento de esta reserva de GSH al ser oxidado a $NADP^+$ (figura 7). La catalasa también detoxifica H_2O_2 , pero su localización es citosólica y no mitocondrial.

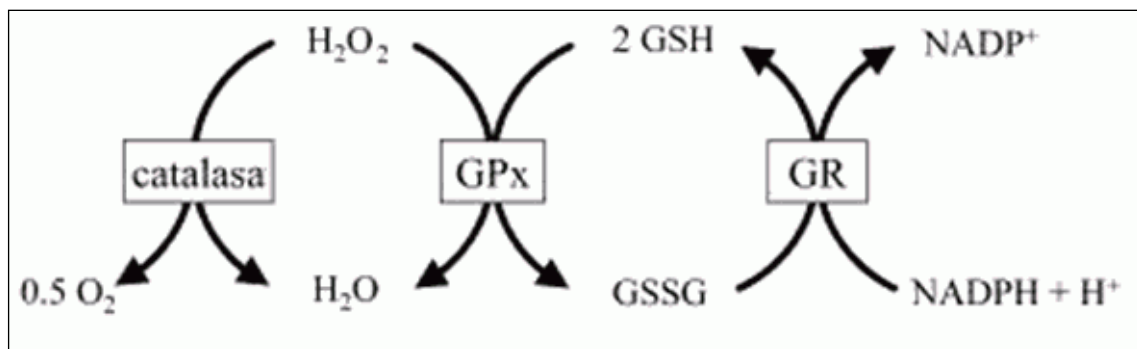


Figura 7. Esquema de la acción de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidada y glutatión reductasa.

- **Secundarios:** son aquellos que capturan al radical libre evitando así la reacción en cadena, y por consiguiente los daños a las macromoléculas. Ejemplos de este tipo son

la melatonina, las vitaminas E y C, aMT, el beta-caroteno, ácido úrico, los estrógenos, etc.

- Terciarios: reparan las biomoléculas ya dañadas por los radicales libres, como las enzimas reparadoras de ADN, etc.

La mitocondria posee otros sistemas defensivos, como el desacoplamiento entre la fosforilación oxidativa y la generación de ATP, ya que reduce la generación de $O_2^{\bullet-}$. Si, en algún caso, se formara este radical, se encontraría con otra línea de defensa, el citocromo c del espacio intermembrana de la mitocondria, ya que este citocromo oxida el $O_2^{\bullet-}$ de nuevo a O_2 , mientras que el citocromo c reducido puede ser de nuevo oxidado por acción del complejo IV de la cadena de transporte electrónico. Este es el mecanismo más efectivo para la retirada de $O_2^{\bullet-}$.

En resumen, observamos como la 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.

1.2.- Teoría mitocondrial [Miquel y cols., 1980]

En esta teoría, Miquel defiende que el envejecimiento celular puede derivar del daño causado al genoma mitocondrial por radicales libres producidos en la mitocondria. El mtDNA es una doble cadena de DNA circular de pequeño tamaño, estimado en torno a 16569 pares de bases. Contiene los genes para la codificación de 13 polipéptidos de la cadena respiratoria mitocondrial y de la fosforilación oxidativa, 2 RNA ribosómicos y 22 RNA de transferencia, imprescindibles para la síntesis proteica en las mitocondrias. Así, la integridad del genoma mitocondrial es esencial para el mantenimiento de la función energética de esta organela, y por tanto, de las células.

Esta hipótesis tiene varias ventajas:

- sugiere mecanismos posibles de intervención en el proceso de envejecimiento.
- Tiene una gran importancia clínica. La disfunción mitocondrial en las células somáticas puede ejercer un papel etiológico en algunas de las enfermedades degenerativas relacionadas con la edad.

En 1972, Harman, que postuló la teoría de los radicales libres del envejecimiento, propone inicialmente la teoría mitocondrial. Esta teoría es refinada y ampliada por Miquel en 1980. Existen, por tanto, nexos comunes entre ambas teorías.

Miquel y cols., en la denominada Teoría mitocondrial del envejecimiento [Miquel y cols., 1989, 1992, 1996], mantienen que el envejecimiento celular puede derivar del daño causado al genoma mitocondrial (mtDNA) por radicales libres producidos en la membrana mitocondrial interna. Así, el daño oxidativo provocado a las diversas estructuras mitocondriales podría estar relacionado con los procesos de envejecimiento.

En las células aeróbicas, la mitocondria es la principal fuente energética celular, produciendo un 90-95 % del ATP total, consumiendo aproximadamente un 95 % del O₂ que utiliza la célula. Este proceso, como se ha mencionado anteriormente sería la principal fuente de las especies reactivas del oxígeno, que actúan mayoritariamente sobre las macromoléculas más próximas, como los lípidos de la membrana mitocondrial, las proteínas de sus sistemas enzimáticos y, especialmente, el DNA mitocondrial (mtDNA), muy susceptible al daño oxidativo ya que este mtDNA no dispone ni de histonas [Schapira, 1992] que lo protejan ni tampoco de todos los sistemas defensivos del DNA nuclear, con lo que es más propenso a mutaciones, deleciones de la doble cadena, etc. Hasta hace poco se pensaba que carecía de mecanismos de reparación [Ortí-Pareja y cols., 1998], aunque recientemente se ha descrito reparaciones basadas en la excisión de bases [Harper y cols., 2004]. Este acúmulo de daños produciría un deterioro crónico y progresivo en la mitocondria y, por tanto, en la función celular.

1.2.1.- DNA mitocondrial y envejecimiento.

El mtDNA es una doble cadena de DNA circular de pequeño tamaño, aproximadamente constituida por 16.569 pares de bases. Contiene genes para la codificación de 13 polipéptidos relacionados con 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]. La mayoría de la información está codificada en la hebra pesada, donde se encuentran genes para dos rRNAs, catorce tRNAs y doce polipéptidos. La hebra ligera codifica ocho tRNAs y un único polipéptido. Por ello, la protección del genoma mitocondrial es básica para el mantenimiento de la función energética de esta organela y con ella, 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].

El mtDNA se sitúa en las proximidades de la membrana interna mitocondrial, estructura donde se realizan los procesos de fosforilación oxidativa que aportan la energía a la célula, y donde se generan la mayor parte de los radicales libres derivados del oxígeno [Shigenaga y cols., 1994].

Este mtDNA es muy vulnerable a la agresión que producen estos radicales, como se ha mencionado en el punto anterior. 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], así como el descubrimiento de mutaciones (roturas de la doble cadena, daños y eliminación de bases). También ha sido observado un incremento de 8-oxoguanina (un indicador de alteración oxidativa) en el mtDNA [De la Asunción y cols., 1996], además de la existencia de daño en el genoma mitocondrial inducido por peróxido de hidrógeno (potente agente oxidante) [Yakes y cols., 1997].

Como se ha mencionado, la mayor parte del oxígeno utilizado por la mitocondria en la respiración aerobia es reducido a agua vía complejo IV mitocondrial por la adición de cuatro electrones a cada molécula de oxígeno. En esta reducción de O_2 puede ocurrir que el átomo de O_2 escape del proceso en pasos intermedios, resultando así la formación de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^{\bullet}), correspondiendo a la reducción parcial por uno, dos y tres electrones respectivamente [Barja, 1999].

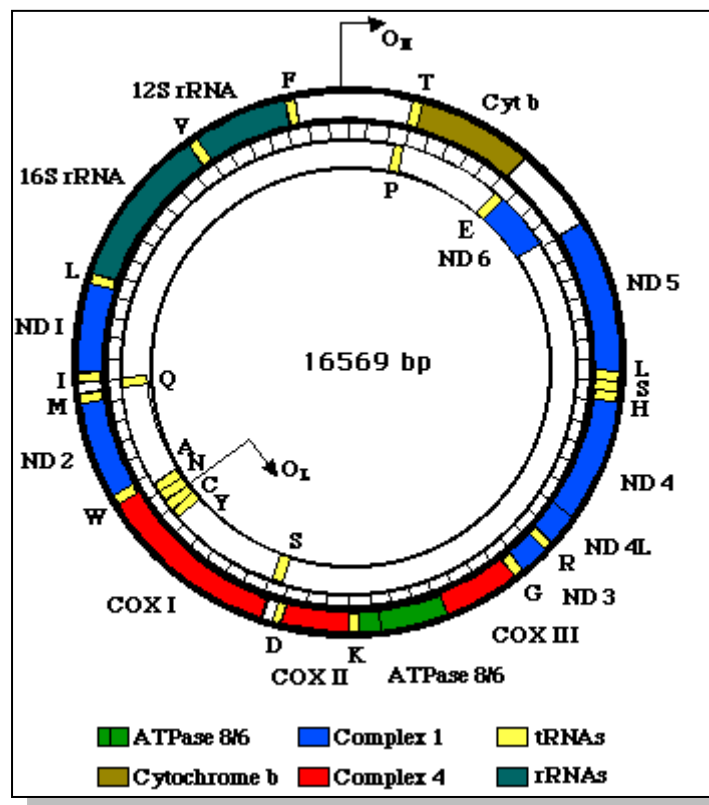


Figura 8. DNA mitocondrial

1.2.2.- Alteraciones y mecanismos de reparación mitocondriales.

El $O_2^{\bullet-}$ - *per se* posee una toxicidad limitada, aunque su peligro estriba en que da lugar a diferentes compuestos, los cuales al reaccionar con macromoléculas esenciales (lípidos, proteínas y DNA) pueden provocar una gran destrucción molecular. El $O_2^{\bullet-}$ - pasa a H_2O_2 , por la

acción de la superóxido dismutasa (SOD), enzima que tiene dos isoformas, CuZnSOD, situada en el citosol, mientras que MnSOD se localiza en la matriz mitocondrial. Esta enzima constituye la primera línea de defensa frente a las ROS [Antolín y cols., 1996]. Aunque la SOD juega un papel fundamental en la eliminación de radicales libre ($O_2^{\bullet-}$) 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 CAT, aunque esta enzima no está presente en la mitocondria. En situaciones en las que la generación de H_2O_2 es muy elevada interviene la GPx, la cual sí se localiza en la organela. La GPx en presencia de 2 moléculas de GSH, convierte H_2O_2 en H_2O , generando como producto de la oxidación del glutatión una molécula de GSSG. Este GSSG es nuevamente reducido de forma rápida por la intervención de la 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). Así, el GSH es una de las moléculas más importantes dada su acción antioxidante.

Aunque la mayoría del H_2O_2 es detoxificado, una parte es convertida en HO^{\bullet} . En presencia de metales de transición, $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 generan el radical HO^{\bullet} , que es extremadamente reactivo y es el responsable de iniciar la destrucción oxidativa de las diversas biomoléculas.

El O_2 también representa un peligro para las membranas celulares debido a que afecta a la integridad de los ácidos grasos poliinsaturados. A esto se le suma que, variándose la cantidad de O_2 presente, éste puede ser incorporado a los lípidos de membrana de cadena larga, resultando en la destrucción de los mismos.

Además de los ROS existen otras especies reactivas de nitrógeno (RNS) que son también dañinas para las macromoléculas. 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. Éste último es muy reactivo, equiparable al HO^{\bullet} , y muy dañino para lípidos, proteínas y DNA.

Para protegerse del daño oxidativo la mitocondria tiene dos mecanismos principales que son la eliminación de ROS/RNS y la reparación del daño provocado a las 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].

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 la fosforilación de ADP a ATP. La actividad de estos complejos mitocondriales disminuye con la edad, fundamentalmente la de los complejos I, II y IV. Numerosos estudios han indicado:

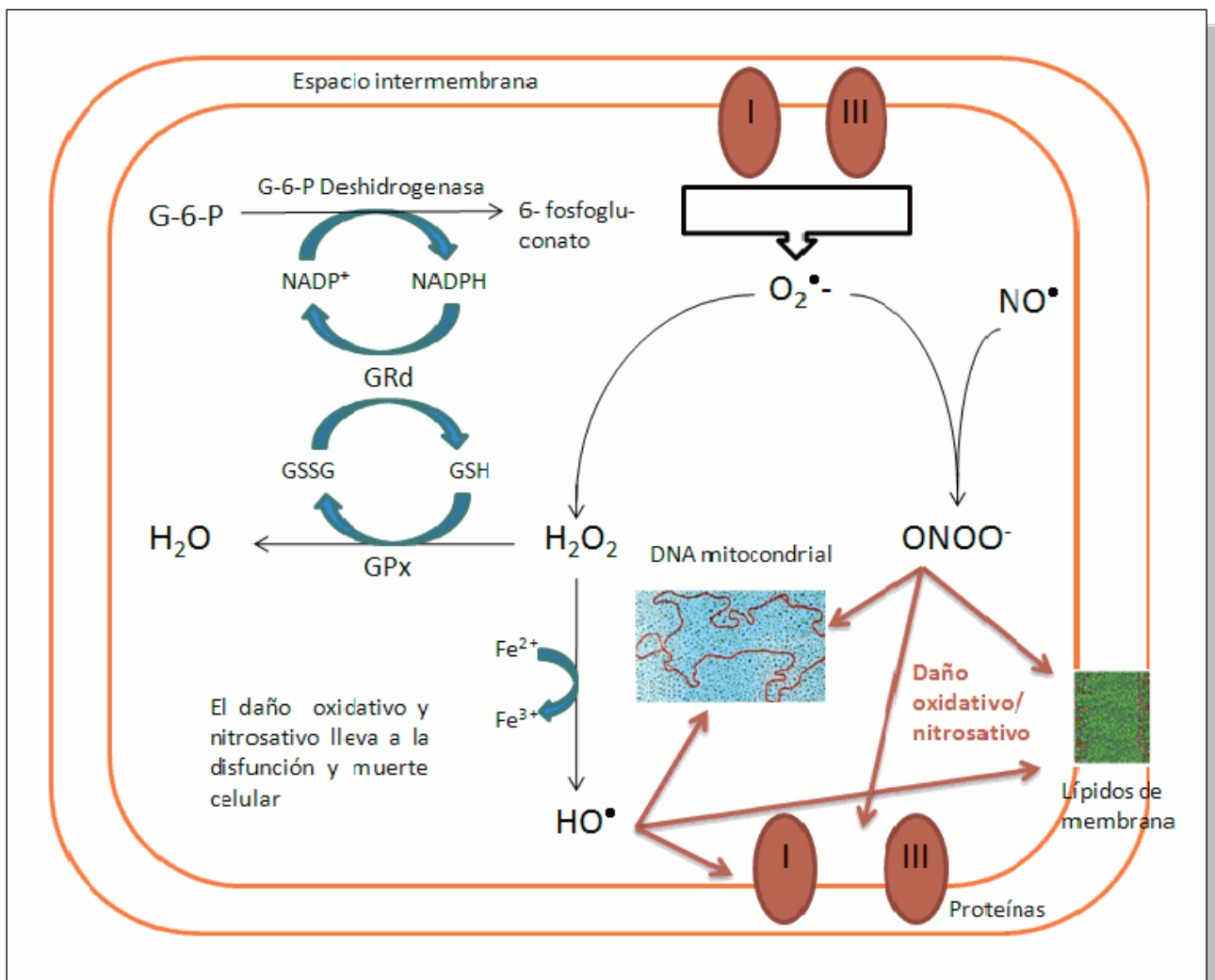


Figura 9. Daño a la mitocondria por las ROS

- El análisis por electroforesis del contenido de proteínas mitocondriales de tejido cerebral de rata demuestra que estas proteínas están disminuidas con la edad [Ragusa y cols., 1989]

- Disminución de la actividad del complejo IV en tejido cerebral de ratas envejecidas [Curti y cols., 1990].
- Disminución de los niveles de citocromo c en cerebro de ratas envejecidas [Benzi y cols., 1992].
- Reducción de la actividad de los complejos I y IV en tejido cerebral de primates [Bowling y cols., 1993].
- Reducción de la actividad de los complejos IV y V en cerebro de ratones [Ferrándiz y cols., 1994].

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 numerosas alteraciones en la estructura de la mitocondria que se han asociado a la edad, como son la vacuolización, agrandamiento de las mitocondrias, inclusiones intramitocondriales paracrystalinas [Schapira, 1992; Feldman y cols., 1981; Frenzel y cols., 1984], inclusiones tubulares y filamentosas [Miquel y cols., 1996; Vanneste y cols., 1981], inclusiones lipídicas, además de acumulación de glucógeno, agregaciones intracitoplasmáticas mitocondriales, pérdida de la matriz, [Coleman y cols., 1988] y variaciones en la distribución intracelular de las mitocondrias asociados con el envejecimiento. También se ha demostrado 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].

En cuanto a la estructura molecular la membrana mitocondrial sufre una disminución de los niveles de ácido linoleico y un incremento de los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena, los cuales son fácilmente oxidables [Shigenaga y cols., 1994; Castelluccio y cols., 1994].

Se ha observado un aumento de los niveles de colesterol y una disminución del contenido de fosfolípidos [Paradies y cols., 1990]. Es remarcable también la caída del potencial de membrana, y el incremento en la generación de peróxido de hidrógeno en membrana [Sastre y cols., 1996].

Otro fenómeno que hay que subrayar es la disminución de los niveles de cardiolipina en la membrana interna mitocondrial. La cardiolipina es un difosfatidil glicerol que desempeña una labor muy importante en la estructura y función mitocondrial, ya que actúa como anclaje para numerosas proteínas a la membrana interna mitocondrial (citocromo oxidasa, ADP/ATP translocador, translocador de fosfatos, ATP-sintetasa mitocondrial, entre otras), y está implicada en la permeabilidad y control de gradientes a través de dicha membrana. Se ha

documentado un descenso del contenido de cardiolipina en numerosos tejidos como son el cardíaco, hepático y cerebral asociado a la edad, con lo que se podría dar una gran alteración en el funcionamiento mitocondrial [Shigenaga y cols., 1994; Ruggiero y cols., 1992; Ames y cols., 1995], ya que repercute negativamente en las enzimas de la membrana interna y disminuye la permeabilidad, contribuyendo así a la degeneración mitocondrial. La cardiolipina contiene mayor cantidad de ácidos grasos insaturados en comparación a otros fosfolípidos, lo que la hace mucho más sensible a la oxidación. El estrés oxidativo promoverá la oxidación de estos ácidos grasos, y disminuirá la cardiolipina mitocondrial, provocando mayor daño mitocondrial, que finalmente, lleve a la degeneración y muerte celular.

1.3.- Teoría inflamatoria [Chung y cols., 2001]

En la mayoría de las patologías degenerativas asociadas al envejecimiento, el incremento de la producción de especies oxidantes va asociado a la inducción de un proceso inflamatorio crónico. La inflamación es un proceso biológico, activo, defensivo e inespecífico al agente causal, que se define como una reacción compleja de defensa ante el estrés, ya sea fisiológico o no, generada por agentes inflamatorios. La acción de muchos tipos de células que regulan la respuesta inflamatoria depende de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. El papel doble que tienen las ROS y RNS (el perjudicial para el organismo y el beneficioso), depende del nivel constante en el medio celular donde estas especies son producidas [Chung, 1998]. Las ROS poseen variadas funciones esenciales como segundos mensajeros bajo la regulación de condiciones fisiológicas como son la regulación de la presión sanguínea y la función plaquetaria. Aunque, también las ROS se comportan de manera nociva para el organismo cuando no son reguladas como ocurre, entre otros casos, en la inflamación crónica y el shock séptico [Anggard, 1994; Grisham, 1994; Halliwell and Gutteridge, 1999; Moncada, 1993].

Además de su función en la señalización celular y como vasodilatador, el NO• tiene un papel importante en la respuesta inmune. Numerosos procesos inflamatorios están asociados con una elevada producción de NO•, llevada a cabo por la iNOS, con subsiguientes efectos tóxicos para la célula. La iNOS se identificó en un principio en macrófagos, aunque puede ser expresada también en otros tipos esenciales de células. Una vez ha sido producido NO•, en grandes cantidades, provocando grandes concentraciones locales, puede actuar como una molécula citostática y citotóxica para bacterias, helmintos, hongos y organismos protozoos además de células tumorales. Estudios que han utilizado inhibidores de la iNOS ó ratones knockout para la iNOS han demostrado que el NO• es un agente señalizador proinflamatorio para la activación de la cascada inflamatoria caracterizada por el incremento en la producción de, entre otras moléculas, citoquinas [Cuzzocrea y cols., 2000], las cuales son pequeñas moléculas proteicas o glicoproteicas cuya función fundamental es intervenir en la transmisión de información (señales) de una célula a otra. El factor de transcripción NF-kB es una de estas

moléculas, el cual, a su vez, es extremadamente sensible a los oxidantes y a otras sustancias proinflamatorias. El NF- κ B activa a varios genes que codifican para otras citoquinas y enzimas proinflamatorias como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la iNOS. Así, el NF- κ B está implicado en la expresión de genes de compuestos oxidantes e inflamatorios como la COX-2 y la iNOS. Estos compuestos producen a su vez más radicales libres dando como resultado el establecimiento de un “círculo vicioso” que fomentaría aún más el estrés oxidativo. De esta manera, los ROS son también producidos en abundancia durante el proceso inflamatorio. La generación sincrónica de NO \cdot y O $_2^{\bullet-}$ favorece la producción de ONOO $^-$ que, como ya se ha mencionado, es una molécula muy tóxica [Beckman y cols., 1996].

Además de tener cada vez más soporte experimental, la teoría mitocondrial y la inflamatoria se pueden englobar en una teoría inflamatoria mitocondrial, donde los radicales libres y la inducción de la iNOS mitocondrial participan en el daño global a la célula. Asimismo, esta teoría explica muchos de los otros procesos incluidos en otras teorías, ya que el estrés oxidativo causa daño a la membrana celular, altera el DNA (nuclear y mitocondrial), daña proteínas como las telomerasas, etc.

2.- MELATONINA

La melatonina (N-acetil-5-Metoxitriptamina, aMT) es una indolamina descrita inicialmente por McCord y Allen [McCord y Allen, 1917] y que fue aislada por primera vez por Lerner [Lerner y cols., 1958] a partir de extractos de glándula pineal. Un año después describieron también su estructura química como N-acetil-5-metoxitriptamina. A esta molécula se la denominó melatonina por su capacidad para aclarar la piel de anfibios y peces mediante la concentración de melanina en los melanóforos relacionados con cambios de color fisiológicos, y a que es un derivado metabólico de la serotonina.

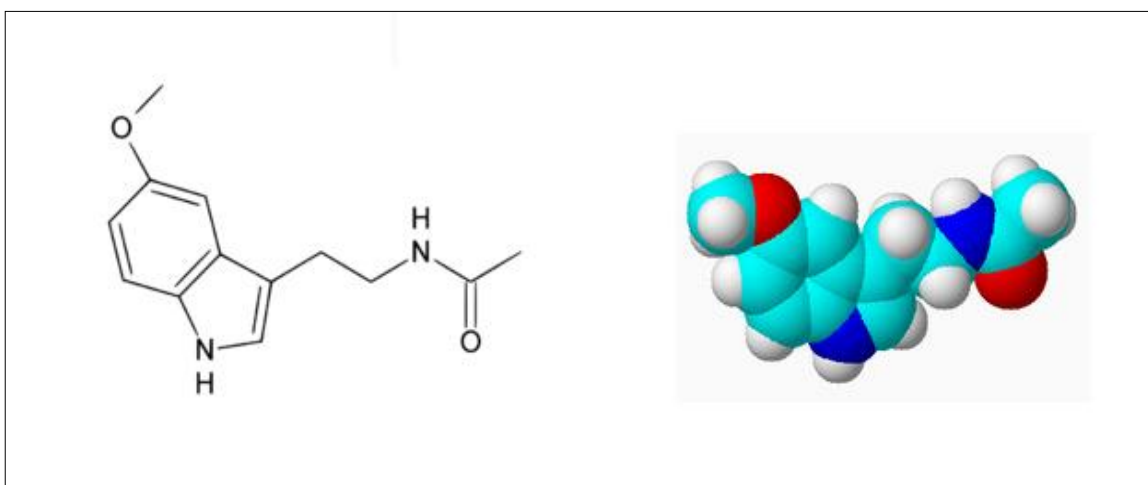


Figura 10. Estructura química de la molécula de melatonina

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

Aunque la melatonina fue identificada en mamíferos, su producción no está restringida a éstos, ya que también ha sido aislada en vertebrados no mamíferos, invertebrados, plantas, algas, eucariotas unicelulares y bacterias [Pandi-Perumal y cols., 2006; Hardeland y Poeggeler, 2003; Macías y cols., 1999; Hardeland y cols., 2007]. Debe ser remarcado el hecho de que la estructura molecular de la melatonina permanece estable en los diferentes reinos animales. En los mamíferos, la síntesis de melatonina se descubrió en la glándula pineal [Reiter, 1991a,b; Erren y cols., 2003].

La biosíntesis de melatonina en la glándula pineal comienza con la captación por parte del pinealocito del aminoácido esencial L-triptófano procedente del torrente circulatorio mediante transporte activo [Sugden, 1979] Este aminoácido se transforma, en primer lugar, en 5-hidroxitriptófano por acción de la L-triptófano hidroxilasa. A continuación, la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa cataliza la reacción produciendo 5-hidroxitriptamina, también conocida como serotonina.

El siguiente paso es la acetilación de la serotonina por la arilalquil N-acetiltransferasa o NAT, enzima que hasta hace pocos años se pensaba era la limitante ya que su actividad presentaba los mismos ritmos circadianos que los niveles de melatonina pineal, y que tanto su actividad como estos niveles de aMT desaparecían con la luz [Liu y Borjigin, 2005]. El proceso finaliza con la metilación de la N-acetilserotonina por acción de la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), enzima que en la actualidad se considera limitante del proceso del proceso de síntesis de la melatonina, ya que la producción de aMT pineal no se correlacionaba con actividad de la NAT, y se relacionaba mejor con la actividad de la HIOMT [Ribelayga y cols., 2000], produciéndose así la molécula de melatonina [Weissbach y cols., 1960; Axelrod y Weissbach, 1961; Axelrod, 1974].

Posteriormente se estudió que la actividad bioquímica para la síntesis de melatonina se ve afectada por ciclos de luz-oscuridad [Quay, 1964]. La melatonina es producida de manera circadiana, ya que durante la noche se libera a través de la activación postsináptica de receptores β -adrenérgicos. La luz evita esta activación adrenérgica de la glándula pineal, con lo que se produce la inhibición de la síntesis de melatonina. Así, el pinealocito modula ciclos de luz-oscuridad, haciendo que su actividad metabólica se ajuste a un periodo de 24 horas. El ritmo circadiano presenta unos niveles máximos de actividad durante la noche, entre las doce y

las dos de la madrugada [Pang y cols., 1980; Aimoto y cols., 1985; Menéndez-Peláez y cols., 1987; Reiter, 1991b, c] y un mínimo entre las doce de la mañana y las dos de la tarde [Simonneaux y Ribelayga, 2003]. Por esto la melatonina es conocida como “la hormona de la oscuridad”. Usando las fluctuaciones endógenas señaladas por la melatonina, los vertebrados han sincronizado su ritmo circadiano con las actividades reproductoras anuales [Reiter, 1991c].

Más adelante, además de la síntesis de melatonina de la glándula pineal, se ha demostrado la presencia de los genes que codifican los enzimas clave de la síntesis de melatonina (NAT y HIOMT) en gran variedad de tejidos del organismo [Stefulj y cols., 2001], por lo que cada tejido podría producir la melatonina que necesita en cada momento, sin depender de la melatonina circulante. Así, en mamíferos, la melatonina es sintetizada en un amplio abanico de tejidos como la retina, el cristalino, la glándula paratiroidea, el cerebro, el cerebelo, los plexos coroideos, el epitelio respiratorio, la piel, el hígado, el riñón, el timo, el tiroides, el páncreas, los ovarios, los testículos, el cuerpo carotídeo, la placenta y el endometrio, así como en células no endocrinas tales como las células NK (natural killer), eosinófilas, plaquetas y endoteliales. En ocasiones, como ocurre en la bilis, la mucosa del intestino y en la médula ósea, la concentración de melatonina alcanzada supera en dos o tres órdenes de magnitud los niveles en sangre [Tijmes y cols., 1996; Abe y cols., 1999; Tan y cols., 1999; Stefulj y cols., 2001; Kvetnoy, 2002; Slominski y cols., 2005].

Otros órganos en los que se ha visto recientemente la existencia de la maquinaria enzimática para la síntesis de esta molécula han sido hígado, bazo y corazón [Sánchez-Hidalgo y cols., 2009]. En todos los territorios extrapineales, la síntesis de melatonina sigue las mismas vías metabólicas que en la pineal. La mayor parte de la melatonina sintetizada por estos órganos permanece en los mismos, y no se libera al torrente circulatorio, por lo que no tiene relación con los ciclos de luz/oscuridad. Podemos, pues, concluir que esta molécula tiene funciones adicionales que, aunque poco conocidas, son de gran interés en la actualidad, y su actividad biológica no se restringe a modular los ciclos circadianos.

En el interior de la célula la concentración de melatonina puede variar en cada orgánulo. Algunos autores afirman que los niveles de esta molécula tanto en el núcleo como en la mitocondria pueden ser significativamente mayores que en plasma [Menéndez-Peláez y Reiter, 1993b; Acuña-Castroviejo y cols., 2003].

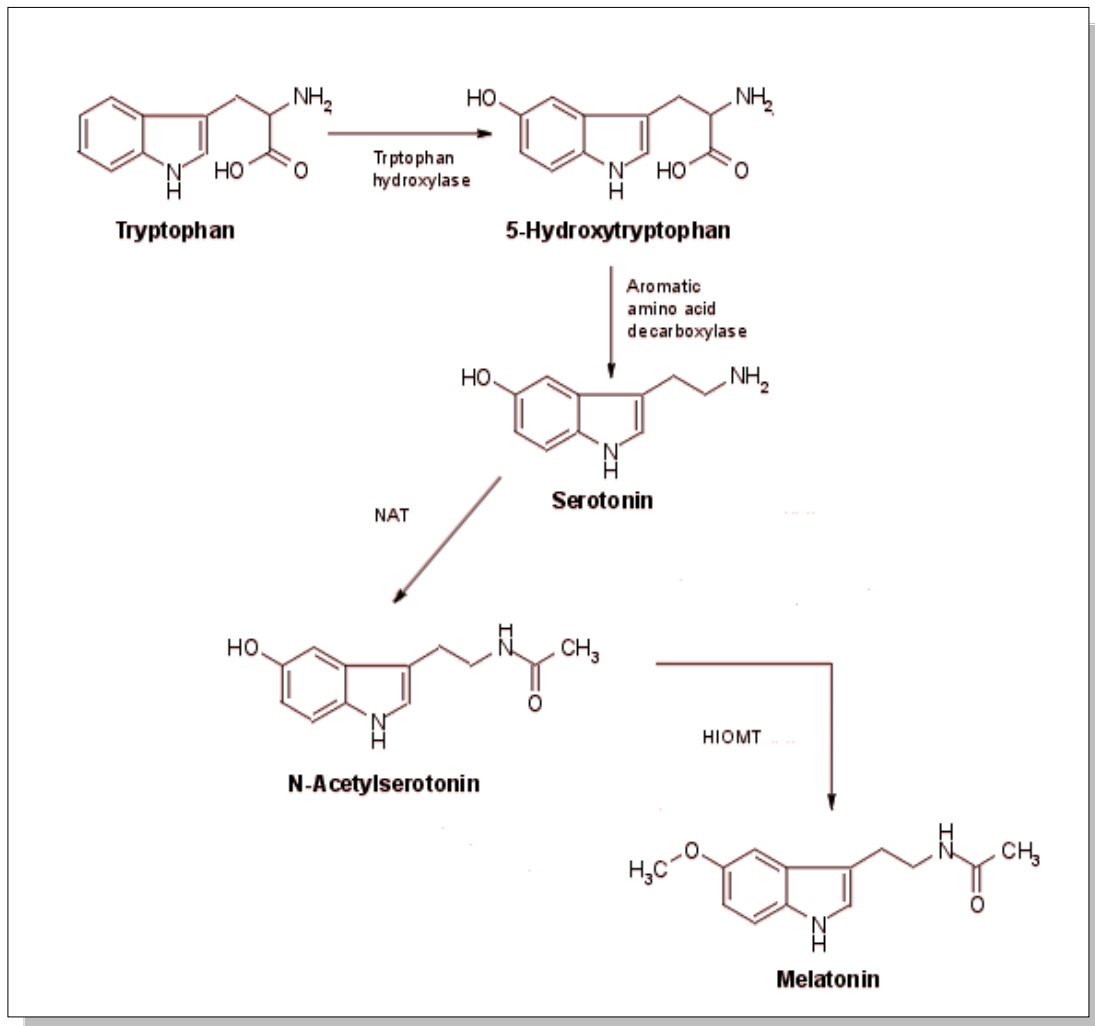


Figura 11. Síntesis de melatonina a partir de triptófano en la glándula pineal

2.1.2.- Metabolismo de la melatonina

La melatonina tiene una vida media en sangre de 20-40 minutos, y sufre un 90 % de aclaramiento en un único paso por el hígado. Este órgano transforma la mayoría de la melatonina que incorpora a 6-hidroximelatonina, que se conjuga principalmente, en un 90%, a sulfato de 6-hidroximelatonina, que es el principal metabolito de la melatonina en orina [Reiter, 1991c]. Se ha demostrado que este paso puede darse también en otras localizaciones extrahepáticas, ya que se han detectado altos niveles de este derivado en riñón como corazón y córtex cerebral [Lahiri y cols., 2004; Ma y cols., 2005]. El 10% restante es transformado a glucurónido de 6-hidroximelatonina [Karasek, 2006; Arendt, 1995]. Además de los procesos enzimáticos, la 6-hidroximelatonina puede ser generada de manera no enzimática, con la interacción de aMT con ROS y RNS como ONOO⁻ [Zhang y cols., 1999] y HO[•] [Horstman y cols., 2002].

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

Otra vía de degradación 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). Hasta hace poco se creía que la formación de este compuesto era únicamente a través de una enzima catalítica, la 2,3-dioxigenasa. Tras este paso, se convertía después en N¹-acetil-5-metoxikinurenamina (AMK), siendo ésta una de las vías más importantes de metabolización de esta indolamina en cerebro de mamíferos [Hirata y cols., 1974; Fujiwara y cols., 1978].

Posteriormente se observó que el AFMK es el resultado de la depuración de H₂O₂ por parte de la melatonina de manera no enzimática [Tan y cols., 2000a]. Esta molécula de AFMK es también un eficiente depurador de HO[•]. Por lo tanto, no sólo la melatonina, sino también algunos de sus metabolitos son muy eficaces en la reducción del daño producido por los radicales libres. Este proceso es conocido como la “cascada antioxidante de la melatonina”. De esta manera se incrementa sobremanera la eficiencia de su actividad como depurador de radicales libres y antioxidante. Hoy día se toma al AFMK como el metabolito primario de la melatonina en organismos en condiciones de estrés oxidativo.

Un metabolito más de la melatonina es la 3-hidroximelatonina cíclica (C3-OHM). Se forma tras la depuración de dos HO[•] [Tan y cols., 2001]. Otro dato que se estudió acerca de la C3-OHM es que los niveles de este derivado de la melatonina se elevaban varias veces tras exponer a los ratas del estudio a radiación ionizante, que genera HO[•] *in vivo*. Se considera que la C3-OHM es un biomarcador de los niveles endógenos de HO[•] [Tan y cols., 1998].

El radical catión indolilo es otro derivado de la melatonina con capacidad para eliminar radicales libres. De manera simultánea depura un HO[•] y un O₂^{•-}.

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

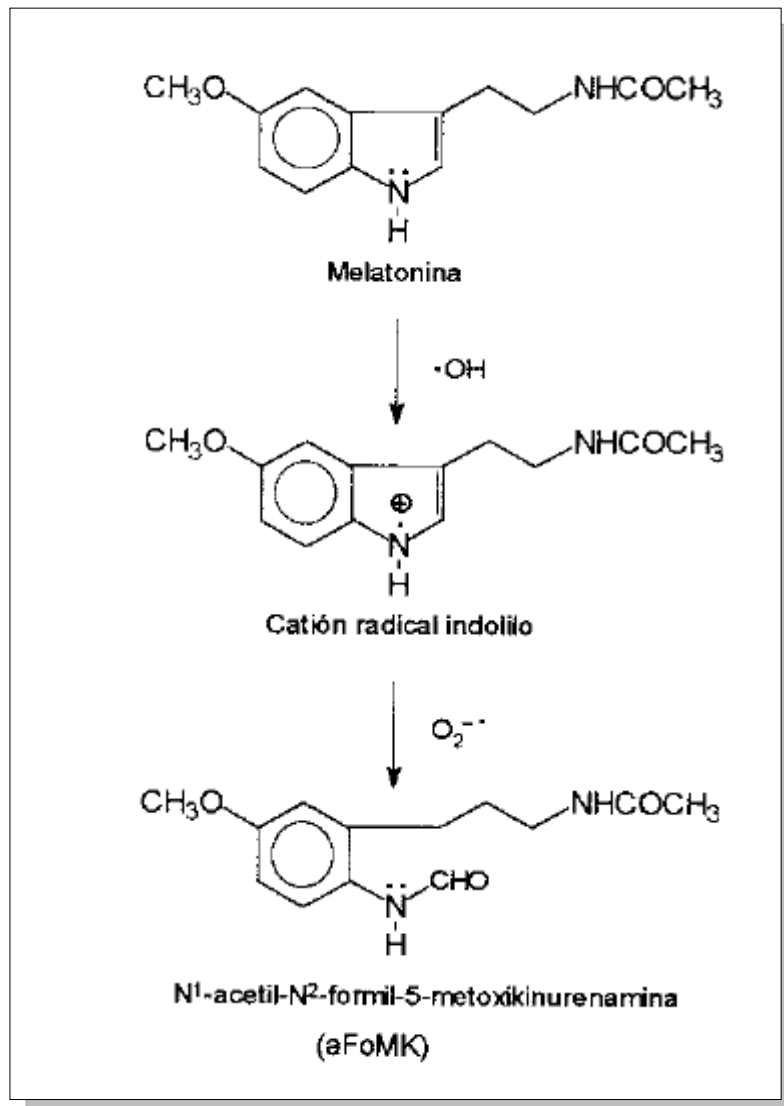


Figura 12. Ruta oxidativa de degradación de melatonina

Tanto el AMK como el AFMK son formados durante el metabolismo enzimático de la melatonina en el cerebro [Hirata y cols., 1974], pero también son productos secundarios producidos por la melatonina en la eliminación de radicales libres de ROS y RNS. Como hemos mencionado, 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].

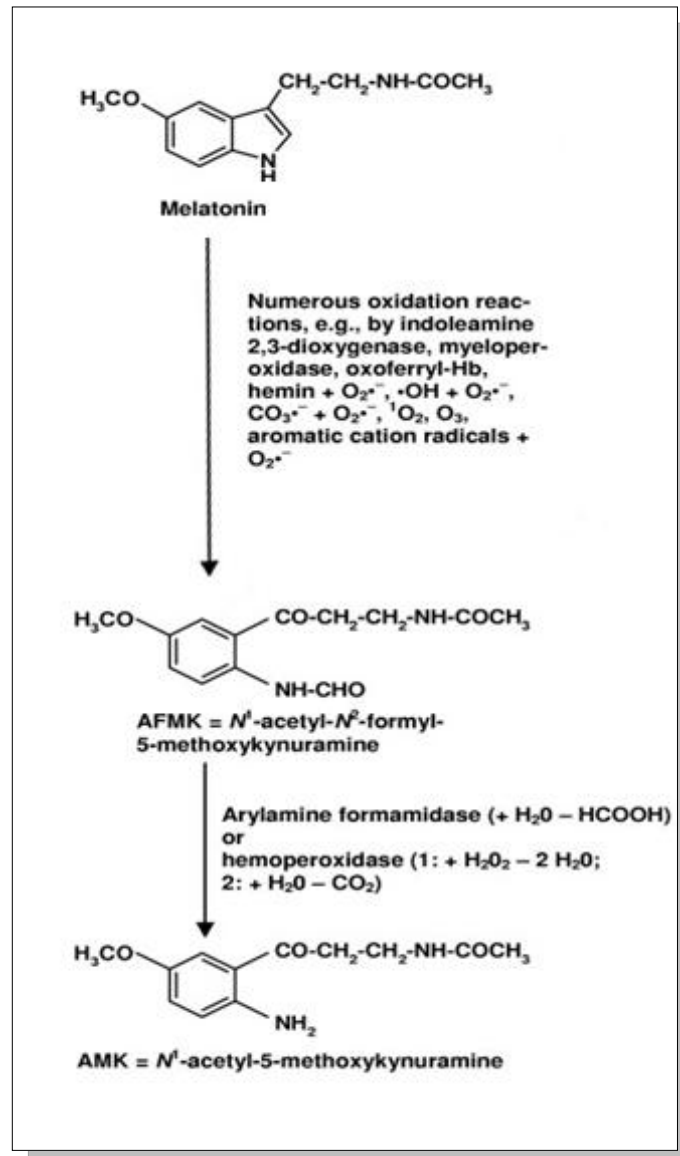


Figura 13. Ruta enzimática de degradación de melatonina

2.2.- Mecanismos de protección de la melatonina

La melatonina posee varias características por las que participa en varias líneas de defensa del organismo. En primer lugar, es una molécula de naturaleza anfifílica, lo que le permite atravesar las membranas celulares con relativa facilidad, alcanzando los compartimentos subcelulares, como mitocondria o el núcleo, donde se acumulan a altas concentraciones [Acuña- Castroviejo y cols., 2002, 2003; León y cols., 2004; López y cols., 2009)].

En segundo lugar, la melatonina actúa como un potente antioxidante de acción directa e indirecta:

Su acción directa se basa en que tanto la melatonina como 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. 2000b, 2001, 2003, 2008b; León y cols., 2004, 2005]. Es muy eficaz en la eliminación del muy reactivo radical HO^\bullet [Tan y cols., 1993; Khaldy y cols., 2000; Reiter y Tan, 2002a], también depura el radical ROO^\bullet [Pieri y cols., 1994] y el oxígeno singulete [Cagnoli y cols., 1995]. El mecanismo por el que neutraliza al radical HO^\bullet consiste en la cesión de un electrón por parte de la melatonina al radical, transformándose ella en el catión indolilo [Hardeland y cols., 1993; Poeggler y cols, 1994]. Éste interacciona con el radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, precursor del HO^\bullet , para generar AFMK, que se elimina por la orina, aunque en las cantidades que aparece (apenas un 0.01% del total de metabolitos detectados en orina) hace pensar que esta excreción urinaria no representa la producción real de la molécula, ya que no es tan hidrofílica como otros derivados, como el sulfato de 6-hidroximelatonina. En algunos tejidos, especialmente el SNC, la melatonina puede ser metabolizada exclusivamente a AFMK y a sus derivados. En condiciones de alto estrés oxidativo, con altos niveles de $\text{O}_2^{\bullet-}$, hay disponible H_2O_2 , la interacción directa con aMT da lugar a grandes cantidades de AFMK. Este metabolito es formado también en la mitocondria. En esta organela existen grandes cantidades de aMT y de citocromo c. El citocromo c usa la melatonina como sustrato para biotransformarlo en AFMK [Semak y cols., 2005]

Otro metabolito de la melatonina con capacidad para depurar radicales libres es 3-hidroximelatonina cíclica. Además de ser el resultado de la eliminación de dos HO^\bullet , es biomarcador de los niveles endógenos del radical al ser eliminado por la orina, donde se puede medir experimentalmente la concentración para tener un índice fiable de estrés oxidativo en el organismo [Tan y cols., 1998], como antes hemos mencionado. Subsecuentemente, también se ha detectado este metabolito tras la interacción de su precursor con ONOO^- [Semak y cols., 2005]. La C3-OHM a su vez puede convertirse en AFMK al seguir depurando radicales libres. Se ha documentado que la C3-OHM depura dos moléculas de radical catión del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbeziazolina)-6-sulfónico. [Tan y cols., 2003]

Otro de los compuestos que es neutralizado por la melatonina es el H_2O_2 . Como producto resultante de esta interacción se obtiene el metabolito AFMK [Tan y cols., 2000a], cuya capacidad antioxidante contra el daño oxidativo inducido por H_2O_2 y radicales hidroxilo en DNA y lípidos se ha puesto de manifiesto [Tan y cols., 2001; Burkhardt y cols., 2001]. Estos experimentos también han sido comprobados *in vivo* [Reiter y cols., 2003]. El AFMK es menos eficiente que la melatonina, ya que tiene preferencia por las reacciones de transferencia de 2 electrones [Tan y cols., 2001], mientras que tanto la melatonina como su metabolito deformilado, el AMK, participan con facilidad en reacciones donde se transfiere un único electrón [Hardeland, 2005; Resmeyer y cols., 2003].

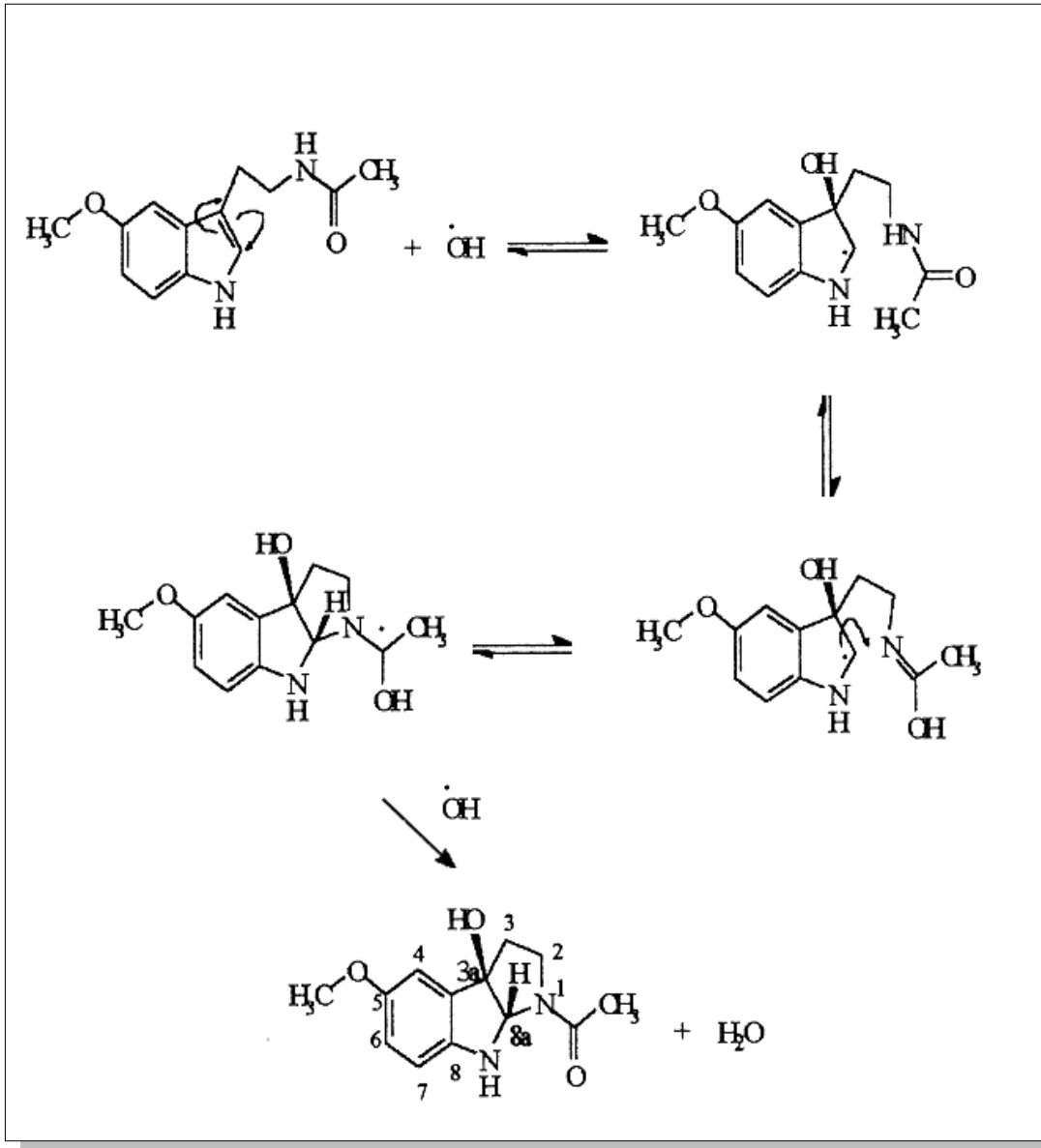


Figura 14. Ruta de reacción propuesta cuando la melatonina depura 2 radicales HO^\bullet

Tanto la 3-hidroximelatonina 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].

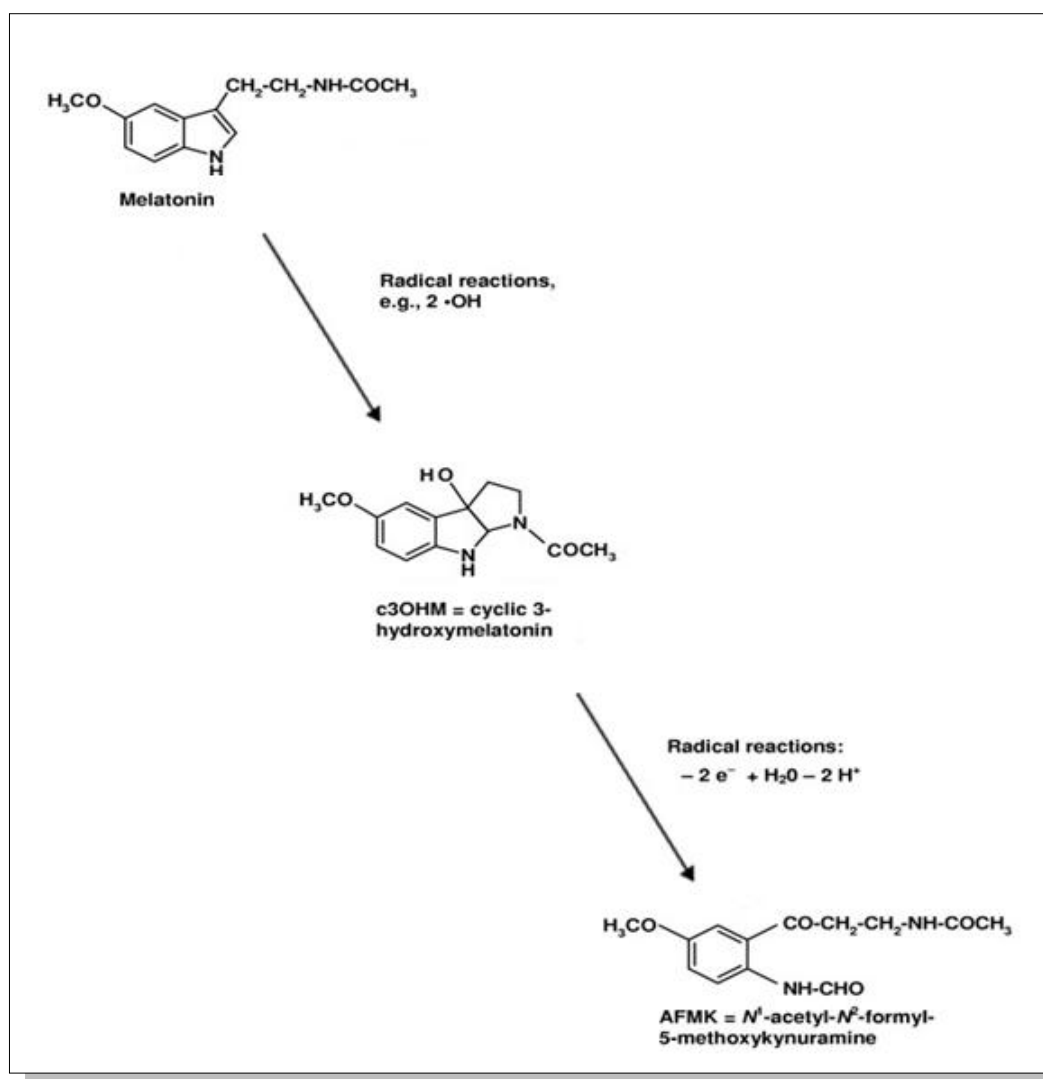


Figura 15. Ruta de reacción propuesta cuando la melatonina depura radicales HO[•] y se convierte en 3-hidroximelatonina cíclica

Algunos autores han apuntado que la melatonina también es capaz de depurar O₂^{•-}, aunque este hecho no está totalmente confirmado, particularmente *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]. El radical O₂^{•-} es menos dañino que el HO[•], aunque tras acoplarse con el NO[•] se forma ONOO[•], el cual posee una toxicidad mucho mayor, incluso superior a la del HO[•], ya que además de su inherente toxicidad, a través del ácido peroxinitroso (ONOOH) puede volver a metabolizarse a HO[•] *in vivo*. [Marshall y cols., 1996; Zang y cols., 1998].

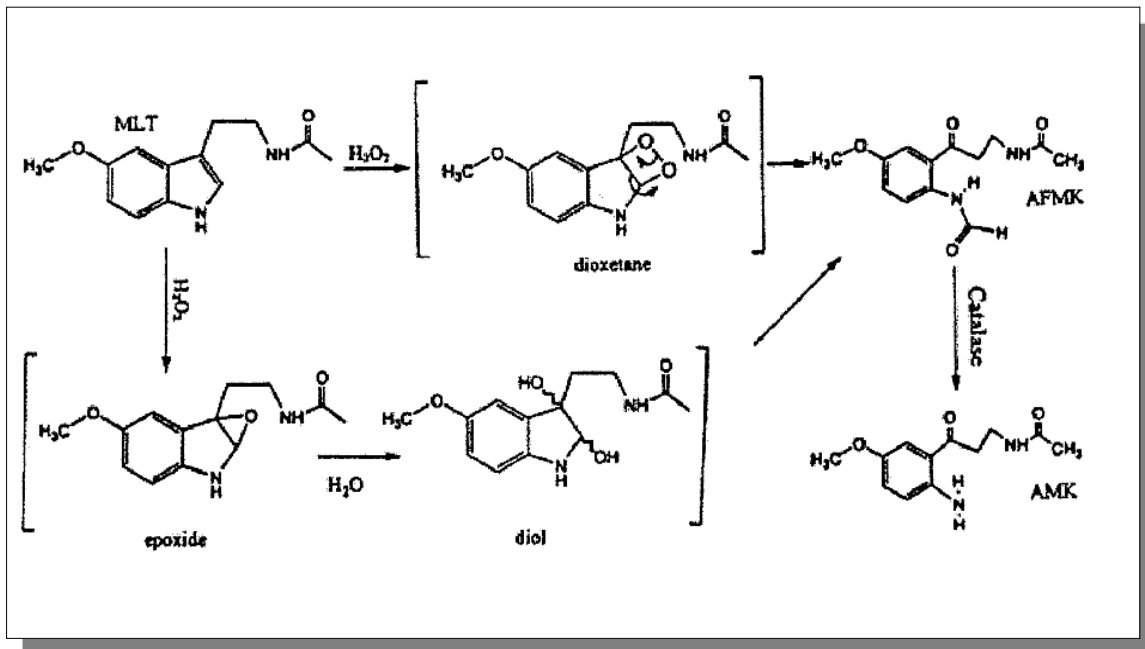


Figura 16. Ruta de reacción de la melatonina propuesta para la degradación de H₂O₂

La eficacia de la melatonina en la neutralización del oxígeno singlete (¹O₂) también ha sido demostrada [De Almeida y cols., 2003]. El ¹O₂ es una forma de oxígeno de alta energía generada normalmente por reacciones de fotosensibilización de colorantes y pigmentos biológicos. Como en el caso de la depuración del H₂O₂, la oxidación que la melatonina sufre en la neutralización genera el metabolito AFMK.

La melatonina es capaz también de eliminar radicales peróxilo (LOO·). De este modo, interrumpe la propagación de la peroxidación lipídica, aunque este hecho podría deberse más a la acción depuradora sobre otras especies reactivas que puedan provocar la peroxidación lipídica que a la neutralización en sí de radicales peróxilo. Está comprobado que la melatonina es altamente eficaz para reducir los niveles de peroxidación lipídica, tanto basales como estimulados por estrés oxidativo [Reiter y cols., 2003; Akbulut y cols., 2008].

La acción indirecta de la melatonina, además de su capacidad intrínseca para depurar radicales libres, se basa en estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así otra forma de reducción del estrés oxidativo [Kotler y cols., 1998; Antolín y cols., 2002; Mayo y cols., 2002]. Así, la melatonina favorece el ciclo del glutatión, incrementando la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) y de la enzima glutatión reductasa (GRd), con lo que regula el balance glutatión reducido (GSH)/ glutatión oxidado (GSSG) [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 de la

ruta de síntesis de glutatión [Urata y cols., 1999], y estimula la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD), encargada de generar el NADPH requerido por la GRd [Pierrefiche y Laborit, 1995]. También se ha estudiado que la melatonina estimula otras enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) [Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003; León y cols., 2004]. Otra capacidad añadida de la melatonina es que ejerce una acción sinérgica con otros antioxidantes como la vitamina E y C [Reiter y cols., 2003].

Otras propiedades antioxidantes de la melatonina se deben a un efecto genómico en la regulación de la expresión de proteínas y la actividad de enzimas antioxidantes [Antolin y cols., 1996], así como a la inhibición de la expresión de enzimas prooxidantes/proinflamatorias como la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) [Crespo y cols., 1999; Escames y cols., 2003; Gilad y cols., 1997]. Existen evidencias de la relación inversa que existe entre el contenido de melatonina en distintos tejidos y su grado de daño oxidativo [Lardone y cols., 2006].

Cada vez existen más evidencias de que la melatonina ejerce funciones de homeostasis en la mitocondria, como queda reflejado en el siguiente apartado.

En resumen, la melatonina es un potente antioxidante, que, actuando de manera directa y/o indirecta, ofrece importantes propiedades para actuar en la mitocondria, y en consecuencia, protegerá tanto al mtDNA como a las membranas lipídicas y las proteínas mitocondriales del daño oxidativo.

2.3.- Melatonina y mitocondria

La mitocondria tiene un papel vital en el envejecimiento ya que la producción de energía es relegada a esta organela. Es en este proceso donde se produce gran cantidad de radicales libres, los cuales infligen un daño excesivo a la mitocondria que se asocia con el proceso de envejecimiento.

La intervención que se atribuye a la melatonina en la homeostasis mitocondrial se apoya en los siguientes puntos:

En primer lugar, la mitocondria produce gran cantidad de ROS y RNS, entre los que se incluye el muy tóxico anión peroxinitrito (ONOO⁻). Es lógica la presencia de un potente depurador de radicales libres que otorgue una protección contra el daño oxidativo producido por estas moléculas.

Otro punto es que la mitocondria depende del GSH tomado del citoplasma. Así, aunque dispone de 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. La melatonina no sólo ayuda a mantener ese almacén de GSH disponible detoxificando radicales libres, sino que 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]. Posteriormente se demostró que la melatonina también aumenta la actividad de los complejos II y III, mientras que en el caso del complejo V no parece tener un efecto positivo claro sobre su actividad, aunque sí sobre la producción de ATP (López y cols., (2006); López y cols., (2009)).

Como consecuencia de su acción sobre la cadena de transporte electrónico (CTE), la melatonina aumenta la producción de ATP [Martín y cols., 2002] Esta 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 (hay datos que indican la existencia de un sistema de transporte activo) y se acumula a elevadas concentraciones en dicha organela [Martín y cols., 2000a; Acuña-Castroviejo y cols., 2002, 2003; León y cols., 2004; López y cols., (2009)], aumentando la estabilidad de su membrana interna [García y cols., 1999]. Otra acción de la melatonina es la reducción del consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado, ya que puede proteger a la organela del daño de un excesivo estrés oxidativo [Reyes-Toso y cols., 2003, López y cols., 2009], así como reducir el potencial de membrana y la producción del anión superóxido, mientras mantiene la actividad OXPHOS y la producción de ATP [López y cols., 2009], ya que mejora la actividad de la CTE [Acuña y cols., 2005]. La melatonina acelera el metabolismo en mitocondrias aisladas de oocitos de rana [De Atenor y cols., 1994], efecto que puede atribuirse a que la melatonina inhibe el estado 3 de la respiración mientras que no afecta al estado 4.

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].

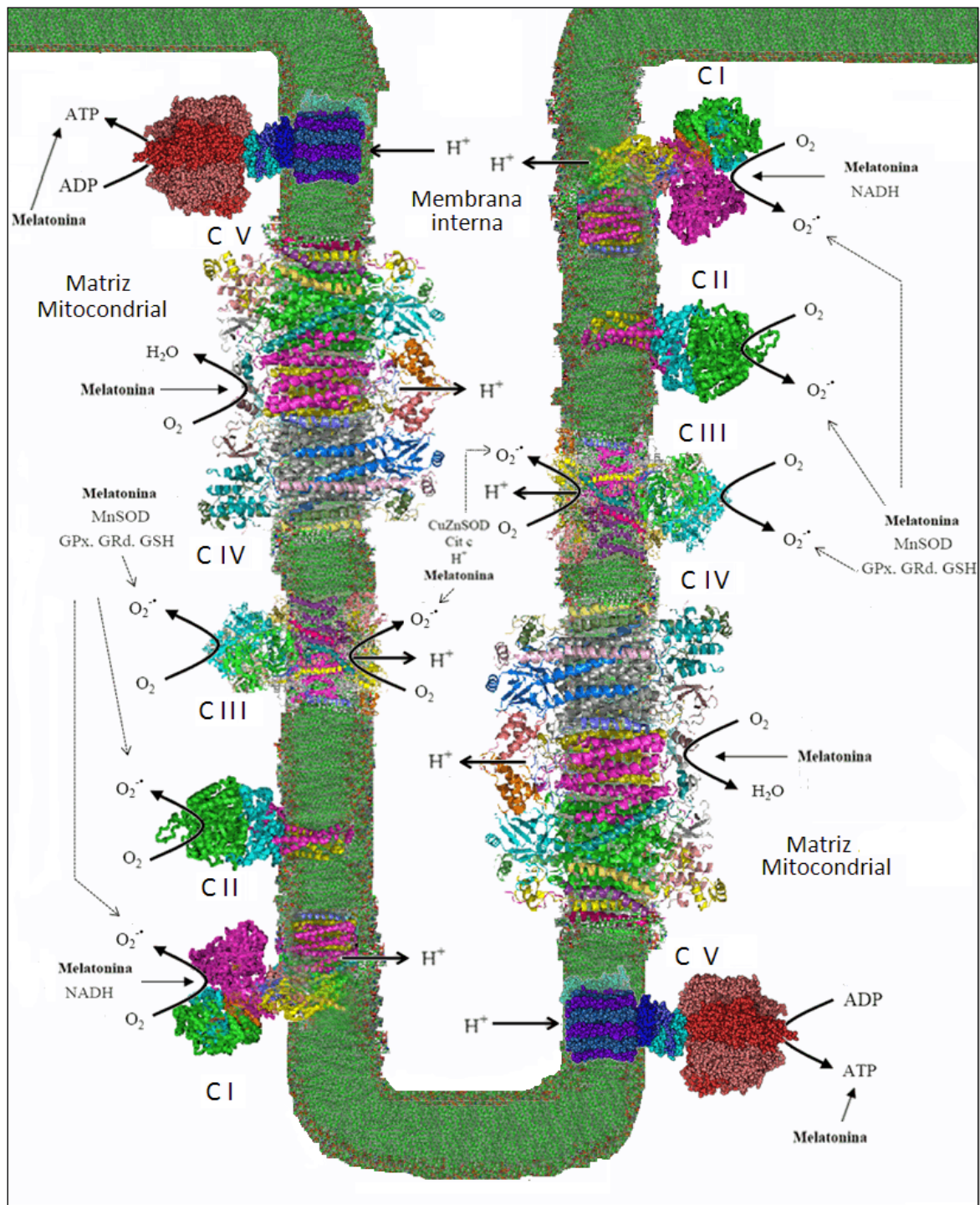


Figura 17. Componentes de la ETC. Los sistemas de defensa antioxidante controlan la producción de ROS durante el metabolismo normal. La melatonina actúa como antioxidante, pero también puede interactuar con los complejos

Otros estudios llevados a cabo en este laboratorio también reflejan la protección que ejerce la melatonina a mitocondrias de corazón y diafragma [Rodríguez y cols., 2006]. Se ha visto también que la melatonina es capaz de proteger de las deleciones del DNA mitocondrial en situaciones de estrés oxidativo [Jou y cols., 2007]. Por otro lado, el AMK participa en las acciones dentro de la mitocondria, aumentando la actividad de la cadena respiratoria y

ejerciendo efectos neuroprotectores que en algunos casos superan a los de la propia melatonina [(Tapias y cols., (2009)]

2.4.- Melatonina y envejecimiento

La melatonina se encuentra dentro del grupo de moléculas denominadas como “geroprotector”, lo que significa que “previene contra el envejecimiento”. El ritmo de producción de melatonina pineal decae gradualmente con la edad, siendo el pico de secreción nocturno cada vez menor hasta que es casi indetectable en plasma a los 20-22 meses en roedores [Reiter y cols., 1980] y entre los 60 y 70 años en humanos [Toitou y cols., 1985]. Así, 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 [Reiter, 1992].

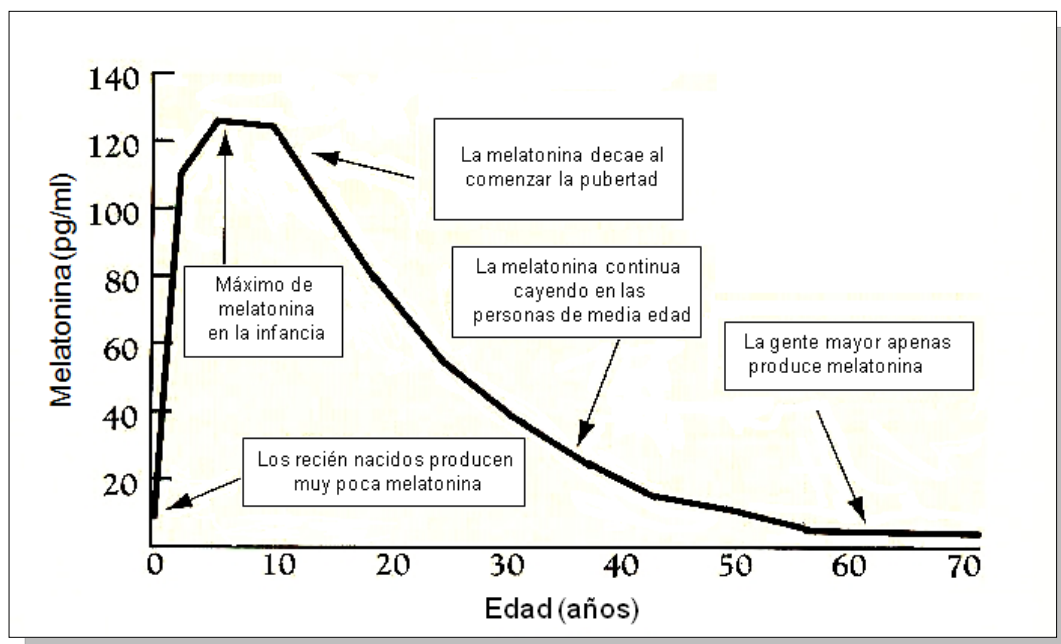


Figura 18. Variación de la secreción de melatonina con la edad.

Recientemente se ha postulado considerar a la melatonina como una hormona anti-envejecimiento y se ha estudiado 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 (senescence-accelerated mouse prone), 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 (senescente-accelerated mouse resistant) 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].

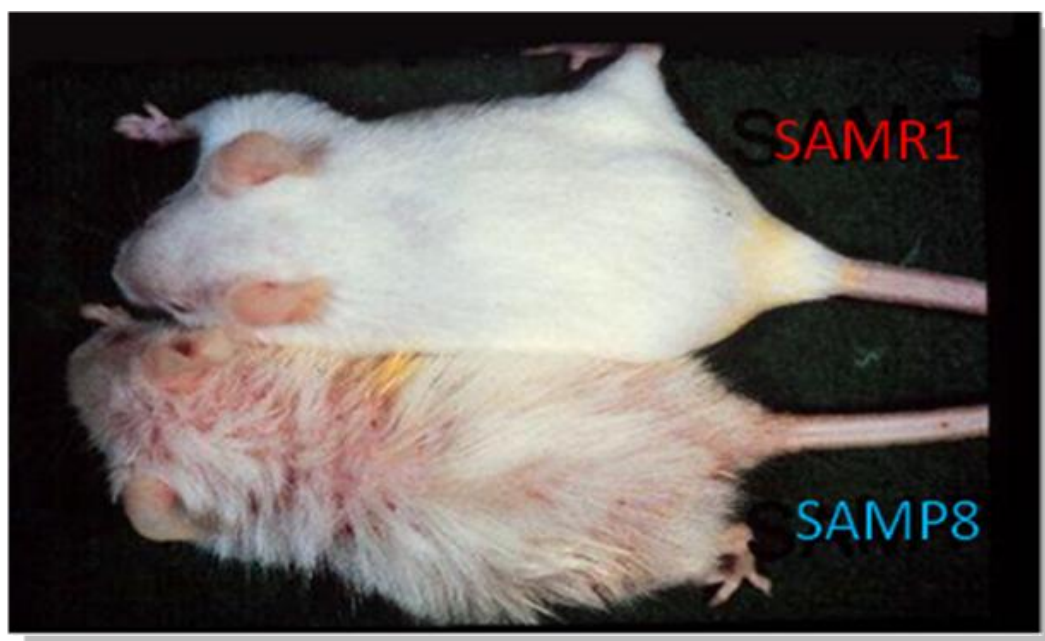


Figura 19. Ratones SAMR1 y SAMP8

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]. También se ha comprobado que un tratamiento prolongado de melatonina tiene efectos favorables en ratones SAMP8, ya que disminuye los marcadores de neurodegeneración a la vez que caen los marcadores de estrés oxidativo [Caballero y cols., 2008]. Otrosí, se ha estudiado la capacidad de la melatonina en un tratamiento crónico sobre ratones hembras SAMP8 para mejorar la capacidad mitocondrial, al disminuir los valores de LPO e incrementar la actividad de las enzimas GPx y GRd, mejorando el ciclo del glutatión, así como aumentar el ATP disponible en las mitocondrias [Rodríguez y cols., 2008]. Además, se ha visto que el tratamiento crónico de melatonina reduce la disfunción en mitocondrias cardíacas [Rodríguez y cols., 2007b] de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Además, se vio un aumento de la actividad de los complejos I, III y IV.

En conclusión, hay gran cantidad de estudios que evidencian efectos beneficiosos en la administración de melatonina durante el proceso de envejecimiento.

HIPÓTESIS

1.- HIPÓTESIS

Los datos de la bibliografía, así como los resultados experimentales de nuestro laboratorio, hablan a favor de un papel fundamental de la melatonina en el control de la homeostasis mitocondrial. Además, cuando la mitocondria está sometida a un daño oxidativo/nitrosativo, independientemente de la patología causante, el efecto de la melatonina para recuperar su función y mantener la producción de ATP necesaria para las demandas de la célula es todavía más claro. Estas acciones de la melatonina se basan, entre otras funciones, en sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias directas y mediadas por sus metabolitos AFMK y AMK, produciendo la llamada “cascada antioxidante”.

El envejecimiento es un proceso donde los radicales libres y la inflamación juegan un papel fundamental, lo que debe afectar a la función mitocondrial. Por otro lado, la producción pineal y extrapineal de melatonina se reduce con la edad, lo que elimina del organismo un mecanismo fundamental de defensa antioxidante y antiinflamatoria.

En consecuencia, nuestra hipótesis es que durante el envejecimiento hay un aumento de estrés oxidativo y nitrosativo, que afecta a la mitocondria de manera primordial, disminuyendo su capacidad de mantener la producción de ATP requerida por la célula. En esta situación, la administración de melatonina debe corregir este problema, manteniendo la integridad funcional de la mitocondria.

OBJETIVOS

1.- OBJETIVOS

Al realizar este estudio multifactorial del envejecimiento, en dos órganos vitales para la vida, como el cerebro y los pulmones, hemos analizado, en ratones SAMP8 de envejecimiento acelerado frente a ratones SAMR1 normales, parámetros de estrés oxidativo y de longevidad en animales a los que se administró melatonina frente a otro grupo de animales a los que se les administró el vehículo. Estos grupos de animales se sacrificaron a los 5 y 10 meses de edad.

Objetivo general:

Valorar la teoría mitocondrial del envejecimiento en cerebro y pulmón de ratones senescentes SAMP8 frente a controles SAMR1, y si la administración crónica de melatonina previene, en su caso, la disfunción mitocondrial.

Objetivos específicos:

1º. Valorar el daño oxidativo mitocondrial mediante la determinación de la peroxidación lipídica (LPO), la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y reductasa (GRd), así como el cociente GSH/GSSG.

2º. Evaluar la bioenergética mitocondrial mediante la medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria (CTE), así como el contenido de ATP y el cociente ATP/ADP.

3º. Evaluar la respuesta inflamatoria dependiente de la edad mediante la medida de los niveles de nitritos y nitratos.

4º. Evaluar las diferencias entre los ratones SAMP8 y SAMR1 en los parámetros anteriores, así como entre ratones machos y hembras.

5º. Valorar si el tratamiento crónico con melatonina previene el estrés oxidativo y nitrosativo mitocondriales debido a la edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Las parejas de ratones SAMP8 y su control SAMR1 se obtuvieron del Council for SAM Research, Kyoto, Japón, a través de Harlam (Barcelona, España). Los animales fueron mantenidos en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, en condiciones estériles, bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas, en el cual la luz se encendía a las 07 h, a una temperatura de $22 \pm 1^{\circ} \text{C}$, y con una humedad del $40 \pm 5\%$, controlados bajo la supervisión del veterinario, y con agua y comida (dieta estándar de laboratorio) *ad libitum*.

Una vez las crías fueron separadas de sus madres a la edad de un mes, comenzó el tratamiento con aMT o vehículo, y los animales se sacrificaron a los 5 y 10 meses de edad. Los animales se clasificaron en los siguientes grupos, con 35 animales por grupo:

- a) Grupo R5v, que comprende los animales tratados con vehículo de 5 meses de edad SAMR1;
- b) Grupo P5v, en el cual se sitúa a los animales tratados con vehículo de 5 meses de edad SAMP8;
- c) Grupo R10v, animales SAMR1 de 10 meses de edad tratados con vehículo;
- d) Grupo P10v, que comprende a los animales de 10 meses de edad SAMP8 tratados con vehículo;
- e) Grupo R10m, en el cual están los animales de 10 meses de edad SAMR1 tratados con aMT
- f) Grupo P10m, que incluye los animales de 10 meses de edad SAMP8 tratados con aMT.

El aMT fue disuelto en un volumen mínimo de etanol absoluto y luego diluido en el agua de bebida en una dosis de 10mg/ Kg de peso del animal durante los 9 meses de tratamiento. La concentración de etanol en la solución final es de 0.066%. Las botellas de agua se cubren con papel de aluminio para proteger el aMT de la luz, y el agua de bebida con el aMT era renovada dos veces por semana.

2. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

CEREBRO:

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y el cerebro se aisló rápidamente. Todos los procedimientos se llevaron a cabo entre 0 y 4° C. El cerebro fue troceado, lavado con tampón A (sacarosa 0.32 M, EDTAK₂ 1 mM, TRIS 10 mM, pH 7.4) y homogenizado (1/10 p/v) en tampón a 500 rpm con un homogenizador de Teflón. El homogenado se centrifugó a 1.320 g durante 3 min a 4° C dos veces. El sobrenadante se centrifugó a 21.200 g durante 10 min. El pellet de mitocondrias se resuspendió en 1 ml de una solución de Percoll en tampón A al 15%, y se añadió a tubos de ultracentrífuga que contenían 1ml de solución de Percoll al 23% y 1 ml de solución de Percoll al 40%, formándose un gradiente de 3 fases debido a la distinta densidad. Se centrifugó a 63000g durante 10 min y la fracción 23/40 correspondiente a las mitocondrias puras se recogió, se lavó dos veces con tampón A a 16.700 y 7.200 g respectivamente para eliminar el Percoll, y se congeló a -80° C. El contenido de proteínas mitocondriales se determinó en una alícuota del homogenizado de mitocondria [Lowry y cols., 1951].

PULMÓN:

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y los pulmones se aislaron rápidamente. Todos los procedimientos se llevaron a cabo entre 0 y 4°C. Brevemente, los pulmones se lavaron con tampón A (0,32M sacarosa, 1 mM EDTA K⁺, 10mM Tris-HCl, pH 7.4, a 4°C), y fueron homogenizados (1/10, p/v) en tampón A a 800 rpm con un homogenizador de Teflón. El homogenado se centrifugó a 1300g durante 3 min a 4°C. El pellet de mitocondrias fue resuspendido en 5 ml de tampón A, y centrifugado de nuevo a 1300g durante 3 min a 4°C. Los sobrenadantes se mezclaron y centrifugaron a 21200g durante 10 min a 4°C. Posteriormente, los pellets de mitocondrias se congelaron a -80°C. El contenido de proteínas se determinó en una alícuota del homogenizado de mitocondria sin BSA [Lowry y cols., 1951].

3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Los resultados obtenidos en este trabajo están referidos a concentración de proteínas de la muestra analizada. Para calcular esta concentración de proteínas se utiliza el método de Lowry [Lowry y cols., 1951] con las modificaciones del método de Biuret. Se trata de una técnica colorimétrica con dos reacciones complementarias:

1. Reacción de Biuret. Es específica de los grupos amino de los enlaces peptídicos e implica la formación de un complejo coordinado coloreado de estos grupos con el cobre en medio alcalino. La misión del pH básico es facilitar el desplegamiento de las proteínas globulares en medio acuoso, y por tanto, actúa como un agente desnaturalizante para que los iones de cobre puedan alcanzar los grupos amino de los enlaces peptídicos.
2. Reducción del reactivo de fenol: esta reacción es específica de grupos reductores como el fenol. La reducción del reactivo de fenol se produce por el efecto de determinados radicales aromáticos de los aminoácidos y de los complejos de Biuret. Este reactivo actúa como indicador redox, ya que al reducirse adquiere un color azul. La intensidad de color dependerá de la cantidad de proteínas presentes en la muestra, y puede cuantificarse midiendo la absorbancia a 650 nm.

Se ha adaptado el método de Lowry a un micrométodo realizado en microplacas de 96 pocillos. Para hacer la recta patrón se utiliza albúmina sérica bovina disuelta en tris 20mM como estándar, con concentraciones comprendidas entre 0,05 -0,8 mg/ml. El primer paso es poner 50 μ l de blanco, patrones o muestras en los pocillos. Seguidamente se adicionan 200 μ l del reactivo de Lowry (carbonato disódico al 2% en NaOH 0,1M, tartrato de sodio-potasio al 1% y sulfato cúprico al 0,5% e una proporción 98:1:1). Se agita (agitador de placas: 1296-001 DelphiaPlateshake) y se deja reposar durante 10 minutos. A continuación, se añaden 50 μ l de reactivo de fenol diluido 1:10 con agua destilada. Se incuba 20 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer). Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

4. DETERMINACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN (LPO)

Para la medida de LPO, las mitocondrias se resuspendieron en 250 μ l de tampón 20mM Tris-HCl enfriado con hielo, y se sonicaron para la rotura de las membranas mitocondriales. Se guardaron alícuotas de estas muestras a -80° C para la determinación de proteínas totales [Lowry y cols., 1951] o se usaron para la medida de peroxidación lipídica. Para este propósito, se usó un kit comercial (Bioxytech LPO-568 assay kit, OxisResearch, Pórtland, OR, USA) de ensayo capaz de determinar malondialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetalquenal (4HDA) [Esterbauer y Cheeseman, 1990]. La concentración de LPO se expresó en nmol/mg de proteína.

5. DETERMINACIÓN DE NITRITOS (NO_2^-)

Para la medida de NO_2^- las mitocondrias se resuspendieron en 250 μl de agua destilada, y se sonicaron para la rotura de las membranas mitocondriales. Se guardaron alícuotas de estas muestras de nuevo a -80°C para la determinación de proteínas totales [Lowry y cols., 1951] o se usaron para la medida de NO_2^- [Green y cols., 1981]. A 100 μl de la muestra se añaden 100 μl de reactivo de Griess (50% de reactivo A [0.1 % Naftil-etilendiamina en agua destilada] y 50% de reactivo B [1% sulfanilamida en 5% de H_3PO_4 concentrado]). Se incubó durante 20 minutos y se leyó espectrofotométricamente (Shimadzu Deutschland GMBH, Duisburg, Germany) a 550 nm. La concentración de NO_2^- se expresó en nmol/mg de proteína.

6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GPX Y GRd

Para esta determinación se siguió la metodología propuesta por Jaskot [Jaskot y cols., 1983]. La fracción mitocondrial se resuspendió en 200 μl de tampón A (fosfato potásico 50 mM y EDTA- K_2 1 mM, pH 7.4) y se sonicó. Para medir la actividad GPx, se añadió 10 μL de cada muestra a 240 μl de la solución de trabajo que contiene tampón A más azida sódica (4mM), Glutation reducido (GSH, 4mM), NADPH (0.2 mM) y 0.5 U/ml de GRd. Tras una incubación de 4 minutos a 37°C , la reacción comenzó al adicionar 10 μl de hidroperóxido de cumeno (0.3%), y la actividad de la GPx se determinó siguiendo la oxidación de NADPH durante 3 minutos a 340 nm en un espectrofotómetro UV (Shimadzu Deutschland GMBH, Duisburg, Germany). La actividad GRd se midió en muestras de 35 μL añadidas a 465 μL de una solución de trabajo que contiene tampón A más glutation oxidado (GSSG, 2mM). Tras una incubación de 4 minutos a 37°C , la reacción comenzó al añadir 8.5 μL de una solución de NADPH (9.5 mM), y la actividad fue medida siguiendo la oxidación de NADPH durante 3 minutos a 340 nm (espectrofotómetro Shimadzu UV-1630). Se midieron las proteínas totales [Lowry y cols., 1951]. La actividad de las enzimas GPx y GRd se expresa en nmol/ min mg proteína. En ambos casos, la oxidación no enzimática de NADPH se sustrajo del resultado total.

7. DETERMINACIÓN DE GSH Y GSSG

Tanto el GSH como el GSSG se midieron por métodos fluorométricos propuestos por Hissin [Hissin y Hilf., 1976], ligeramente modificados. Una alícuota de la muestra se guardó para la determinación de proteínas [Lowry y cols., 1951]. Los pellets mitocondriales se

desproteizaron con ácido trifluoroacético (TCA) al 10% y fueron centrifugados a 20.000 g durante 15 minutos. Para la medida de GSH, se incubaron 10 μ l del sobrenadante con 10 μ l de una solución etanólica de ophtaldehido (OPT) (1mg/ml) y 180 μ l de tampón fosfato (fosfato sódico 100 mM, EDTA- Na_2 2.5 mM, a pH 8.0) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La fluorescencia de las muestras se midió a 340 nm de excitación y 420 nm de emisión en un espectrofluorímetro lector de placas (Bio-Tek Instruments, Inc, Winooski, USA). Para la medida de GSSG, se preincubaron 30 μ l de alícuotas del sobrenadante con 12 μ l de una solución de etilmaleimida (5mg/ mL en agua desionizada) durante 40 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, y luego se alcalinizó con NaOH 0.15 N. Se incubaron alícuotas de 45 μ l con 10 μ l de la solución de OPT y 145 μ l de NaOH 0.15 N a temperatura ambiente y se midió la fluorescencia. Las concentraciones de GSH y GSSG se calcularon de acuerdo con las rectas de calibración preparadas. Los niveles de GSH y GSSG se expresan en nmol/ mg prot.

8. DETERMINACIÓN DE LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

Los pellets de mitocondrias fueron descongelados, suspendidos en 350 μ l del medio de incubación correspondiente al complejo que iba a ser medido, e inmediatamente sonicado para preparar las subpartículas mitocondriales. La concentración de proteína mitocondrial se determina usando BSA como standard [Lowry y cols., 1951]. Para determinar la actividad del complejo I, las fracciones submitocondriales (0.6 mg/ml) se resuspendieron en 350 μ l de medio de reacción que contiene 250mM de sacarosa y 50mM de fosfato potásico, a pH 7.4, A continuación se sonicaron para romper la membrana mitocondrial. Se midió la cantidad de proteínas de la muestra.[14DEA]. A una alícuota de la misma se adicionó antimicina a una concentración final de 10 μ g /ml y decilubiquinona (DB) a una concentración final de 50 μ M. Se tapó con papel de aluminio y se incubó 3 min a temperatura ambiente en un agitador orbital. Tras la incubación se adiciona KCN 1mM, y la reacción comienza por la adición de 40 μ l de NADH (100 μ M). La actividad del complejo I (NADH CoQ oxidoreductasa, expresada como nmol oxidado NADH/ min/mg prot) fue medida siguiendo la tasa de oxidación del NADH a 340nm en un espectrofotómetro UV1603 Shimadzu (IZASA, Sevilla, España) [Barrientos., 2002].

Para la medida de actividad del complejo II (succinato: DCIP oxireductasa, expresada en nmoles DCIP reducidos/ min/mg prot), las partículas submitocondriales (0.03 mg/ml), fueron suspendidas en 350 μ l de tampón fosfato (0.1 M, pH 7.4), y sonicadas. Se midió la cantidad de proteínas, y a una alícuota de la muestra se adiciona 40 μ l de succinato 0.5M y se incubó a 30° C durante 10 minutos. Posteriormente, se adiciona 5 μ l de antimicina A 0.8 μ M, 5 μ l de rotenona 50 μ M, 10 μ l de KCN 2 μ M y 10 μ l de DCIP 50 μ M, a pH 7.4. La reacción se inició al agregar 5 μ l de decilubiquinona 50 μ M. La actividad del complejo II fue medida en un 1ml de

medio de reacción siguiendo la tasa de reducción del 2, 6- DCIP a 600nm con 520nm como longitud de onda de referencia [Barrientos., 2002].

La actividad del complejo III (ubiquinol: citocromo c reductasa, expresada en nmoles de citocromo c reducido/min/mg prot) fue medido tras suspender las partículas submitocondriales (0.03 mg/ml) en 350 μ l de tampón fosfato (PO_4KH_2 35 mM, pH 7.5) y ser sonicadas. Se midió la cantidad de proteína y a una alícuota de la muestra se llevó a 1ml de medio que contenía 35 mM de fosfato potásico, 5 mM de MgCl_2 , 2.5 mg/ml de BSA, 1.8 mM de KCN y 50 mM de rotenona, a pH 7.4. Se incubó a 30° C durante 30 segundos. Se agregó 40,5 μ l de decilubiquinona 2mM previamente reducida con borohidruro sódico, y la reacción comenzó con la adición 12,5 μ l de citocromo c 125 μ M. La actividad del complejo III fue medida siguiendo la tasa de reducción del citocromo c a 550nm con 580nm como longitud de onda de referencia [Brusque y cols., 2002].

La actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa, expresada como nmoles de citocromo c oxidado/min/mg prot) fue medida tras suspender las partículas submitocondriales (0.1 mg prot/ml) en 350 μ l de tampón fosfato (PO_4KH_2 50 Mm, pH 6.8) y ser sonicadas. Se midió la cantidad de proteína y una alícuota se llevó a 1 ml de medio. La reacción se inició adicionando citocromo c reducido previamente con ditionito de sodio 10 mM para tener una concentración final de 75 μ M y midiendo la absorbancia a 550nm Brusque y cols., 2002].

Para la medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria, se hizo mediante la metodología propuesta por Brusque [Brusque y cols., 2002] y Barrientos [Barrientos y cols., 2002] modificado por Escames [Escames y cols., 2005], en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1630. La actividad se expresa en nmol/min mg de proteína.

9. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO MITOCONDRIAL DE NUCLEÓTIDOS DE ADENINA

Los nucleótidos de adenina fueron determinados mediante HPLC con una columna ProPac PA1 (4 x 250mm: Dionex) y un gradiente binario de 0.3M de carbonato amónico y agua [Kraus y cols., 1997]. Las mitocondrias purificadas fueron rápidamente suspendidas en 0.5M de ácido perclórico enfriado con hielo, mezclado durante 120 s en vórtex (para romper las membranas mitocondriales) y centrifugado a 25,000g durante 15 min a 2°C para sedimentar las proteínas. Los pellets se congelaron a -80°C para determinar posteriormente la concentración de proteína [Lowry y cols., 1951]. El sobrenadante se adicionó a 8 μ l de carbonato potásico 5M para neutralizar el ácido y fue centrifugado a 12,000g durante 10 min a 2°C. El sobrenadante resultante fue usado para la medida de nucleótidos de adenina en el HPLC. Tras estabilizar la columna con la fase móvil, se inyectaron 20 μ l de cada muestra en el sistema de HPLC. La fase móvil se compone de agua (fase A) y carbonato amónico 0.3M con pH 8.9 (fase B). Se

utilizó el siguiente programa de tiempo para el gradiente binario, con un flujo de 1ml/min: 5 minutos, 50% A y 50% B; 5 minutos 50–100% B y luego se mantuvo 100% B durante 25 minutos; 5 minutos 100–50% B y luego otros 5 minutos con 50% B [Kraus y cols., 1997]. Para la calibración se usó agua como blanco. Para cada nucleótido (AMP, ADP y ATP) fue construida una recta estándar con una concentración de 3.125, 6.250, 12.5 y 25 $\mu\text{g/ml}$. La absorbancia de las muestras se midió con un detector UV a una longitud de onda de 254 nm. La concentración de cada nucleótido fue calculada basándose en el área de pico de cada uno de los nucleótidos.

10. ESTADÍSTICA

Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos seis animales analizados por duplicado. Se usó un ANOVA seguido por un test de Bonferrini para comparar las medias entre los grupos. Se consideró un valor de p inferior a 0.05 estadísticamente significativo.

Los símbolos y significaciones usados para las comparaciones entre grupos experimentales han sido los siguientes:

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; 5v Vs 10v y 5v Vs 10m

$p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; 10v Vs 10m

‡ $p < 0.05$; ‡‡ $p < 0.01$; ‡‡‡ $p < 0.001$; R1 Vs P8

RESULTADOS

1. CEREBRO

1.1 Efectos sobre la peroxidación lipídica durante el envejecimiento:

La figura 20 muestra los cambios ocurridos en los niveles de LPO, tanto en machos como en hembras, en los ratones SAMR1 y SAMP8. Aunque la edad no elevó significativamente la cantidad de LPO en las hembras, tras el tratamiento con melatonina, éstos disminuyeron por debajo de los niveles de mitocondria de ratones de 5 meses de edad, principalmente en los SAMP8. En cuanto a los machos, éstos mostraron a la edad de 5 meses cantidades de LPO inferiores a las hembras. Los grupos envejecidos obtuvieron significativamente mayores niveles de LPO ($p < 0.001$). En los grupos tratados con melatonina se observa una reducción de los mismos, aunque no significativa.

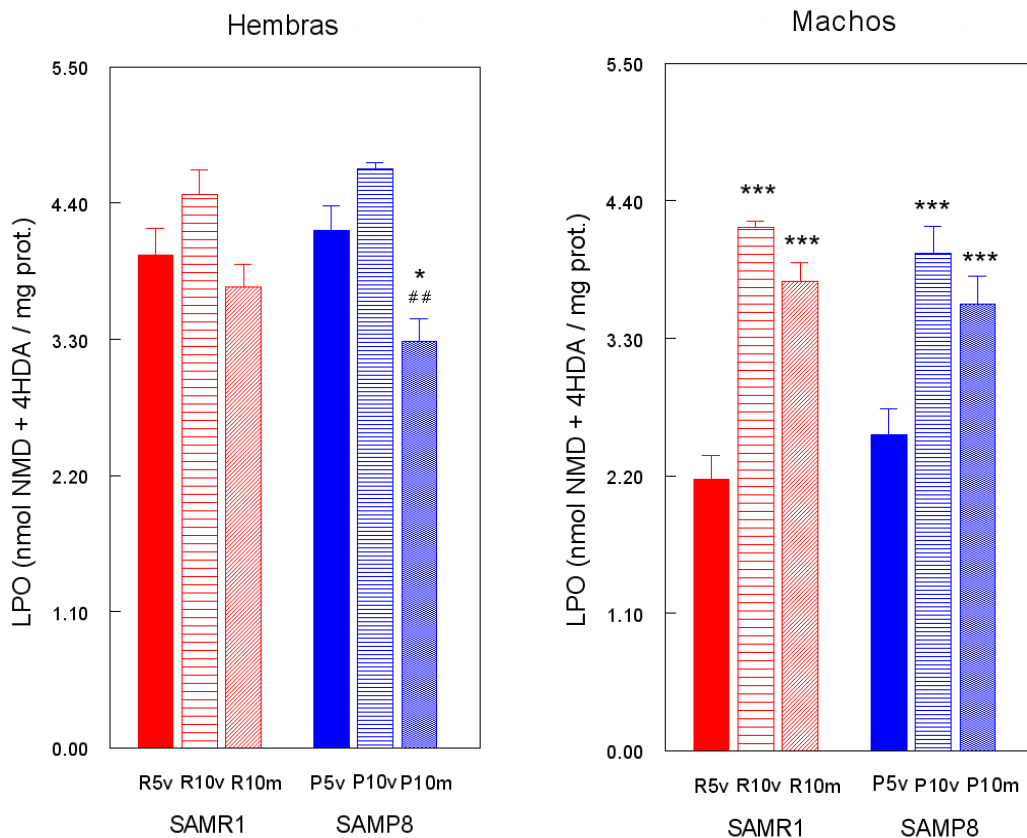


Figura 20. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre los niveles de LPO en mitocondrias cerebrales de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). A los animales se les suministró bien vehículo, (etanol al 0,066%) o bien aMT (10 mg/kg) en el agua de bebida, a partir del primer mes de vida. Fueron sacrificados 4 o 9 meses más tarde (a la edad de 5 ó 10 meses, respectivamente). Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. R5v y R10v, son ratones SAMR1 tratados con vehículo y sacrificados a la edad de 5 y 10 meses; P5v y P10v, se corresponde con animales SAMP8 tratados con vehículo y sacrificados a la edad de 5 y 10 meses; R10m y P10m, tanto SAMR1 como SAMP8, son animales tratados con aMT y sacrificados con 10 meses de vida. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v, # $p < 0.01$ comparado con R10v o P10v.

1.2 Efectos sobre los valores de nitritos durante el envejecimiento:

Los niveles de nitritos se muestran en la figura 21. Con respecto a las hembras, los grupos envejecidos tuvieron significativamente ($p < 0.001$) valores mayores que los grupos de 5 meses de edad. El grupo P10v de los SAMP8 incrementó significativamente ($p < 0.001$) su valor en comparación con el grupo SAMR1. Dentro de los SAMR1, el tratamiento con aMT contrarrestó significativamente ($p < 0.01$) este efecto. Con respecto a los SAMP8, la melatonina redujo los valores de nitritos de manera pronunciada ($p < 0.001$), incluso por debajo del valor obtenido para el grupo de 5 meses de edad. En lo tocante a los machos, ambos grupos envejecidos tratados con vehículo mostraron niveles de nitritos más elevados ($p < 0.001$) que los grupos de 5 meses de edad. Tras el tratamiento con aMT, en los SAMR1, estos niveles cayeron de manera significativa ($p < 0.001$), siendo similares a los valores de 5 meses de edad, mientras que en los SAMP8 la melatonina sólo contrarrestó en parte, aunque significativa, el aumento de los niveles de nitritos.

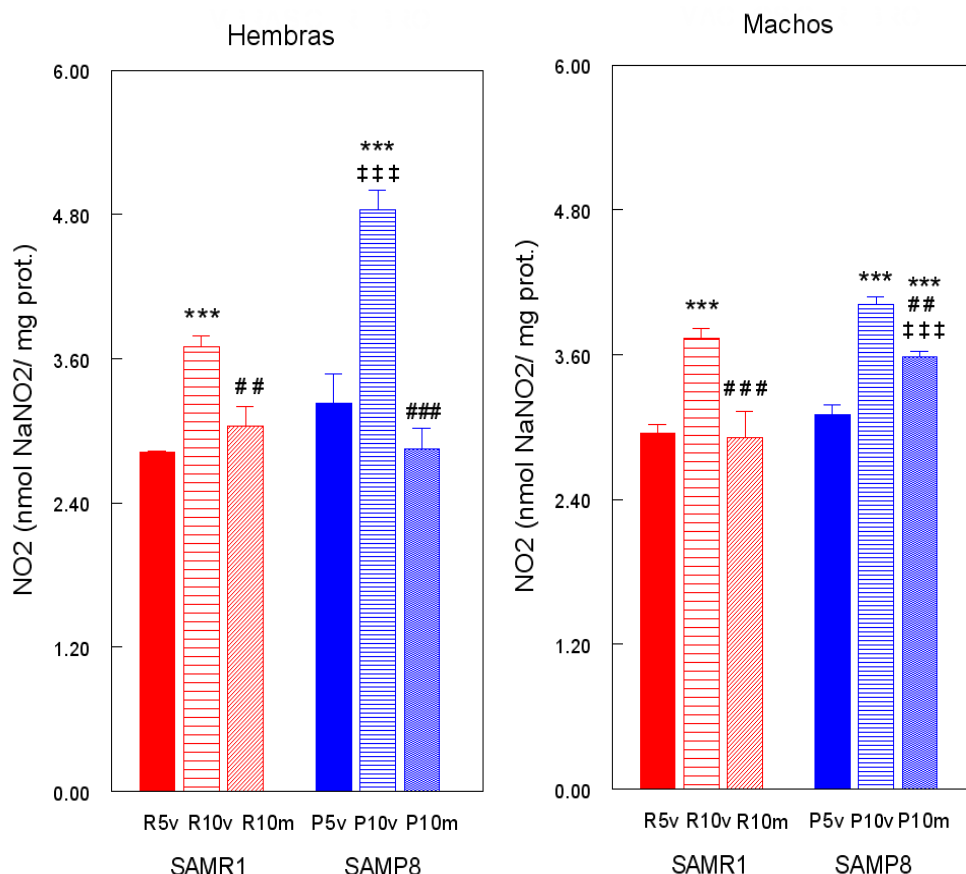


Figura 21. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre los niveles de nitritos (NO_2) en mitocondrias cerebrales de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 20 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. *** $p < 0.001$ comparado con R5v o P5v; ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ comparado con R10v o P10v; ††† $p < 0.001$ comparado con el mismo grupo de ratones SAMR1.

1.3 Efectos sobre la actividad de la enzima GPx durante el envejecimiento:

En lo referente a las hembras, la actividad de la enzima GPx (figura 22) está reducida en los animales envejecidos tanto del grupo SAMR1 ($p < 0.001$) como del SAMP8 ($p < 0.001$). En los grupos tratados con vehículo, los valores de la actividad de la enzima son menores en las SAMP8 ($p < 0.001$) que en las SAMR1. Tras el tratamiento con aMT, la actividad de la GPx fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en ambos grupos de ratones, incluso mayor que la actividad mostrada por el grupo de 5 meses de edad en el caso de las SAMP8. Con respecto a los machos, ambos grupos envejecidos tratados con vehículo obtuvieron una reducción significativa ($p < 0.001$ en caso de SAMR1 y $p < 0.01$ en los SAMP8) de la actividad de la enzima. Los grupos tratados con aMT, los SAMR1 alcanzaron valores similares a aquellos obtenidos por el grupo de 5 meses de edad ($p < 0.001$), mientras que en los SAMP8 esta actividad se incrementó por encima de los niveles medidos para el grupo de 5 meses ($p < 0.001$).

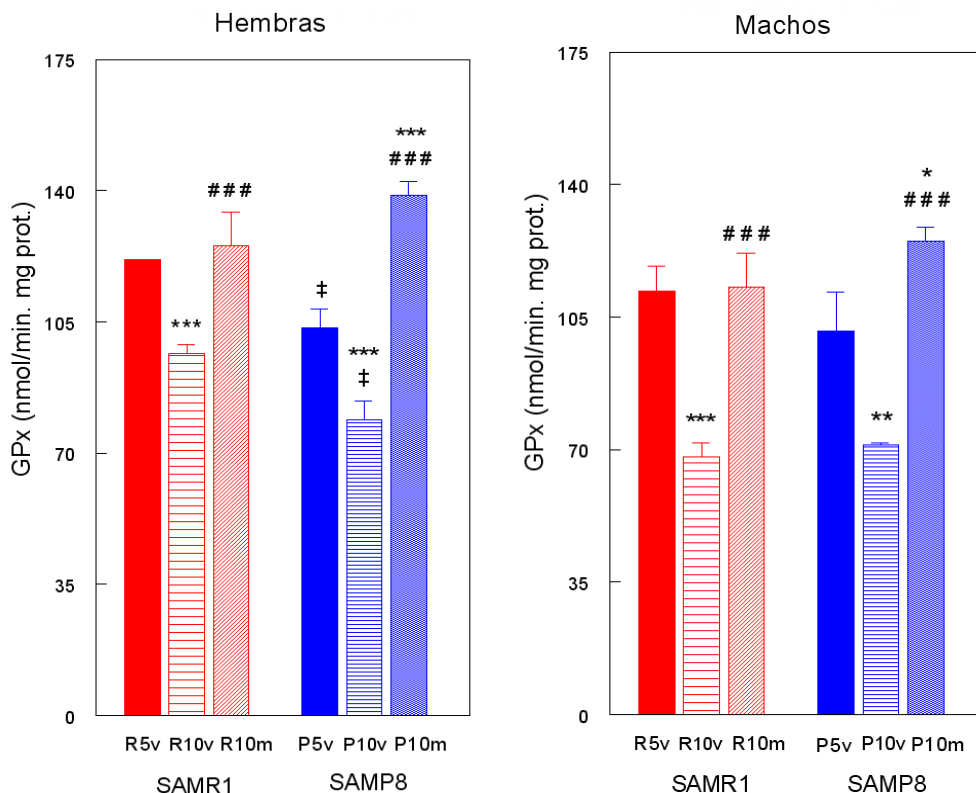


Figura 22. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre la actividad de la enzima GPx en mitocondrias cerebrales de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 20 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; ### $p < 0.001$ comparado con R10v o P10v; ‡ $p < 0.05$ comparado con el mismo grupo de ratones SAMR1.

1.4 Efectos sobre la actividad de la enzima GRd durante el envejecimiento:

En las hembras, la actividad de la enzima GRd (figura 23) se redujo significativamente en los grupos P5v ($p < 0.001$) y P10v ($p < 0.01$) de las SAMP8 en comparación con las SAMR1. El grupo envejecido SAMR1 tratado con vehículo tuvo una menor actividad ($p < 0.001$) que el grupo de 5 meses de edad. Los animales tratados con aMT recuperaron los niveles de actividad del grupo de 5 meses en el caso de las SAMR1, mientras que las SAMP8 fueron significativamente superiores ($p < 0.01$) al grupo de 5 meses. Con respecto a los machos, ambos grupos envejecidos tratados con vehículo obtuvieron una menor actividad de la enzima ($p < 0.001$). Tras el tratamiento, tanto los animales SAMR1 como los SAMP8 recuperaron la actividad, siendo incluso en el caso de los SAMP8 ($p < 0.001$), mayor que la de los animales de 5 meses de edad.

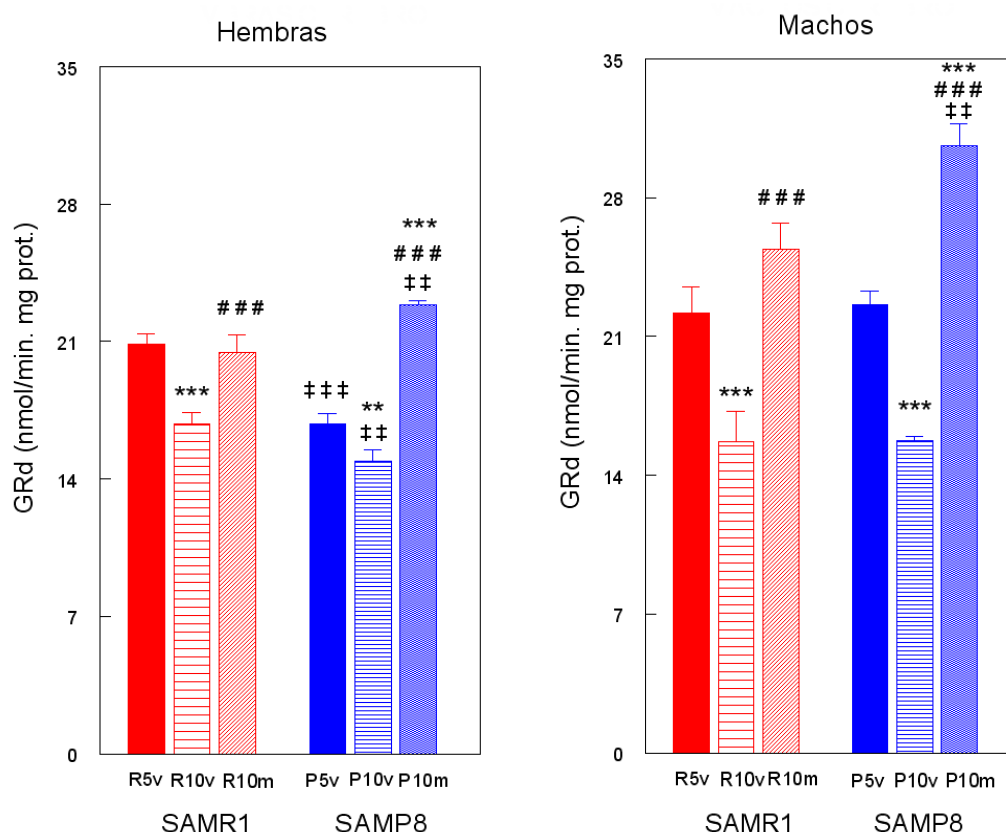


Figura 23. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre la actividad de la enzima GRd en mitocondrias cerebrales de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 20 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; ### $p < 0.001$ comparado con R10v o P10v; † $p < 0.01$ y ‡ $p < 0.001$ comparados con el mismo grupo de ratones SAMR1.

1.5 Efectos sobre la ratio GSH:GSSG durante el envejecimiento:

La edad redujo la ratio GSH:GSSG (figura 24) tanto en las hembras como en los machos SAMR1 y SAMP8. Este efecto fue contrarrestado por el tratamiento de melatonina en todos los grupos ($p < 0.001$ salvo los machos SAMP8 donde el valor registrado fue $p < 0.01$). En el caso de las hembras P10m SAMP8, éstas obtuvieron una ratio de GSH:GSSG mayor ($p < 0.001$) que el grupo P10m de las SAMR1, aunque en el caso de los machos, esto no ocurre.

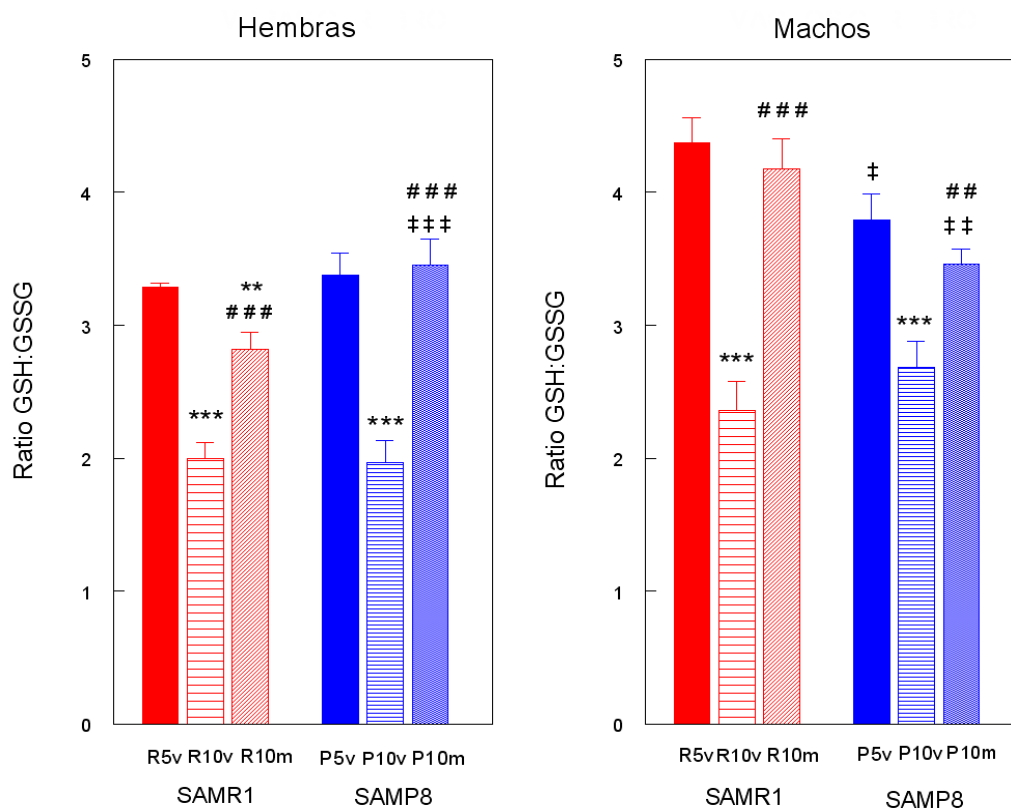


Figura 24. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre la ratio GSH:GSSG en mitocondrias cerebrales de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 20 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; # $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ comparados con R10v o P10v; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ y ††† $p < 0.001$ comparados con el mismo grupo de ratones SAMR1.

1.6 Efectos sobre la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones durante el envejecimiento:

Complejo I: La actividad del complejo I (figura 25, arriba izquierda) disminuyó en los grupos envejecidos tratados con vehículo, tanto en machos como hembras, y en ambos grupos SAMR1 y SAMP8. El tratamiento con aMT contrarrestó este efecto significativamente ($p < 0.001$) en todos los casos.

Complejo II: La actividad del complejo II (figura 25, arriba derecha) en las hembras mostró que los grupos envejecidos tratados con vehículo tuvieron menores niveles de actividad que los grupos de 5 meses de edad ($p < 0.001$ en el caso de las SAMR1 y $p < 0.01$ en el de las SAMP8). Los grupos tratados con aMT, tanto SAMR1 como SAMP8, recuperaron de manera significativa la actividad de este complejo ($p < 0.001$), siendo la actividad incluso superior a la mostrada por los grupos de 5 meses de edad. En lo referente a los machos, la edad no produjo cambios en la actividad del complejo II en el grupo SAMR1, mientras que disminuyó en los SAMP8 ($p < 0.05$). Los grupos tratados con aMT mostraron un incremento muy importante ($p < 0.001$) en la actividad del complejo, siendo en ambos grupos superados los valores obtenidos a los 5 meses de edad de su respectivo grupo.

Complejo III: En el caso del complejo III (figura 25, abajo izquierda) en cuanto a las hembras, el grupo R10v de la cepa SAMR1 mostró una significativa ($p < 0.01$) reducción de la actividad, aunque en el caso de las SAMP8 no lo fue. En los grupos a los que se les administró aMT, se recuperaron los valores obtenidos por los grupos de 5 meses de edad ($p < 0.001$), siendo incluso excedidos en el caso de las SAMP8. Los machos se comportaron de manera distinta. La edad no varió la actividad del complejo III ni en los SAMR1 ni en los SAMP8. El grupo R10m SAMR1 registró una actividad menor que el grupo tratado con vehículo y que el grupo de 5 meses de edad. El grupo P10m SAMP8 restauró en parte la actividad del complejo, aunque de manera no significativa.

Complejo IV: El La actividad del complejo IV (figura 25, abajo derecha) en lo referente a las hembras se tradujo en que el grupo SAMR1 tratado con vehículo experimentó una disminución no significativa. La actividad fue restablecida tras el tratamiento con aMT ($p < 0.001$). El grupo P10m mostró una mayor actividad que el P5v. En el caso del P10m, el aumento de actividad fue incluso mayor. En lo referente a los machos, la edad no cambió la actividad del complejo IV en ninguno de los grupos, aunque se observó un no significativo aumento en ambos grupos tratados con aMT.

1.7 Efectos sobre el contenido de ATP durante el envejecimiento:

El aumento de edad fue acompañado por una pérdida de contenido mitocondrial cerebral de ATP (figura 26) tanto en hembras como en machos, en ambos grupos SAMR1 y SAMP8. En el caso de las hembras, R10m contrarrestó de manera significativa ($p < 0.001$) la disminución de ATP. En el caso de los SAMP8, el grupo P5v tuvo menores niveles de ATP que R5v, pero el tratamiento con aMT elevó los valores incluso por encima de los mostrados por los SAMR1. En cuanto a los machos, la melatonina no cambió los niveles de ATP en el caso de los SAMR1. En el caso de los SAMP8, tanto el grupo p5v como el P10v ($p < 0.05$) obtuvieron menores cantidades de ATP que los SAMR1, la melatonina sí produjo un aumento de estos niveles, alcanzando valores similares en el grupo tratado a los de los animales de 5 meses de edad ($p < 0.001$). En este caso se puede apreciar que los machos presentaron menores cantidades de ATP que las hembras, excepto los grupos envejecidos tratados con vehículo, que tuvieron valores similares.

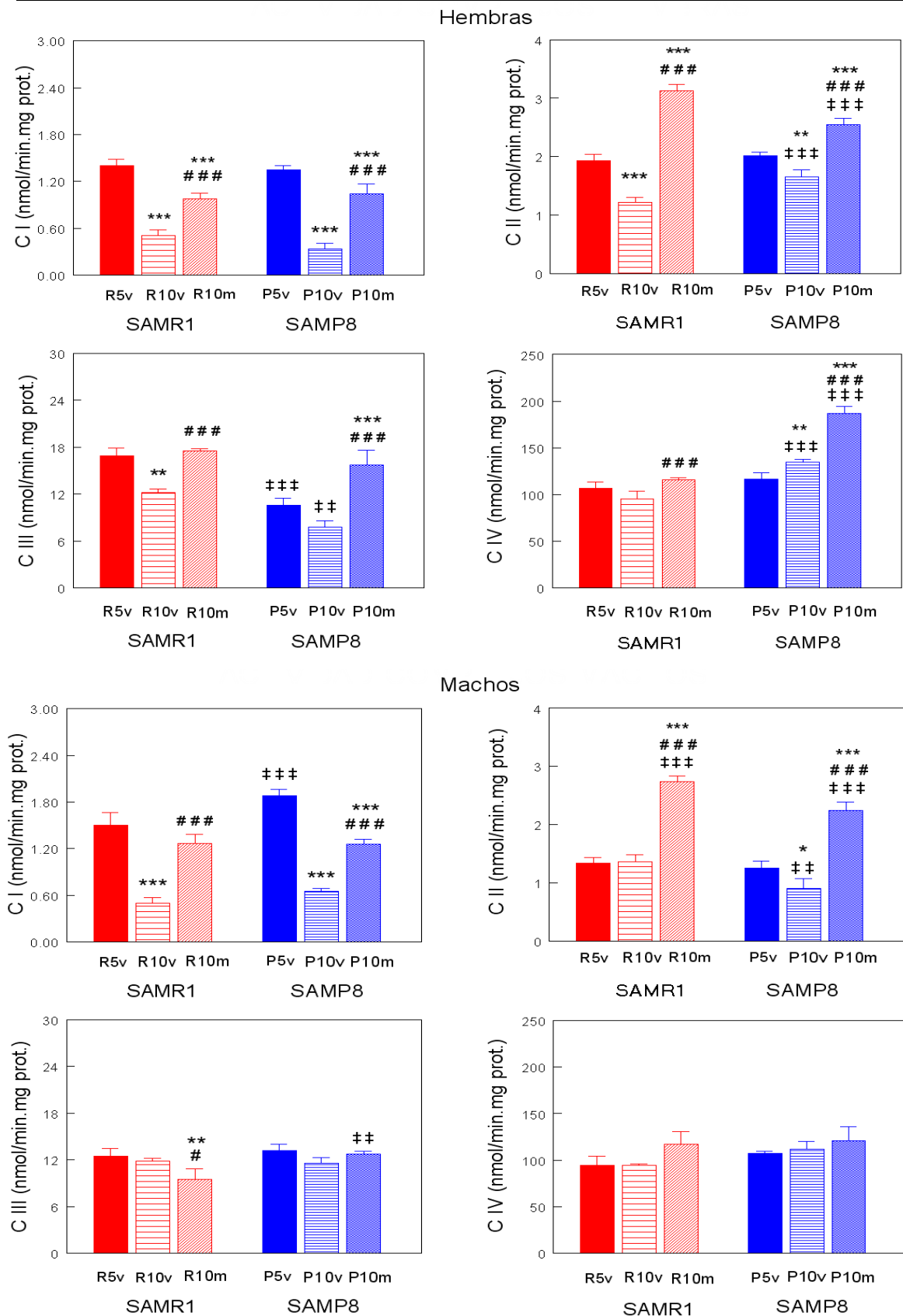


Figura 25. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre la actividad de los complejos de la ETC en mitocondrias cerebrales de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 20 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; # $p < 0.05$ y ### $p < 0.001$ comparados con R10v o P10v, † $p < 0.01$ y †† $p < 0.001$ comparados con el mismo grupo de ratones SAMR1.

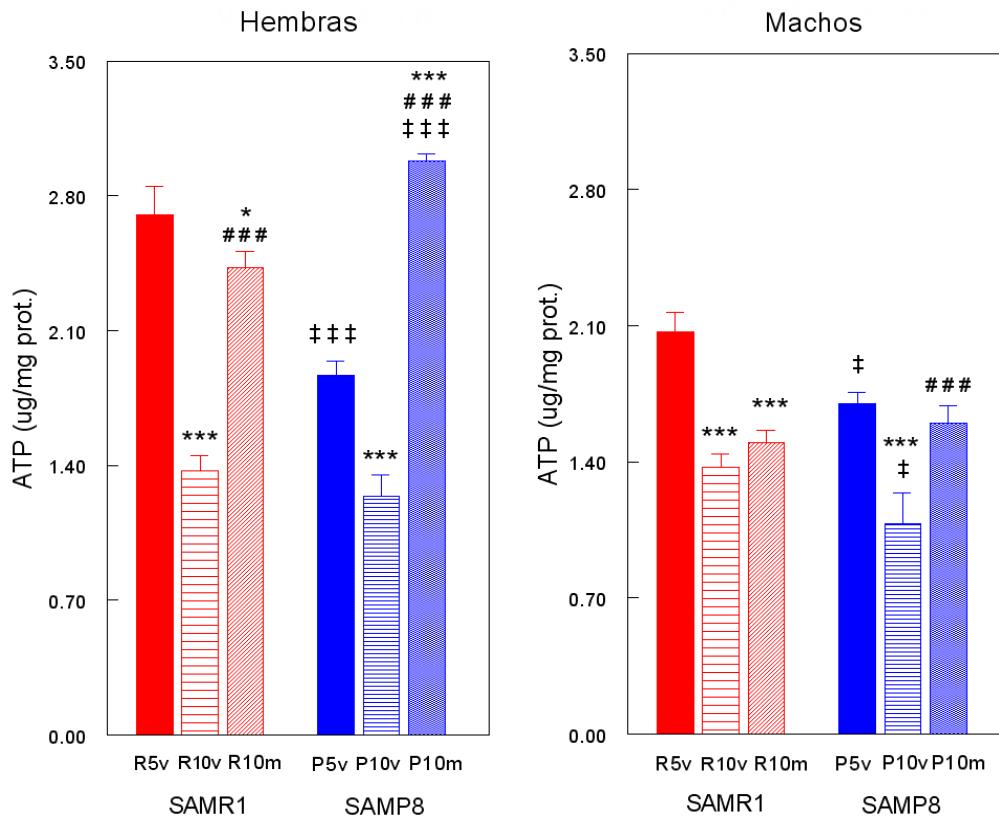


Figura 26. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre el contenido de ATP de mitocondrias cerebrales de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 20 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; ### $p < 0.001$ comparado con R10v o P10v, † $p < 0.05$ y ‡‡‡ $p < 0.001$ comparados con el mismo grupo de ratones SAMR1.

1.8 Efectos sobre la ratio ATP/ADP durante el envejecimiento:

Con respecto a las hembras (figura 27) la ratio ATP/ADP disminuyó de manera no significativa en ambas cepas, SAMR1 y SAMP8. El tratamiento con aMT restableció los valores de la ratio ($p < 0.001$), siendo incluso superiores a los de los grupos de 5 meses de edad. En el caso de los machos, los grupos SAMR1 no mostraron cambios, aunque el grupo tratado con aMT experimentó un incremento no significativo. En la cepa SAMP8, sí se observó una marcada disminución de la ratio ($p < 0.001$). También se apreció un aumento muy significativo de la ratio en el caso del grupo tratado con aMT ($p < 0.001$).

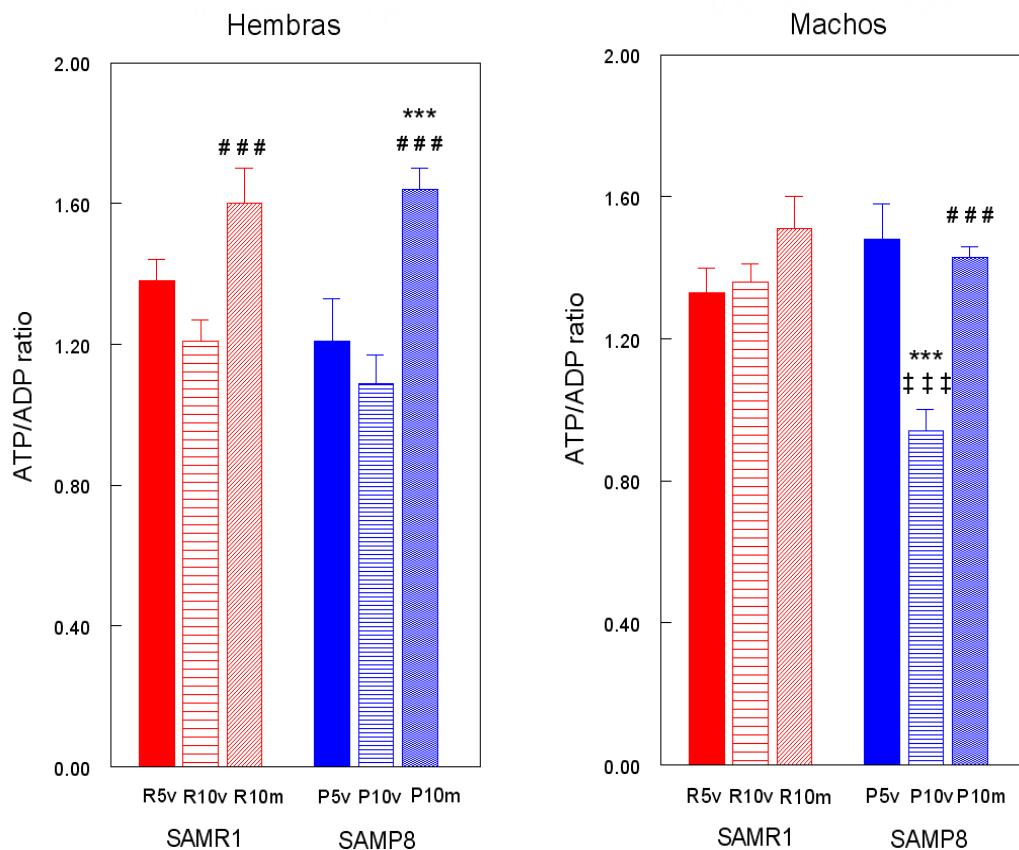


Figura 27. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre la ratio ATP/ADP en mitocondrias cerebrales de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 20 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; ### $p < 0.001$ comparado con R10v o P10v, † $p < 0.05$ y ††† $p < 0.001$ comparados con el mismo grupo de ratones SAMR1.

Estos resultados han sido objeto de la siguiente publicación (página 76):

Carretero M, Escames G, López LC, Venegas C, Dayoub JC, García L, Acuña-Castroviejo D. (2009) Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J. Pineal Res.* 47:192-200.

2. PULMÓN

2.1 Efectos sobre la peroxidación lipídica durante el envejecimiento:

La figura 28 muestra los cambios en los niveles de LPO en ambos sexos, en las dos subcepas estudiadas. Entre las hembras se observan pocas diferencias. Los grupos de 10 meses de edad tratados con vehículo tuvieron un significativo aumento ($p < 0.05$ en las SAMR1 y $p < 0.01$ en las SAMP8) en LPO en comparación a los grupos de 5 meses de edad. Los grupos a los que se les administró aMT redujeron sus valores de LPO, siendo esta caída muy pronunciada ($p < 0.001$) en las SAMR1. En el caso de los machos, se observó un aumento de LPO no significativo en el grupo R10v, mientras que en el caso de R10m, sí experimentó una caída en los niveles de LPO si lo comparamos con el grupo tratado con vehículo. En los ratones SAMP8 se encontraron diferencias notables. Se observó un incremento de LPO ($p < 0.001$) en el grupo P10v en comparación al grupo P5v. A su vez, estos valores fueron significativamente ($p < 0.001$) más elevados que su control R10v. Además, el grupo P10m, experimentó una importante ($p < 0.001$) reducción en los niveles de LPO, obteniendo valores inferiores a los del grupo de 5 meses de edad.

2.2 Efectos sobre los valores de nitritos durante el envejecimiento:

Los valores de nitritos se muestran en la figura 29. En las hembras, el grupo R10v experimentó un aumento significativo ($p < 0.01$) en comparación el grupo R5v. A su vez, en el grupo R10m se observó una disminución en los valores de nitritos ($p < 0.001$) si lo comparamos con el grupo tratado con vehículo. En el caso de los SAMP8 no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos, aunque en P5v ($p < 0.001$) y P10m ($p < 0.01$) se observaron valores superiores a sus controles SAMR1. En los machos, el grupo R10v mostró un incremento en los niveles de nitritos ($p < 0.01$) en comparación con el grupo R5v. En el grupo tratado con aMT se puede ver una disminución de los valores de nitritos, aunque no es estadísticamente significativa. En los ratones SAMP8, el grupo P10v obtuvo mayores niveles de nitritos ($p < 0.001$) que el grupo R5v, como ocurre con los SAMR1, aunque en este caso el grupo tratado con aMT sí obtiene una disminución significativa en la cantidad ($p < 0.01$) de nitritos.

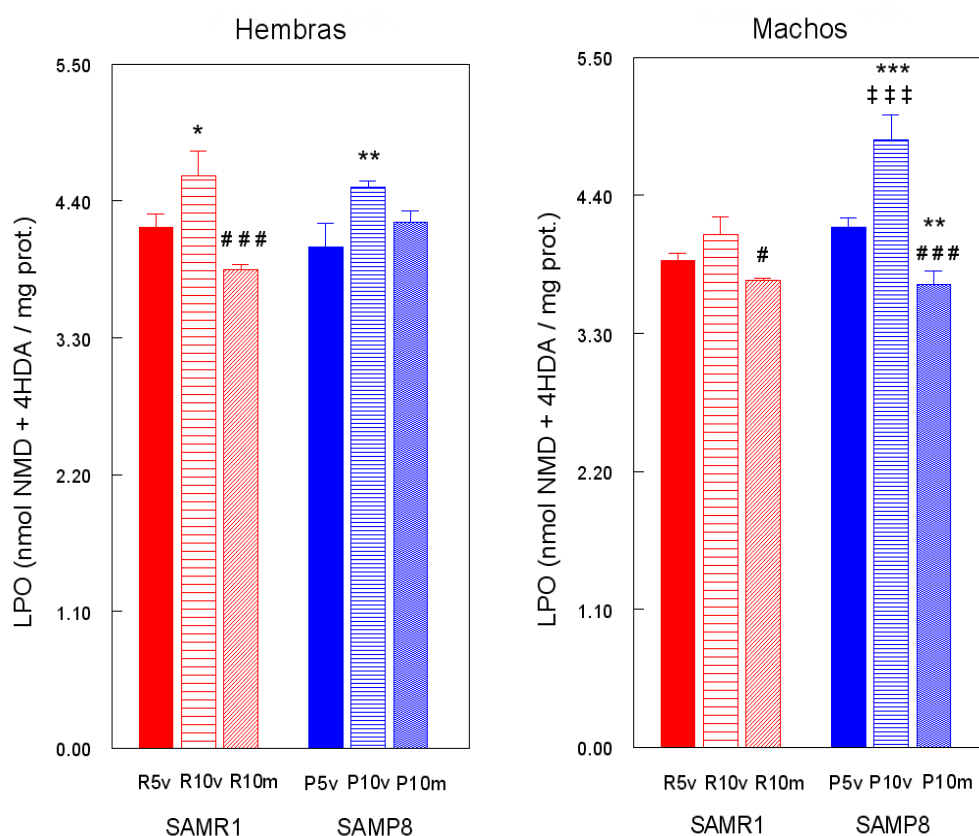


Figura 28. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre los niveles de LPO en mitocondrias de pulmón de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). A los animales se les suministró bien vehículo, (etanol al 0,066%) o bien aMT (10 mg/kg) en el agua de bebida, a partir del primer mes de vida. Fueron sacrificados 4 o 9 meses más tarde (a la edad de 5 ó 10 meses, respectivamente). Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. R5v y R10v, son ratones SAMR1 tratados con vehículo y sacrificados a la edad de 5 y 10 meses; P5v y P10v, se corresponde con animales SAMP8 tratados con vehículo y sacrificados a la edad de 5 y 10 meses; R10m y P10m, tanto SAMR1 como SAMP8, son animales tratados con aMT y sacrificados con 10 meses de vida. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v, ### $p < 0.01$ comparado con R10v o P10v y ††† $p < 0.001$ comparado con el mismo grupo de ratones SAMR1.

2.3 Efectos sobre la actividad de la enzima GPx durante el envejecimiento:

La actividad de la enzima GPx aparece en la gráfica 30. En el caso de las hembras, el grupo R10v tuvo una actividad enzimática menor ($p < 0.001$). La melatonina la restableció parcialmente ($p < 0.001$). De manera similar acontece con los SAMP8. El grupo envejecido tratado con vehículo experimentó una menor actividad que el grupo de 5 meses de edad ($p < 0.001$). La melatonina consiguió un aumento parcial de la actividad de la GPx. Con respecto a los machos, el grupo R5v mostró una actividad mayor que las hembras. El grupo R10v sufrió una pronunciada caída en la actividad de la enzima ($p < 0.001$). La

melatonina, sin embargo, elevó los valores de actividad hasta la de los ratones de 5 meses de edad ($p < 0.001$). El grupo P5v obtuvo significativos valores de menor actividad que su control R5v. En el grupo P10v se observó una disminución de la actividad similar a la mostrada por los SAMR1, pero en este caso la recuperación de la misma, aún siendo significativa, no alcanzó a la actividad del grupo de 5 meses de edad. Se observó que todos los grupos machos SAMR1 tuvieron una actividad mayor que los mismos grupos en el caso de las hembras.

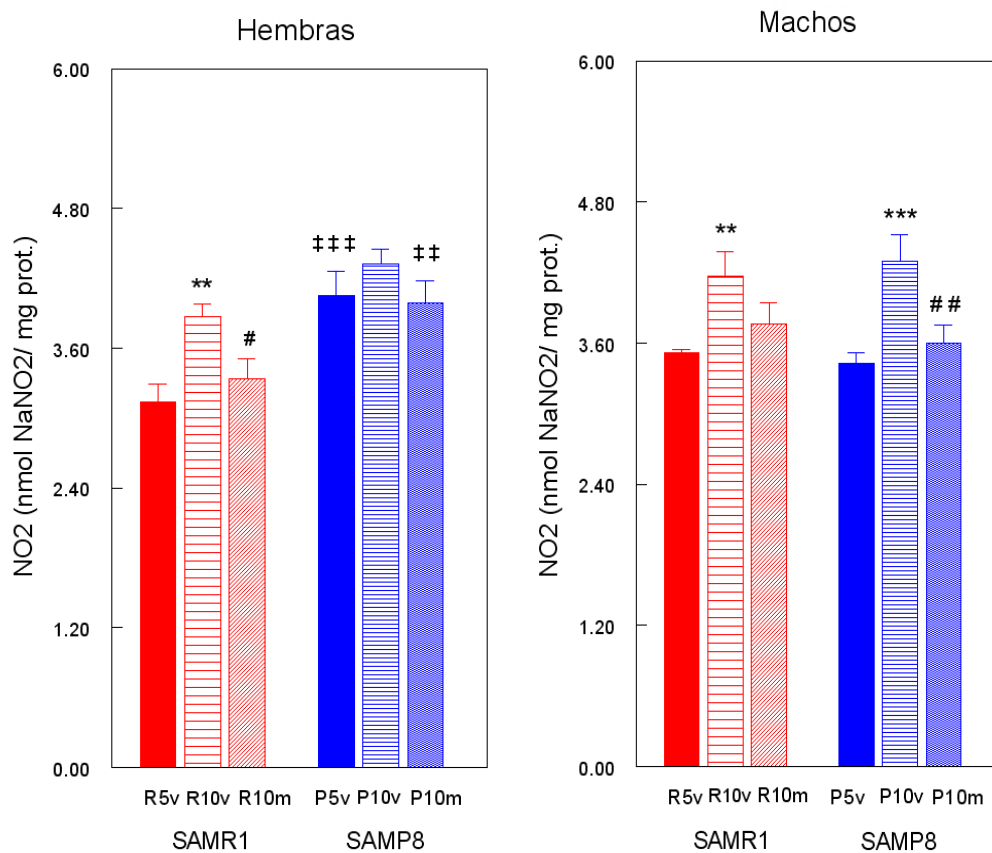


Figura 29. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre los niveles de nitritos (NO₂) en mitocondrias pulmonares de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 28 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos ± SEM, medidos por duplicado.. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$ comparados con R10v o P10v; †† $p < 0.01$ y ††† $p < 0.001$ comparados con el mismo grupo de ratones SAMR1.

2.4 Efectos sobre la actividad de la enzima GRd durante el envejecimiento:

Refiriéndonos a las hembras, la actividad de la enzima GRd (figura 31) está disminuida en el grupo R10v. La melatonina incrementa la actividad, pero no significativamente. P5v y P10v obtuvieron unos niveles de actividad menores que sus respectivos controles ($p < 0.01$). La actividad del grupo envejecido tratado con vehículo fue menor que la del grupo de 5 meses. La melatonina elevó la actividad de la GRd con gran eficacia ($p < 0.001$), sobrepasando incluso los valores registrados por el grupo de 5 meses de edad de las SAMP8 e incluso las SAMR1. En el caso de los machos, R10v mostró una actividad muy disminuida ($p < 0.001$), comparado con los R5v. La actividad es parcialmente recuperada por la administración de melatonina ($p < 0.01$). El grupo P5v mostró una caída pronunciada en la actividad enzimática. Esta actividad es restablecida ($p < 0.001$) por la aMT, superando incluso los valores del grupo de 5 meses de edad.

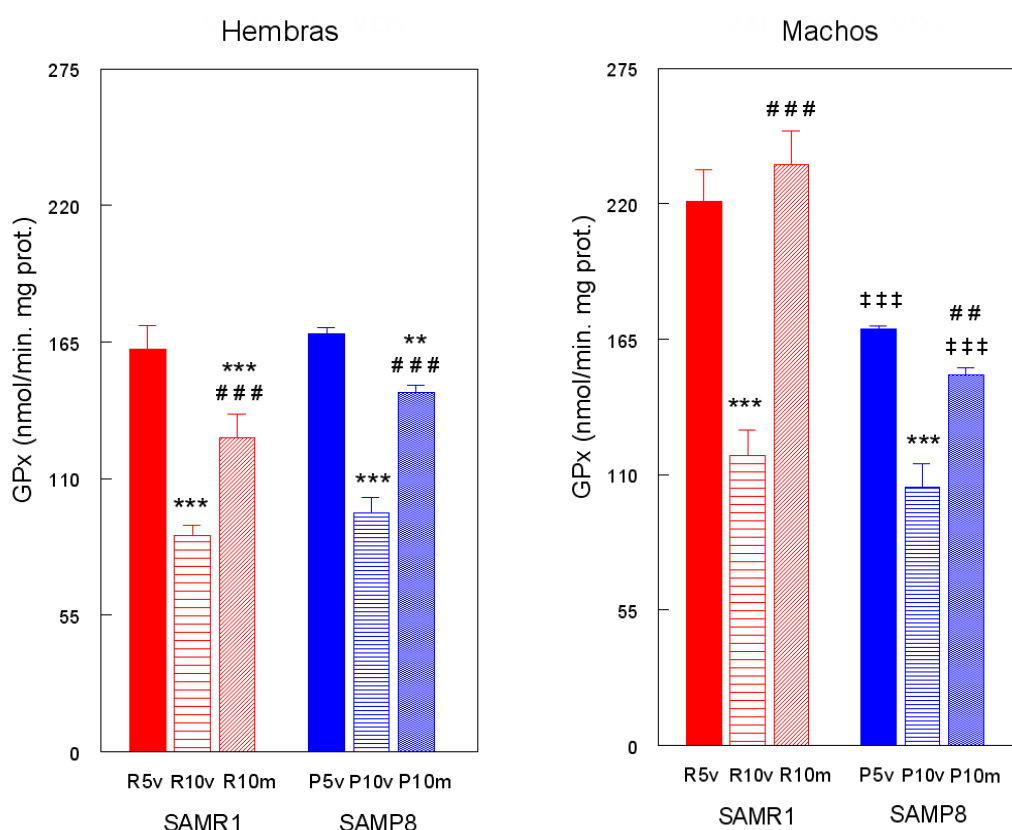


Figura 30. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre la actividad de la enzima GPx en mitocondrias de pulmón de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 28 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; # $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ comparados con R10v o P10v; ††† $p < 0.001$ comparado con el mismo grupo de ratones SAMR1.

2.5 Efectos sobre la ratio GSH:GSSG durante el envejecimiento:

La edad redujo la ratio GSH:GSSG (figura 32) en todos los grupos estudiados, tanto machos como hembras. En el caso de las hembras, la disminución fue más significativa en las SAMR1 ($p < 0.001$) que en las SAMP8 ($p < 0.01$). En las primeras, la melatonina restableció parcialmente la ratio ($p < 0.001$), mientras que en las últimas, se observó un incremento, aunque éste no fue significativo. El grupo P5v obtuvo una menor ratio que su grupo control, R5v ($p < 0.05$). En el caso de los machos, la disminución de la ratio fue mayor en los SAMP8 ($p < 0.001$) que en los SAMR1 ($p < 0.05$). En este caso, los dos grupos tratados con melatonina experimentaron un incremento de la ratio ($p < 0.001$), sobrepasando los valores de los grupos de 5 meses de edad.

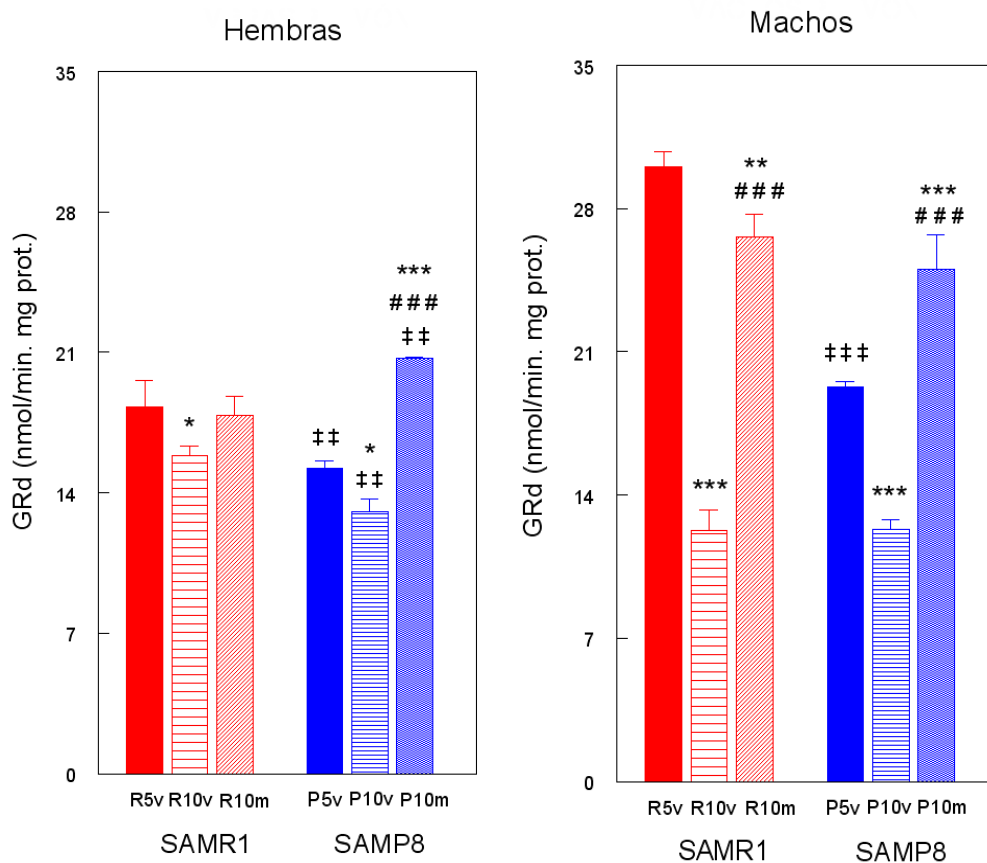


Figura 31. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre la actividad de la enzima GRd en mitocondrias pulmonares de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 28 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; ### $p < 0.001$ comparado con R10v o P10v; †† $p < 0.01$ y ††† $p < 0.001$ comparados con el mismo grupo de ratones SAMR1.

2.6 Efectos sobre la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones durante el envejecimiento:

Complejo I: La actividad del complejo I (figura 33, arriba a la izquierda) en las hembras se mostró disminuida en los grupos envejecidos tratados con vehículo, tanto los SAMR1 ($p < 0.001$) como los SAMP8 ($p < 0.01$). Tras el tratamiento con aMT, este efecto fue contrarrestado de manera significativa ($p < 0.001$) en ambos grupos, siendo la actividad incluso superior a la registrada por los grupos de 5 meses de edad. Los machos obtuvieron resultados similares. La reducción de actividad en los grupos envejecidos fue significativa ($p < 0.001$), y la melatonina elevó los valores de actividad, de manera sólo parcial en los SAMR1, y siendo más efectiva en los SAMP8, donde el complejo I alcanzó niveles de actividad similares a los ratones de 5 meses de edad.

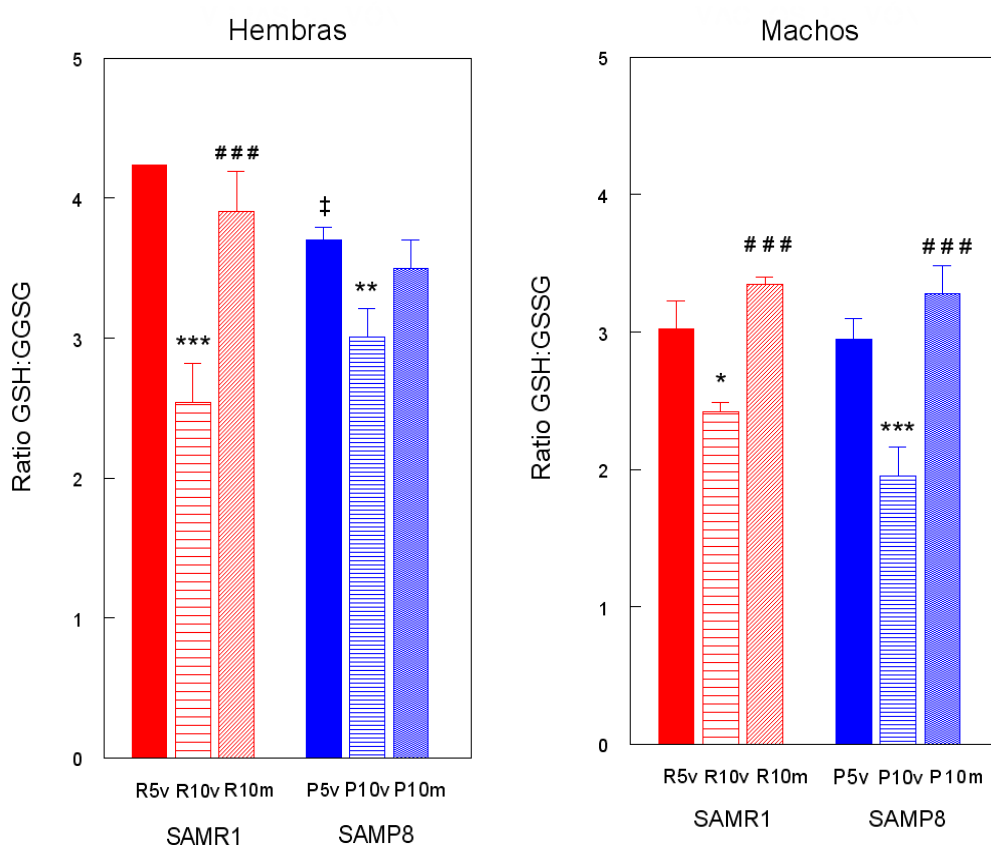


Figura 32. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre la ratio GSH:GSSG en mitocondrias pulmonares de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 28 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; ### $p < 0.001$ comparado con R10v o P10v; ‡ $p < 0.05$ comparado con el mismo grupo de ratones SAMR1.

Complejo II: La actividad del complejo II (figura 33, arriba a la derecha) en las hembras mostró que la edad no redujo su comportamiento en los SAMR1, aunque sí se observó un incremento en el grupo tratado con aMT. Los grupos P5v ($p < 0.01$) y P10v ($p < 0.001$) tuvieron una menor actividad que sus respectivos controles. Se observó una disminución en el grupo envejecido ($p < 0.01$). El tratamiento con aMT incrementó los niveles de actividad del complejo II, superando los valores del grupo de 5 meses de edad. En el caso de los machos, los SAMR1 mostraron una leve caída en la actividad del complejo II. El tratamiento con aMT no cambió esta situación. En los ratones SAMP8 se observó una reducción en la actividad del complejo del grupo P5v en comparación con el grupo R5v. En este caso, el grupo P10v evidenció una pronunciada caída en la actividad del complejo ($p < 0.001$). La melatonina contrarrestó el descenso, restaurando valores similares a los obtenidos por el grupo de 5 meses de edad.

Complejo III: En el caso del complejo III, (figura 33, abajo a la izquierda) las hembras envejecidas tratadas con vehículo tuvieron una menor actividad ($p < 0.01$) que los grupos de 5 meses de edad. La melatonina no consiguió el restablecimiento de la actividad. En las SAMP8 se vio un descenso no significativo en el grupo P10v, mientras que la actividad del complejo se redujo con el tratamiento con aMT. En los machos, se observó un descenso en la actividad no significativa en el grupo R10v. La melatonina no restauró la actividad del complejo en esta subcepa. Los SAMP8, sin embargo, sí mostraron un marcado descenso en el grupo P10v ($p < 0.001$). El tratamiento con aMT lo contrarrestó de manera significativa ($p < 0.001$).

Complejo IV: La actividad de este complejo (figura 33, abajo a la derecha) disminuyó en los grupos envejecidos tratados con vehículo, tanto en hembras como en machos, en las dos subcepas estudiadas, de manera significativa. En los grupos tratados con aMT, este efecto fue contrarrestado en todos ellos. Las hembras P10v y P10 m tuvieron una menor actividad ($p < 0.001$) que sus respectivos controles. El incremento de actividad observado en el grupo P10m no fue tan alto como el de los ratones SAMR1. En los machos SAMP8 la actividad restaurada tampoco fue tan elevada como ocurrió en los SAMR1.

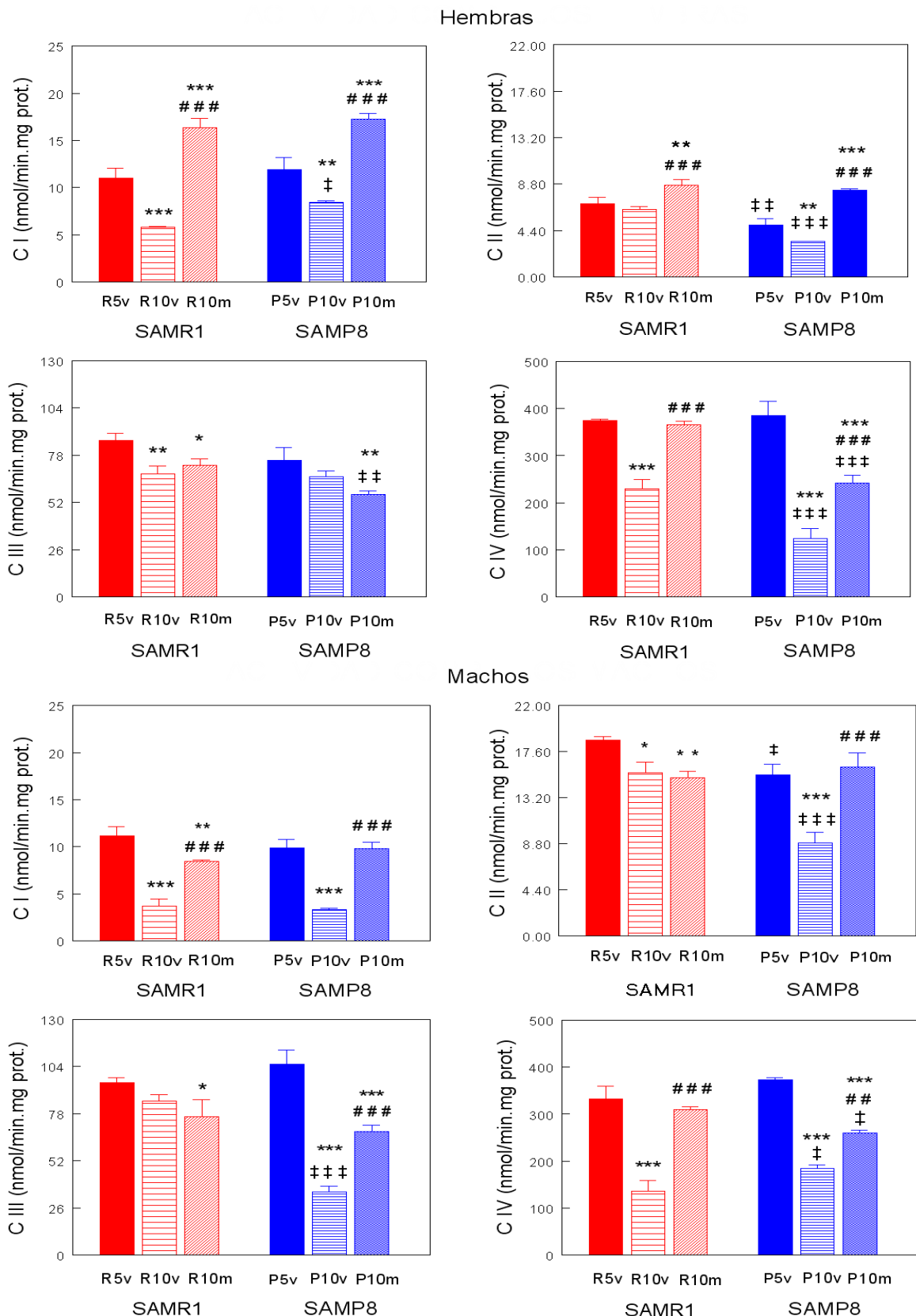


Figura 33. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre la actividad de los complejos de la ETC en mitocondrias de pulmón de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 28 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; # $p < 0.05$ y ## $p < 0.001$ comparados con R10v o P10v, † $p < 0.01$ y †† $p < 0.001$ comparados con el mismo grupo de ratones SAMR1.

2.7 Efectos sobre el contenido de ATP durante el envejecimiento:

El envejecimiento estuvo acompañado por una pérdida de contenido mitocondrial de ATP (figura 34) en las hembras SAMR1 ($p < 0.001$). El tratamiento con aMT contrarrestó esa situación de manera significativa ($p < 0.001$). En el caso de las SAMP8, los grupos de 5 meses de edad ($p < 0.001$) y el envejecido tratado con vehículo ($p < 0.05$) tuvieron menores niveles de ATP que sus respectivos controles SAMR1. A su vez, este último mostró una disminución del contenido de ATP en comparación con el primero. El tratamiento con aMT elevó la cantidad de ATP de las mitocondrias, incluso por encima del valor obtenido en el grupo de 5 meses de edad. En los machos, el grupo R10v mostró un menor contenido de ATP ($p < 0.01$) que el grupo R5v. La melatonina no cambió de manera significativa los valores de ATP en esta subcepa de ratones. En el caso de los SAMP8, tanto el grupo P5v ($p < 0.001$) como el P10v ($p < 0.01$) evidenciaron una cantidad inferior de ATP a la de sus controles, aunque no existió apenas diferencia entre ambos grupos con respecto del uno al otro. Por el contrario, el grupo P10m sí vio incrementado su contenido de ATP de manera significativa ($p < 0.001$).

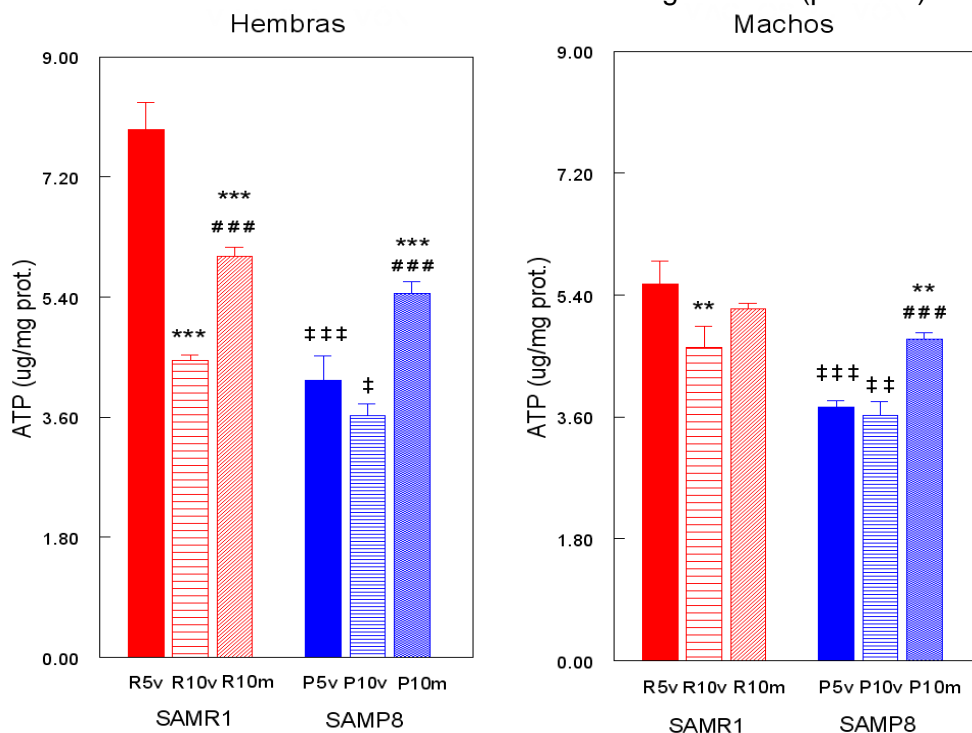


Figura 34. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre el contenido de ATP de mitocondrias cerebrales de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 28 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; ### $p < 0.001$ comparados con R10v o P10v, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ y ††† $p < 0.001$ comparados con el mismo grupo de ratones SAMR1.

2.8 Efectos sobre la ratio ATP/ADP durante el envejecimiento:

En lo referente a las hembras, la ratio ATP/ADP (figura 35) decreció de manera significativa ($p < 0.001$) en los grupos envejecidos tratados con vehículo de ambas subcepas. Igualmente, el tratamiento con aMT restauró los valores de la ratio ($p < 0.001$), obteniéndose un valor similar al obtenido por el grupo de 5 meses de edad en las SAMP8. Sólo el grupo P5v mostró una significativa ($p < 0.01$) ratio inferior a la de su control R5v. En el caso de los machos, ambos grupos envejecidos tratados con vehículo obtuvieron también una ratio menor ($p < 0.001$ en el caso de los SAMR1 y $p < 0.01$ en el caso de los SAMP8) que sus respectivos grupos de 5 meses de edad. La melatonina aumentó la ratio ATP/ADP en ambas subcepas, siendo significativo en los SAMR1 ($p < 0.01$), aunque no ocurre así en los SAMP8.

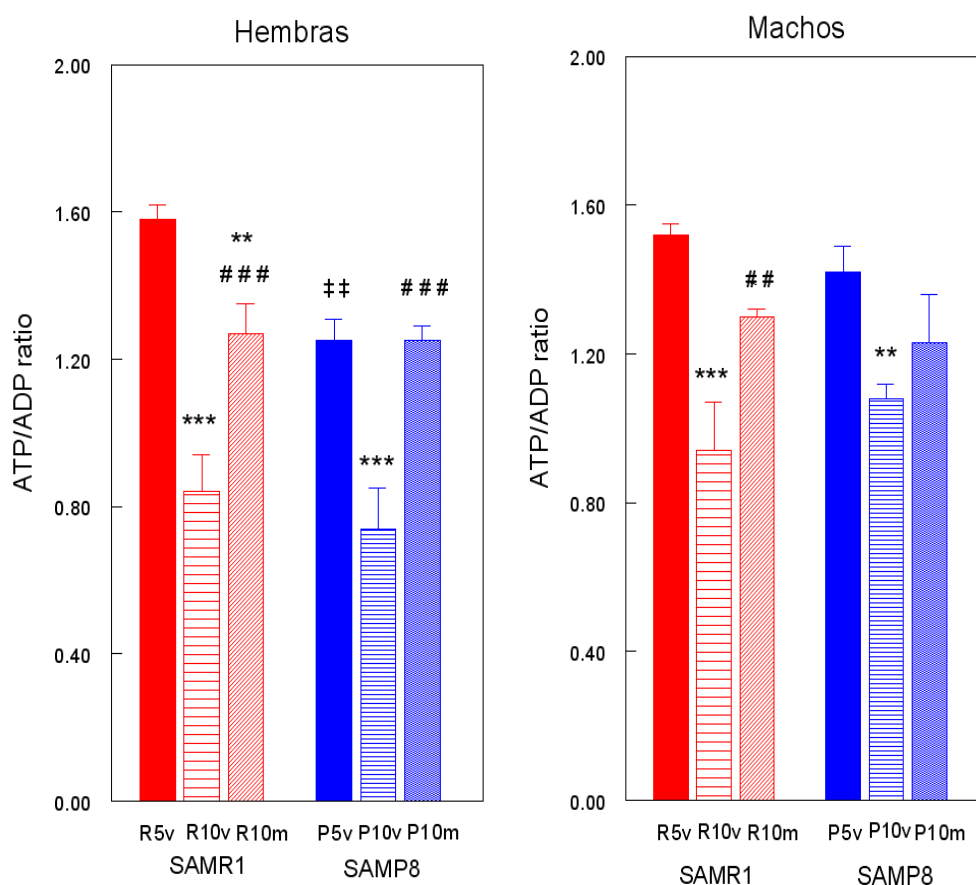


Figura 35. Efectos de la edad y del tratamiento con melatonina sobre la ratio ATP/ADP en mitocondrias cerebrales de ratones SAMR1 y SAMP8, tanto hembras (izquierda) como machos (derecha). Véase leyenda de la figura 28 para más información. Los resultados están expresados como la media de seis experimentos \pm SEM, medidos por duplicado. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados con R5v o P5v; ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ comparados con R10v o P10v, † $p < 0.01$ comparado con el mismo grupo de ratones SAMR1.

Estos resultados han sido objeto de la siguiente publicación:

Carretero M, López LC, del Pino-Zumaquero A, Doerreir C, García-Corzo L, Tresguerres JA, Acuña-Castroviejo D, Escames G. (2010) Melatonin protects against oxidative damage and ATP depletion in lung mitochondria of aged mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol.*, enviado.

Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging

Abstract: We tested whether chronic melatonin administration in the drinking water would reduce the brain mitochondrial impairment that accompanies aging. Brain mitochondria from male and female senescent prone (SAMP8) mice at 5 and 10 months of age were studied. Mitochondrial oxidative stress was determined by measuring the levels of lipid peroxidation and nitrite, glutathione/glutathione disulfide ratio, and glutathione peroxidase and glutathione reductase activities. Electron transport chain activity and oxidative phosphorylation capability of mitochondria were also determined by measuring the activity of the respiratory chain complexes and the ATP content. The results support a significant age-dependent mitochondrial dysfunction with a diminished efficiency of the electron transport chain and reduced ATP production, accompanied by an increased oxidative/nitrosative stress. Melatonin administration between 1 and 10 months of age completely prevented the mitochondrial impairment, maintaining or even increasing ATP production. There were no major age-dependent differences between males in females, although female mice seemed to be somewhat more sensitive to melatonin treatment than males. Thus, melatonin administration as a single therapy maintained fully functioning brain mitochondria during aging, a finding with important consequences in the pathophysiology of brain aging.

Miguel Carretero¹, Germaine Escames^{1,2}, Luis C. López^{1,2}, Carmen Venegas^{1,2}, José C. Dayoub^{1,2}, L. García^{1,2} and Darío Acuña-Castroviejo^{1,2,3}

¹Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada and RETICEF, Granada, Spain; ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain; ³Laboratorio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

Key words: aging, brain, mitochondria, oxidative phosphorylation, oxidative stress, respiratory chain

Address reprint requests to Darío Acuña-Castroviejo, MD, PhD, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain.
E-mail: dacuna@ugr.es

Received May 15, 2009;
accepted June 4, 2009.

Introduction

Aging is a multifactorial process that includes progressive cellular loss, endocrine and metabolic deficits, decreasing defense mechanisms and functional losses that increase the risk of death. Currently, the most tested theory that tries to explain aging is the free radical theory proposed by Harman [1]. A majority of the free radicals are produced in the mitochondria [2] because the aerobic respiration, so the hypothesis was refined and recently updated suggesting that mitochondria are the major target of free radical attack that leads to aging [3]. Free radical generation may increase as a consequence of normal and pathobiological aging. Additionally, anti-oxidative defenses may diminish in effectiveness during aging [4–6]. The result is an increase in free radicals in the intracellular environment that may accelerate cell damage; radicals attack DNA, proteins and lipids and oxidative damage accumulates over time [7, 8]. This destruction causes DNA alterations, the accumulation of protein oxidation and lipid peroxidation products [9–12], that lead to the pathophysiological changes associated with aging.

The senescence-accelerated mouse (SAM) was developed by Takeda et al. [13] as a murine model of accelerated

aging. SAM includes two strains, one prone to accelerated senescence (SAMP) and one resistant to accelerated senescence (SAMR). SAMP8, a substrain of SAMP, shows among other features, decreased learning ability, memory loss, loss of activity and early death as characteristics of accelerated aging. In the brain, SAMP8 mice have an increase in lipid peroxidation and superoxide dismutase (SOD) activity with age [14, 15]. One possible mechanism promoting accelerated aging in SAMP8 is the higher hyperoxidative status found in this strain compared with SAMR1 [16], which is used as a control for SAMP8.

Brain tissue is very vulnerable to free radical damage because of its high oxygen utilization (20% of the total oxygen inspired), high concentrations of polyunsaturated fatty acids [17] and transition metals such as iron, which is involved in the generation of the hydroxyl radical [18], and low concentrations of cytosolic antioxidants [4, 5, 19]. Oxidative modifications of mtDNA may be of central importance in normal and pathobiological aging [20]. mtDNA encodes for 13 hydrophobic polypeptide chains of four enzyme complexes of the inner mitochondrial electron transport chain involved in oxidative phosphorylation [21]. A persistent attack by toxic oxygen and nitrogen-based species leads to an accumulation of mutations in mtDNA, which is relatively unprotected in

Carretero et al.

comparison to nuclear DNA, and this causes a decline in oxidative phosphorylation as a result of age-related oxidative damage [20].

Glutathione (GSH) is the predominant antioxidant in the brain that is present at millimolar concentrations [22]. Melatonin, a secretory product of the pineal gland, is a ubiquitously acting direct free radical scavenger and also an indirect antioxidant [23, 24]. Melatonin, as well as its metabolites are efficient in detoxifying reactive oxygen species (ROS), e.g., HO[•] [25] and H₂O₂ [26], and they also interact directly with reactive nitrogen species (RNS) [27–30]. Melatonin also stimulates a host of antioxidative enzymes including SOD, glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GRd); these actions further reduce the oxidation state of cells [23, 31]. Recently accumulated evidence suggests that melatonin plays a protective role in both initial and advanced stages of conditions where the pathogenesis involves damage by ROS and RNS [32–34]. Some antioxidants, mainly melatonin, have been reported to increase survival of SAMP8 mice [10, 35], as there is an age-dependent reduction in endogenous melatonin production in SAMP8 mice [36] and given that melatonin is also readily available to the brain after oral ingestion [37], the use of melatonin to reduce age-deferring brain mitochondrial dysfunction also seems feasible.

Materials and methods

Reagents

N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, ethylene glycol-bis-(2-amino ethylether)-*N,N'*-tetraacetic acid (EGTA), ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA), Hepes, bovine serum albumin (BSA), Percoll, sulfanilamide, phosphoric acid, 1,4-dithio DL-threitol, NADPH, methanesulfonic acid, disulfide and reduced glutathione, GRd, 5-sulfosalicylic acid, 2-vinylpyridine, cumene hydroperoxide, 5,5-dithiolbis (2-nitrobenzoic acid) and mannitol were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). All other reagents were of the highest purity available.

Animals and treatments

Male and female SAMP8 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 7 hr) at 22 ± 2°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 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 separated into the following groups (n = 35 animals/group): (i) P5v group, consisting of SAMP8 animals treated with vehicle from 1 to 5 months of age; (ii) P10v group, included SAMP8 mice treated with vehicle from 1 to 10 months of age; and (iii) P10m group, included 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 body weight. During the months of treatment. The concentration of ethanol in the final solution was 0.066%. A fresh melatonin and vehicle solutions were prepared twice a week. 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 treatment period, i.e., 5 and 10 months, and their brains were quickly removed and immediately processed for pure mitochondria preparation.

Isolation of brain mitochondria

Animals were killed by cervical dislocation and brain mitochondria were immediately isolated [38]. All procedures were carried out at 0–4°C. Briefly, the brain was excised, washed with buffer A (0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, at 4°C), and homogenized (1/10, w/v) in buffer A at 500 rpm with a Teflon pestle. The homogenate was centrifuged at 1300 g for 3 min at 4°C. The pellet was suspended in 5 mL buffer A, and centrifuged again at 1300 g for 3 min at 4°C. The supernatants were mixed and centrifuged at 21,200 g for 10 min at 4°C. Then, the mitochondrial pellets were suspended in 1 mL buffer A containing 15% Percoll and poured in ultracentrifuge tubes containing 1 mL buffer B (225 mM mannitol, 1 mM EGTA, 25 mM Hepes and 0.1% BSA, and pH 7.4, 4°C) with 23% Percoll and 1 mL buffer B with 40% Percoll. The mixture was centrifuged at 63,000 g for 30 min at 4°C. The pure mitochondrial fraction (the band between 23% and 40% Percoll) was collected, washed twice with buffer A at 10,300 g 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 brain mitochondria without BSA [39].

Lipid peroxidation (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 [39] or used for LPO measurements. A commercial LPO assay kit that estimated both malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals was used (Bioxytech LPO-568 assay kit; OxisResearch, Portland, OR, USA) [40]. LPO concentration is expressed in nmol/mg prot.

Nitrite determination

Mitochondrial fractions were thawed, suspended in ice-cold distilled water, and immediately sonicated to break mitochondrial membranes. Aliquots of these samples were either stored at –80°C for total protein determination [39] or used to calculate nitrite levels. The amount of nitrite was measured following the Griess reaction [41] by incubating 100 µL samples with 100 µL Griess reagent (0.1% *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride; 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid; 1:1) at room temperature for 20 min. The absorbance at 550 nm was measured and

nitrite concentrations were calculated by comparison with the absorbance of a standard solution of known sodium nitrite concentration, and expressed as nmol/mg prot.

Measurements of GPx and GRd activities

Mitochondrial fractions were thawed and suspended in 200 μ L of buffer A (potassium-phosphate 50 mM and EDTA-K2 1 mM, pH 7.4) and sonicated. To measure GPx activity, 10 μ L of each sample were added to 240 μ L 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 μ L of cumene hydroperoxide (0.3%) and the GPx activity was determined spectrophotometrically following the oxidation of the NADPH for 3 min at 340 nm (UV-1603 spectrophotometer; Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany) [42]. GRd activity was measured in samples (35 μ L) added to 465 μ L of a working solution containing buffer A plus 2 mM oxidized glutathione (GSSG). After incubation for 4 min at 37°C, the reaction was started by adding 8.5 μ L of 9.5 mM NADPH solution, and the GRd activity was spectrophotometrically measured following the oxidation of NADPH for 3 min at 340 nm. GPx and GRd activities are expressed as nmol/min/mg prot. In both cases, nonenzymatic NADPH oxidation was subtracted from the overall rates.

Measurement of GSH and GSSG

Both GSH and GSSG were measured by a slight modification of an established fluorometric method [43]. Mitochondrial fractions were desproteinized with ice-cold 10% trichloroacetic acid and centrifuged at 20,000 g for 15 min. For GSH measurement, 10 μ L supernatant was incubated with 10 μ L of an ethanol ophthalaldehyde solution (1 mg/mL) and 180 μ L 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 emission in a plate-reader spectrofluorometer (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). For GSSG measurement, 30 μ L aliquots of supernatants were preincubated with 12 μ L *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 μ L were then incubated with 10 mL ophthalaldehyde solution and 145 μ L 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 μ L 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 [39]. 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 μ M decylubiquinone, 0.8 μ M 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 mM) at 340 nm in a UV-1603 Shimadzu spectrophotometer [44]. The activity of complex II (succinate: 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) oxidoreductase, 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 [45]. 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 μ M KCN, 50 μ M rotenone and 2 μ M 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 [45]. 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 [45].

Measurement of mitochondrial content of adenine nucleotides

Adenine nucleotides were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with a ProPac PA1 column (4 \times 250 mm: Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) and a binary gradient of 0.3 M ammonium carbonate and water [46]. 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 25,000 g for 15 min at 2°C to precipitate proteins. Pellets were frozen to -80°C to determine protein concentration [39] and the supernatants were mixed with 8 μ L 5 M potassium carbonate to neutralize the acid and centrifuged at 12,000 g 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 [46]. 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) was used for

Carretero et al.

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. Mitochondrial content of nucleotides is expressed in $\mu\text{g}/\text{mg prot.}$

Statistical analysis

Results are presented as means \pm S.E.M. 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 <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Figure 1 (upper) shows the changes in brain mitochondrial LPO levels in SAMP8 male and female mice at 5 and 10 months of age. Although at 5 months of age the levels of LPO were significantly higher in females than in males ($P < 0.01$), the age-dependent increase in LPO yield

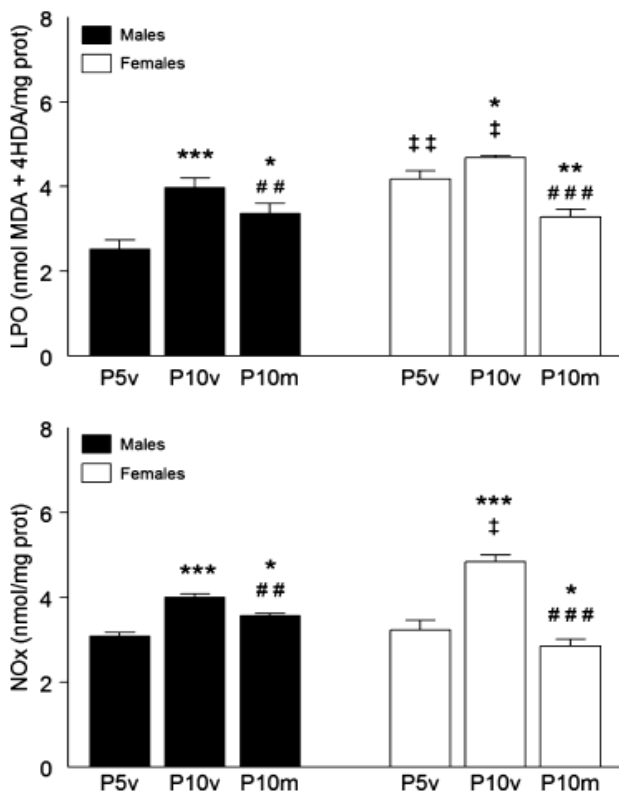


Fig. 1. Effect of age and melatonin treatment on lipid peroxidation (upper) and nitrite (bottom) levels in brain mitochondria from male and female senescent accelerated prone (SAMP8) mice. Animals were given vehicle (0.066% ethanol) or melatonin (10 mg/kg) in the drinking water from 1 month after birth, and killed 4 or 9 months later (at 5 and 10 months of age, respectively). Results are expressed as a mean \pm S.E.M. of six experiments measured in duplicate. P5v and P10v, SAMP8 mice treated with vehicle and killed at 5 and 10 months of age; P10m, SAMP8 animals treated with melatonin and killed at 10 months of age. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 versus P5v; ##*P* < 0.01 and ###*P* < 0.001 versus P10v; †*P* < 0.05 and ††*P* < 0.01 versus male respective group.

similar levels in males and females at the age of 10 months. In both cases, melatonin treatment significantly reduced the age rise in LPO.

Nitrite levels in brain mitochondria were similar in male and female mice at 5 months of age (Fig. 1, bottom). Age induced a significant increase in nitrite levels and, at the age of 10 months, the levels of nitrite were significantly higher in females than in males ($P < 0.05$). In both mouse genders melatonin treatment prevented the effect of age on the nitrite increase.

Age-dependent changes in the brain mitochondrial GPx and GRd activities are shown in Fig. 2. At the age of 5 months, male and female mice showed comparable GPx activity that was significantly reduced at 10 months of age (Fig. 2, upper). Melatonin treatment did not only prevent the age-dependent reduction in GPx activity, but also increased it over the values found at 5 months of age in both mice gender ($P < 0.01$). The changes in GRd activity with age and melatonin treatment resembled those in GPx (Fig. 2, bottom).

The age-dependent mitochondrial oxidative stress was further demonstrated by the significant reduction in the GSH/GSSG ratio, mainly in female mice (Fig. 3, $P < 0.001$). Chronic melatonin treatment prevented absolutely the age-dependent oxidative stress in brain

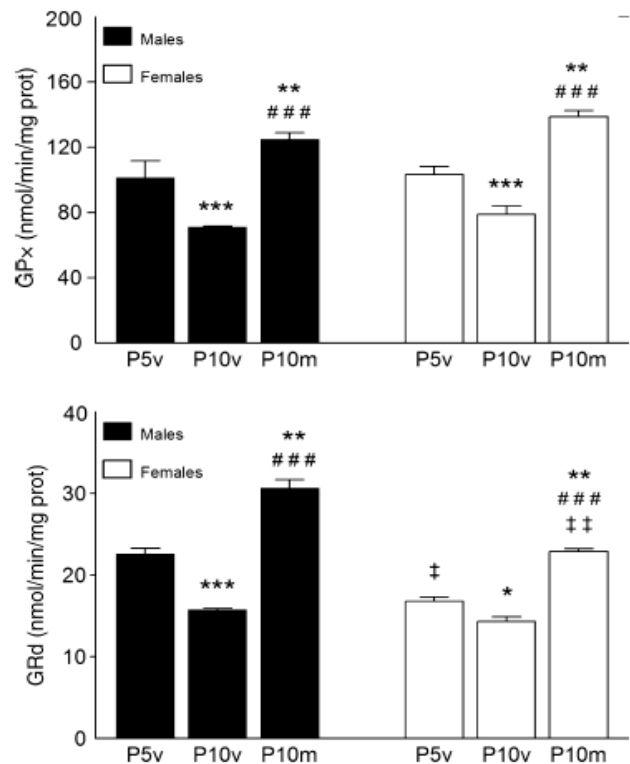


Fig. 2. Effect of age and melatonin treatment on glutathione peroxidase (GPx, upper) and reductase (GRd, bottom) activities in brain mitochondria from male and female senescent accelerated prone (SAMP8) mice. See legend of Fig. 1 for additional information. **P* < 0.05, ***P* < 0.05 and ****P* < 0.001 versus P5v; ###*P* < 0.001 versus P10v; †*P* < 0.05 and ††*P* < 0.01 versus male respective group.

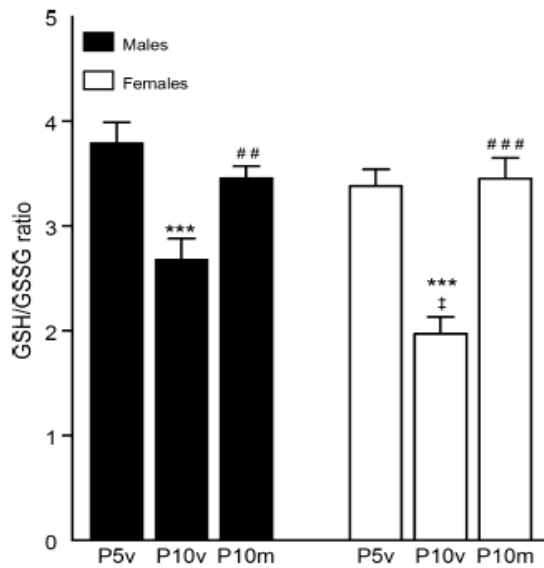


Fig. 3. Effect of age and melatonin treatment on the glutathione/oxidized glutathione ratio in brain mitochondria from male and female senescent accelerated prone (SAMP8) mice. See legend of Fig. 1 for additional information. *** $P < 0.001$ versus P5v; ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus P10v; † $P < 0.05$ versus male respective group.

mitochondria as assessed by the recovery of the GSH/GSSG ratio in male and female mice.

The activity of the respiratory complexes is shown in Fig. 4. At 5 months of age, the activity of complex I is lower in females than in males (Fig. 1, upper left, $P < 0.05$). Aging induced a significant decrease in the activity of complex I in both groups of mice, but maintained the difference in its activity between males and females. In both genders, melatonin treatment prevented the age-dependent inhibition of complex I activity. Complex II activity was lower in males than in females at

5 months of age (Fig. 4, upper right, $P < 0.01$), and it decreased significantly at the age of 10 months, but maintained the male–female difference. Melatonin administration increased the activity of complex II over the levels found at 5 months of age, thus preventing absolutely the effects of age on the activity of this complex. Regarding complex III activity, it was similar in both genders at 5 months of age, decreasing in a larger extend in females (Fig. 4, bottom left, $P < 0.05$). In this case, melatonin increased significantly the activity of complex III, reaching values significantly higher than those measured at the age of 5 months. Melatonin only induced minor changes in the activity of complex III in males, which showed little changes during aging. Complex IV activity (Fig. 4, bottom right) remained unmodified in male mice either as a results of age or melatonin treatment. In females, however, the activity of complex IV increased significantly with melatonin administration ($P < 0.001$), although it was not affected by age.

Figure 5 shows the brain mitochondrial steady-state levels of ATP and the ATP/ADP ratio. The ATP content was similar in males and females at the age of 5 months (Fig. 5, upper), and significantly decreased with age ($P < 0.001$). Chronic melatonin administration prevented totally the effects of age, and increased the ATP content in mitochondria from female mice over its concentration at 5 months. The ATP/ADP ratio showed parallel changes to those of ATP (Fig. 5, bottom).

Discussion

The present study documents the existence of a significant age-dependent mitochondrial oxidative phosphorylation impairment in brains of SAMP8 mice, without major gender differences. Significant rises in both oxidative and nitrosative stress were also found in aged brain mitochondria, which might account for the bioenergetic failure of these organelle in aging animals. Thus, the brains of SAMP8 mice are exposed to a high oxidative stress

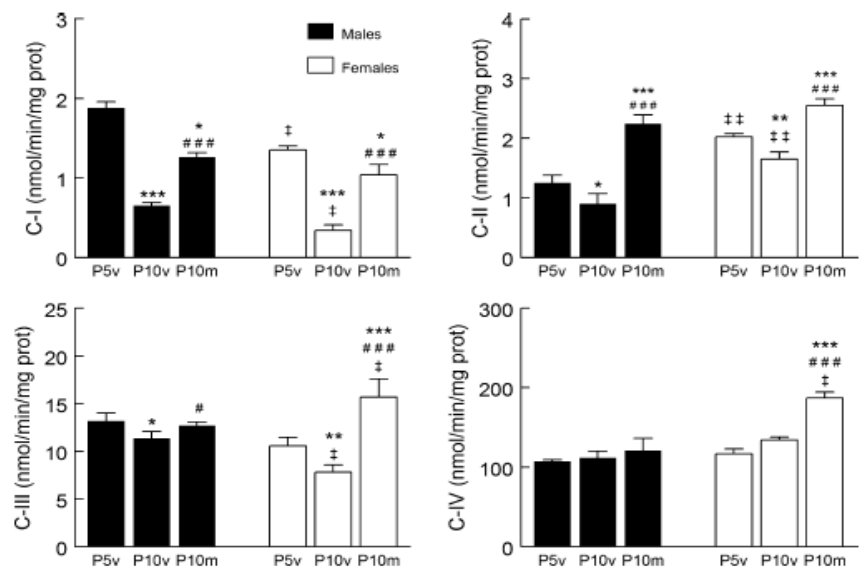


Fig. 4. Effect of age and melatonin treatment on the complex I (upper left), II (upper right), III (bottom left) and IV (bottom right) activities in brain mitochondria from male and female senescent accelerated prone (SAMP8) mice. See legend of Fig. 1 for additional information. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus P5v; # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ compared with P10v; † $P < 0.05$ and †† $P < 0.01$ versus male respective group.

Carretero et al.

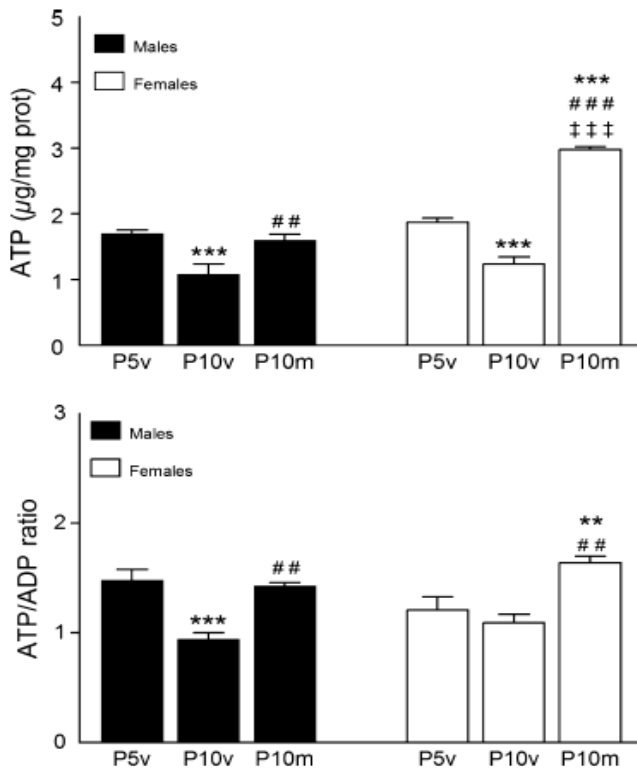


Fig. 5. Effect of age and melatonin treatment on the ATP content (upper) and the ATP/ADP ratio (bottom) in brain mitochondria from male and female SAMP8 mice. See legend of Fig. 1 for additional information. $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ versus P5v; $^{##}P < 0.01$ and $^{###}P < 0.001$ versus P10v; $^{†††}P < 0.001$ versus male respective group.

during aging that may be a cause of senescence-related impairments and degeneration in the brains of SAMP8 mice [47–50]. Another interesting result was the efficacy of chronic melatonin administration, which completely prevented the mitochondrial oxidative/nitrosative stress along the age, maintaining the oxidative phosphorylation and, thus, the ATP levels in values compatibles with those found in young animals.

Several cellular features of the brain suggest that it is highly sensitive to oxidative stress. The present results suggest that SAMP8 mice are exposed to elevated levels of oxidative stress at the age of 10 months, and this phenomenon may be an important factor involved in the senescence-related impairment and degeneration in the brain. Oxidative stress in the brain occurs when the generation of ROS exceeds the ability of the endogenous antioxidant system to remove excess ROS subsequently leading to cellular damage. The presence of oxidative stress in brain mitochondria should cause changes in LPO and GSH and, if ROS damage is prolonged; also changes should occur in enzymes of the redox cycle of GSH [31]. Our data show a significant increase in LPO levels in cerebral mitochondria with age, reflecting the oxidative damage to the lipids of the mitochondria membrane during aging [51], even at an early age [52]. Males had lower levels of LPO than females, but age disrupted this difference. Melatonin prevented mito-

chondrial LPO in both genders of mice, supporting previous data on brain LPO [53]. Due to the lipophilicity of melatonin, it is accumulated by the mitochondria at high concentrations [54], allowing its interaction with mitochondrial membranes [55], possibly locating near the polar heads of membrane phospholipids [56]. In this location, melatonin may easily protect brain mitochondrial membranes from free radical attack, stabilizing them [57].

In brain, GSH is major intracellular and, thus, mitochondrial antioxidant [58]. Mitochondria do not possess the ability to synthesize GSH, but they can regulate the GSH redox cycle through GPx and GRd. GPx transforms H_2O_2 into water. In this process, GSH is oxidized to GSSG and the enzyme GRd restores reduced GSH levels. The redox status of a tissue is mainly reflected by the ratio GSH/GSSG [59, 60]. Under normal conditions, a low oxidant load and a high biosynthetic activity are associated with high GSH levels. Thus, the higher reduction in the GSH/GSSG ratio at 10 months of age in female than in male SAMP8 here reported reflects a higher oxidizing tendency of the brain mitochondria due to higher ROS production in the former [61]. Melatonin administration prevented the drop in the GSH/GSSG ratio during aging in both mice gender, which means that these mitochondria were able to maintain a low oxidant status during aging. The ability of melatonin to prevent GSH loss with age probably reflects its effect on the activities of the GSH redox cycle enzymes [31]. In this regard, GPx and GRd activities decreased significantly with age in SAMP8 mice; consequently, brain mitochondria recovered the normal mitochondrial GSH pool, reducing the GSH/GSSG ratio. In these conditions, melatonin treatment did not only prevent but even increased the activity of both enzymes over their activities in young animals. As a result of melatonin's effects, the GSH redox cycle worked properly during aging, yielding a normal pool of GSH to brain mitochondria that, in turn, were totally protected against age-related ROS production. These data are similar to those obtained in mitochondria from other mouse tissues [35, 53, 62], suggesting that melatonin exerts a widespread effect whenever ROS production exceeds from the ability of the antioxidant defenses.

Mitochondria also produce nitric oxide (NO^*) and NO-related radicals (RNS) including NO^* and $ONOO^-$. NO^* is formed by the oxidation of the guanidinic nitrogen of L-arginine by nitric oxide synthase (NOS). Mitochondria possess their own enzymatic machinery for producing NO^* . In fact, both constitutive (c-mtNOS) and inducible (i-mtNOS) NOSs isoforms are present in the mitochondria, which produced NO^* for regulatory purposes [63, 64]. However, increasing mitochondrial levels of NO^* inhibit the activity of complexes IV, III and I [63, 65, 66]. This occurs in inflammatory situations in which iNOS/i-mtNOS are induced yielding large amounts of NO^* [34, 63, 66, 67]. In these conditions, NO^* reacts with $O_2^{\cdot-}$ forming $ONOO^-$, a highly toxic compound that may damage irreversibly all respiratory complexes and other proteins and lipids [68, 69]. Moreover, the reaction of $ONOO^-$ with CO_2 accounts for a large fraction of the $ONOO^-$ formed in vivo, and the reaction produces reactive intermediates such as nitrite that can affect other biotargets in secondary reactions [65]. Thus, nitrite levels accurately reflect the nitrosative stress status that is

caused by inflammation. Our data reflect the age-dependent nitrosative status in brain mitochondria that was prevented by melatonin administration. Whether these increased nitrite levels were produced by the mitochondrial i-mtNOS, reflecting the chronic inflammatory process that come with aging, remain to be clarified. In fact, some data suggest that brain mtNOS is the most profoundly reduced enzymatic activity during aging, which may account for a decreased NO[•] levels [70]; other authors suggest that aging increases the iNOS/i-mtNOS induction and thus, NO[•] levels and the inflammatory response [63, 71]. Our results support the latter suggestion. Probably, at an age older than 10 months the activity of mitochondrial NOS may be reduced in SAMP8, collaborating in an additional aging phenomenon, i.e., the reduction in mitochondrial biogenesis [70].

Our study also reported a significant impairment of the mitochondrial respiratory chain activity with age, suggesting a dysfunction in mitochondrial oxidative phosphorylation in the aging brain [72]. The activity of complexes I, II and III decreased in male and female mice, although the latter showed a greater reduction than the former. It was shown that the mitochondrial content of rat brain is not reduced in aging; thus, decreased rates of electron transfer by the diminished activities of complexes I, II and III are the main cause of the mitochondrial dysfunction with age [73]. The mitochondrial accumulation of ROS in the brain mitochondria, with the consequent damage to phospholipids, proteins and mtDNA, also accounts for the respiratory chain impairment with age. In turn, increased oxidative stress in the aged brain has been attributed to reduced efficiency of mitochondrial energy production [74]. Collectively, these defects cause a reduced capacity of brain mitochondria to produce ATP by oxidative phosphorylation. The mitochondrial impairment with age is not an irreversible process; on the contrary, we show here that melatonin administration can prevent mitochondrial dysfunction maintaining full activity of brain mitochondria in aged mice. Although the effects of melatonin on the respiratory chain activity are not new [31], we showed here for the first time that melatonin reduced the age-dependent bioenergetic impairment of brain mitochondria, which maintained a normal ATP production during aging. Moreover, female mice seemed to be more sensitive to melatonin than males, increasing their capacity to produce ATP over the latter. The effects of melatonin on brain mitochondria are of great relevance because brain tissue contains a relatively poor antioxidant defense system and thus, the age-dependent decay in melatonin production may be of major importance for brain aging.

Overall, the current results support the view that at the age of 10 months, male and female SAMP8 mice exhibit a mitochondrial oxidative/nitrosative stress and impairment with age, with minor differences between genders. Thus, the antioxidative and neuroprotective roles of estrogens elsewhere reported [75] seem to be insufficient to exert any significant effect until 10 months of age in this mouse strain. On the other hand melatonin, with antioxidant and anti-inflammatory well documented actions [24–26, 28–30, 62, 76, 77] showed marked beneficial effects against brain mitochondrial dysfunction with age. These effects, and the fact that melatonin virtually lacks toxicity even at large

doses [78–80], supports its clinical use in preventing the impairments of aging.

Acknowledgments

This study was partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (G03/137, RD06/0013/0008, PI08-1664), and from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P07-CTS-03135 and CTS-101). The authors thanks to Araceli Puertas and Ana Fernández for their technical assistance.

References

1. HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; **11**:298–300.
2. CHANCE B, SIES H, BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; **59**:527–605.
3. MIQUEL J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 1998; **33**:113–126.
4. FLOYD RA, CARNEY JM. The role of metal ions in oxidative processes and aging. *Toxicol Ind Health* 1993; **9**:197–214.
5. REITER RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995; **9**:526–533.
6. REITER RJ, ACUÑA-CASTROVIEJO D, TAN DX et al. Free radical mediated molecular damage: mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 2001; **939**:200–215.
7. LEVINE RL, STADTMAN ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 2001; **36**:1495–1502.
8. SHOAL RS, MOCKETT RJ, ORR WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**:575–586.
9. KEHRER JP. Free radicals: a mediator of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; **23**:21–48.
10. SELL DFR, LANE NA, JOHNSON WA et al. Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**:485–490.
11. BECKMAN KB, AMES BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; **78**:547–581.
12. SHRINGARPURE R, DAVIES KJ. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; **32**:1084–1089.
13. TAKEDA TM, HOSOKAWA M, TAKESHITA S et al. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 1981; **17**:183–194.
14. TAKEDA TM. Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging* 1999; **20**:105–110.
15. MIYAMOTO M, KIYOTA Y, YAMAKAZI A et al. Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol Behav* 1986; **38**:399–406.
16. HOSOKAWA M. A higher oxidative status accelerates senescence and aggravates age-dependant disorders in SAMP8 strains of mice. *Mech Ageing Dev* 2002; **123**:1553–1561.
17. FLOYD RA, HENSLEY K. Oxidative stress in braing aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 2002; **23**:795–807.
18. HILL JM, SWITZER RC. The regional distribution and cellular localization of iron in rat brain. *Neuroscience* 1984; **11**:595–603.

Carretero et al.

19. DROGE W. Oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol* 2003; **543**:191–200.
20. MIQUEL J. An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell ageing. *Mutat Res* 1991; **275**:209–216.
21. TZAGALOFF A, MYERS AM. Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annu Rev Biochem* 1986; **55**:249–285.
22. SANCHEZ-MORENO C, DORFMAN SE, LICHTENSTEIN AH et al. Dietary fat type affects vitamins C and E and biomarkers of oxidative status in peripheral and brain tissues of golden Syrian hamsters. *J Nutr* 2004; **134**:655–660.
23. ANTOLIN I, RODRIGUEZ C, SAIN RM et al. Neurohormone melatonin prevents damage: effect on gene expression for antioxidative enzymes. *FASEB J* 1996; **10**:882–890.
24. 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.
25. TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B et al. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; **1**:57–60.
26. TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 2000; **29**:1177–1185.
27. GUENTHER AL, SCHMIDT SL, LAATSCH H et al. 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. HARDELAND R, BACKHAUS C, FADAVI A. Reactions of the NO redox forms NO \neq , *NO and HNO (protonated NO \neq) with the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine. *J Pineal Res* 2008; **43**:382–388.
29. TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP et al. One molecule, many derivatives: a nerver ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; **42**:28–42.
30. PEYROT F, DUCROCQ C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 2008; **45**:235–246.
31. MARTIN M, MACIAS M, ESCAMES G et al. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000; **14**:1677–1679.
32. ACUÑA-CASTROVIEJO D, MARTIN M, MACIAS M et al. Melatonin, mitochondria and celular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; **30**:65–74.
33. ACUÑA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G, CARAZO A et al. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem* 2002; **2**:133–151.
34. ESCAMES G, ACUÑA-CASTROVIEJO D, LÓPEZ LC et al. Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock. *J Pharm Pharmacol* 2006; **58**:1153–1165.
35. RODRÍGUEZ I, ESCAMES G, LÓPEZ LC et al. Improved mitochondrial function and increased life span after chronic melatonin treatment in senescent prone mice. *Exp Gerontol* 2008; **43**:479–756.
36. LARDONE PJ, ALVAREZ-GARCÍA 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.
37. LAHIRI DK, GE YW, SHARMAN EH et al. Age-related changes in serum melatonin in mice: higher levels of combined melatonin and 6-hydroxymelatonin sulfate in the cerebral cortex than serum, heart, liver and kidney tissues. *J Pineal Res* 2004; **36**:217–223.
38. RICE JE, LINDSAY JG. Subcellular fractionation of mitochondria, In: *Subcellular Fractionation*, Graham JM, Rickwood D, eds. Oxford University Press, New York, 1997; pp. 107–142.
39. LOWRY OH, ROSENBOUGH NJ, FARR AL et al. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**:265–275.
40. ESTERBAUER H, CHEESEMAN KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; **186**:407–421.
41. GREEN LC, RUIZ DE LUZURIAGA K. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**:7764–7768.
42. GRIFFITH OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999; **27**:22–935.
43. HISSIN PJ, HILF R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; **74**:214–226.
44. BARRIENTOS A. In vivo and in organelle assessment of OXPHOS activities. *Methods* 2002; **26**:307–316.
45. BRUSQUE AM, ROSA RB, SCHUCK PF et al. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* 2002; **40**:593–601.
46. KRAUSS GJ, PISSAREK M, BLASING I. HPLC of nucleic acid components with volatile mobile phases: part 2. Separations on polymeric supports. *J High Res Chromatogr* 1997; **20**:693–696.
47. GUTIÉRREZ-CUESTA J, SUREDA FX, ROMEU M et al. Chronic administration of melatonin reduces cerebral injury biomarkers in SAMP8. *J Pineal Res* 2007; **42**:394–402.
48. CABALLERO B, VEGA-NAREDO I, SIERRA V et al. Melatonin alters cell death processes in response to age-related oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2009; **46**:106–114.
49. GUTIÉRREZ-CUESTA J, TAJES M, JIMÉNEZ A et al. Evaluation of potential pro-survival pathways regulated by melatonin in a murine senescence model. *J Pineal Res* 2008; **45**:497–505.
50. DEL VALLE J, DURAN-VILAREGUT J, MANICH G et al. Time-course of blood-brain barrier disruption in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *Int J Dev Neurosci* 2009; **27**:47–52.
51. 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.
52. YASUI F, ISHIBASHI M, MATSUGO S et al. Brain lipid hydroperoxide level increases in senescence-accelerated mice at an early age. *Neurosci Lett* 2003; **350**:66–68.
53. OKATANI Y, WAKATSUKI A, REITER RJ et al. Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging* 2002; **23**:639–644.
54. LÓPEZ A, GARCÍA JA, ESCAMES G et al. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 2009; **46**:188–198.
55. COSTAEJ, SHIDA CS, BIAGGI MH et al. How melatonin interacts with lipid bilayer: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. *FEBS Lett* 1997; **416**:103–106.
56. REBRIN I, ZICKER S, WEDEKIND KJ et al. Effect of antioxidant-enriched diets on glutathione redox status in tissue

- homogenates and mitochondria of the senescence-accelerated mouse. *Free Radic Biol Med* 2005; **39**:549–557.
57. JOU MJ, PENG TI, YU PZ et al. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *J Pineal Res* 2007; **43**:389–403.
58. DRINGEN R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progr Neurobiol* 2000; **62**:649–671.
59. DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; **82**:47–95.
60. JONES DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol* 2002; **348**:93–112.
61. 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.
62. RODRÍGUEZ MI, ESCAMES G, LÓPEZ LC et al. Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2007; **42**:272–279.
63. 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.
64. ACUÑA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G, LÓPEZ LC et al. Melatonin and nitric oxide: two required antagonists for mitochondrial homeostasis. *Endocrine* 2005; **27**:159–168.
65. PODEROSO JJ, CARRERAS MC, LISDERO C et al. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 1996; **308**:89–95.
66. ESCAMES G, LÓPEZ LC, ORTIZ F et al. Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J* 2007; **274**:2135–2147.
67. BOVERIS A, ALVAREZ S, NAVARRO A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**:1186–1193.
68. PODEROSO JJ. The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 2009; **484**:214–220.
69. SQUADRITO GL, PRYOR WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 1998; **25**:392–403.
70. NAVARRO A, BOVERIS A. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; **60**:1534–1544.
71. 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; **41**:1165–1173.
72. FERRÁNDIZ ML, MARTÍNEZ M, DE JUAN E et al. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in the brain of aged mice. *Brain Res* 1994; **644**:335–338.
73. NAVARRO A, BOVERIS A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol* 2007; **292**:C670–C686.
74. AMES BN, ATAMNA H, KILLILEA D. Mineral and vitamin deficiencies can accelerate the mitochondrial decay of aging. *Mol Aspects Med* 2005; **26**:363–378.
75. NILSEN J. Estradiol and neurodegenerative oxidative stress. *Front Neuroendocrinol* 2008; **29**:463–475.
76. RODRÍGUEZ MI, CARRETERO M, ESCAMES G et al. Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic Res* 2007; **41**:15–24.
77. TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ et al. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept* 2000; **9**:137–159.
78. JAHNKE G, MARR M, MYERS C et al. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Res* 1999; **50**:271–274.
79. JAN JE, HAMILTON D, SEWARD N et al. Clinical trials of controlled-release melatonin in children with sleep-wake cycle disorders. *J Pineal Res* 2000; **29**:34–49.
80. DE LOURDES M, SEABRA V, BIGNOTTO M et al. Randomised double blind clinical trial, controlled with placebo of the toxicology of chronic melatonin treatment. *J Pineal Res* 2000; **29**:193–200.

DISCUSIÓN

CONSIDERACIONES PREVIAS

En el presente estudio multifactorial del envejecimiento, el objetivo principal es evidenciar la relación existente tanto entre los diferentes parámetros de estrés oxidativo como de la bioenergética mitocondrial en las mitocondrias de cerebro y pulmón en el modelo de ratón sensible al envejecimiento acelerado SAMP8, frente a sus controles, resistentes al mismo, SAMR1.

Se ha estudiado también el comportamiento en estos ratones al ser tratados crónicamente con 10 mg/kg melatonina en el agua de bebida durante nueve meses. En este trabajo, los ratones se sacrificaron a los cinco y a los diez meses de edad, ya que se ha detectado que los ratones SAMP8 muestran signos de estrés oxidativo a la temprana edad comprendida entre los tres y los cinco meses, aunque empiezan a detectarse desde el segundo mes de vida [Yasui y cols., 2003] en relación a los SAMR1. Estos signos son más patentes a los once meses [Mori 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 cardiaco 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

1.1.- Cerebro

Como se ha mostrado anteriormente, el daño producido a la mitocondria como consecuencia de la generación interna de radicales libres se encuentra relacionado con el proceso de envejecimiento celular. En este trabajo se estudian parámetros de estrés oxidativo y de bioenergética mitocondrial en el cerebro de ratones SAMP8 y SAMR1, tanto machos como hembras. Asimismo, se analiza la respuesta de la función mitocondrial a un tratamiento crónico con melatonina.

El cerebro es el órgano que controla el procesamiento de la información sensorial recogida del mundo que nos rodea y de nuestro propio cuerpo, así como las respuestas motrices y emocionales, el aprendizaje, la conciencia, la imaginación, la memoria, la cognición, etc. Una pérdida de funcionalidad del cerebro puede conllevar a pérdidas de memoria y

aprendizaje, disfunciones sensorio-motoras, y a la muerte. Con la edad es evidente la aparición de factores neurodegenerativos que desembocan en enfermedades características de la población envejecida [Reiter, 1998b; Fahn y Cohen, 1992; Karasek y Pawlikowski, 1999; Pawlikowski y cols., 2002]. La elección del cerebro como órgano para este estudio se basó también en que los efectos perjudiciales de la edad se observan mejor en tejidos con células postmitóticas como el cerebro [Barja, 2004].

El estrés oxidativo se da en aquellas situaciones en las que se desequilibra el balance entre el estado redox oxidante y antioxidante, favoreciéndose el estado oxidado [Sies, 1985]. El presente estudio documenta la existencia de un significativo daño oxidativo en las mitocondrias de cerebro, tanto en las hembras como en los machos, en el modelo de ratón con resistencia al envejecimiento acelerado SAMR1, y en el modelo de envejecimiento acelerado, el ratón SAMP8. Existe gran cantidad de bibliografía que documenta el estado hiperoxidativo de esta subcepa [Karbownik y cols., 2000a], incluso desde una edad muy temprana (4 semanas de vida) [Sato y cols., 1996; Matsugo y cols., 2000; Yasui y cols., 2003]. En esta tesis también se aportan datos que demuestran que el estrés oxidativo aumenta desde los 5 hasta los 10 meses de edad, datos que concuerdan con la teoría mitocondrial del envejecimiento [Miquel, 1998]. Asimismo, los parámetros indicadores de estrés oxidativo están aumentados en los ratones SAMP8 al compararlos con los obtenidos en los SAMR1, tal y como se esperaba.

El cerebro de esta cepa de ratones está expuesto a altos niveles de estrés oxidativo, incluso a una edad más temprana que en la cepa SAMR1, como otros estudios han mostrado [Gutiérrez-Cuesta y cols., 2007]. El estrés oxidativo se eleva con el envejecimiento, con lo que podría considerarse causa en la degeneración del cerebro. Un resultado muy interesante es la eficacia de la administración crónica de aMT en la prevención del estrés oxidativo. Estos resultados muestran como la melatonina ha disminuido el daño oxidativo en ambas cepas de ratón, y debido a su falta de toxicidad [Jahnke y cols., 1999; Jan y cols., 2000; Seabra y cols., 2000], así como a la ausencia de acciones prooxidantes [Tan y cols., 2002], esta molécula es una eficiente herramienta terapéutica contra las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

El tejido cerebral es muy sensible a los daños producidos por los radicales libres, debido a que el cerebro utiliza gran cantidad de O_2 (hasta el 20% del total de O_2 inspirado), por su elevada concentración tanto de ácidos grasos poliinsaturados [Floyd y Hensley., 2002] como de metales de transición como el hierro, que están involucrados en la producción de radicales libres [Hill y cols., 1984], y por la escasa presencia de antioxidantes citosólicos [Floyd y Carney, 1993; Reiter, 1995; Droge, 2003]. El estrés oxidativo en el cerebro ocurre cuando la generación de ROS sobrepasa la capacidad del sistema antioxidante endógeno de eliminar el exceso de estas moléculas, con lo que se produce daño celular. El estrés oxidativo en la mitocondria acarrearía cambios en la cantidad de LPO y GSH, como ya se describió [Nomura y cols., 1989], y si el daño producido por los ROS se prolonga, también en las enzimas del ciclo

del GSH [Martín y cols., 2000a]. Los datos aquí presentados muestran un incremento significativo en los niveles de LPO en mitocondrias cerebrales, lo que refleja el daño oxidativo a las membranas durante el envejecimiento [Liu y cols., 1993], incluso a una temprana edad [Yasui y cols., 2003]. Las hembras presentaron valores superiores de LPO que los machos, estando este dato de acuerdo con una reducción de fluidez de la membrana mitocondrial encontrada en hembras SAMP8 [Yarian y cols., 2005], aunque el incremento que se produjo con la edad fue similar en ambos grupos, como ha podido comprobarse en estudios previos [Nomura y cols., 1989; Liu y Mori, 1993; Butterfield y cols., 1997]. Este incremento puede achacarse al envejecimiento acelerado de los SAMP8 [Liu y Mori, 1993; Matsugo y cols., 2000; Nomura y cols., 1989]. La melatonina disminuyó los niveles de LPO, coincidiendo con lo ocurrido en otros estudios [Okatani y cols., 2002; Álvarez-García y cols., 2006]. Esta disminución fue remarcable en el caso de las hembras SAMP8. Gracias a la lipofilidad del aMT, esta molécula se acumula en la mitocondria en altas concentraciones [López y cols., (2009)], interactúa con la bicapa lipídica [Costa y cols., 1997; García y cols., (2010)], localizándose cerca de las cabezas polares de la membrana de fosfolípidos [Rebrin y cols., 2005]. En esta localización, el aMT está óptimamente situado para funcionar como un depurador de radicales libres, al la vez que actúa estabilizando la membrana interna de la mitocondria, protegiéndola del daño oxidativo [García y cols., 1999].

Por otra parte, los RNS también son producidos en la mitocondria. El NO^\bullet se produce por la oxidación del nitrógeno guanidínico de la L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Al incrementarse la concentración de NO^\bullet , éste puede inhibir la actividad de los complejos IV, III y I [Ghafourifar y Richter, 1999]. La formación de anión peroxinitrito (ONOO^-) *in vivo* resulta de la transformación de dos radicales libres escasamente reactivos, NO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$, en una especie mucho más reactiva, que puede interactuar y modificar covalentemente a todos los tipos de biomoléculas [Pacher y cols., 2007; Demicheli y cols., 2007]. Este ONOO^- , en su mayor parte, reacciona con CO_2 , produciendo reactivos intermediarios como el NO_2 , el cual puede afectar a otras biomoléculas por reacciones secundarias [Squadrito y Pryor, 1998]. Así, la medida de nitritos es un parámetro indirecto del estrés nitrosativo. Tanto machos como hembras mostraron valores similares de NO_2 . Los grupos envejecidos mostraron mayores niveles que los grupos jóvenes, un parámetro que puede reflejar un mayor estrés oxidativo en los primeros. En los grupos tratados con aMT, tanto machos como hembras, ya sean SAMP8 o SAMR1, el aumento de nitritos fue contrarrestado en parte o incluso equiparado a los valores de los grupos de 5 meses de edad. Estudios previos han demostrado que la aMT es un eficaz depurador de ONOO^- [Allegra y cols., 2003, Guenther y cols., 2005]. Otra manera de impedir la formación de ONOO^- es restringir la cantidad de los radicales que lo producen, NO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$. La melatonina se ha mostrado también eficaz en este aspecto [López y cols., 2009]

En el cerebro, el GSH es el antioxidante intracelular principal [Dringen, 2000]. Una de la defensas mitocondriales antioxidantes es el ciclo del GSH. La enzima GPx convierte el H_2O_2 en

agua. En este proceso, el GSH es oxidado a GSSG. La enzima GRd restablece los niveles de GSH. En el cerebro, la actividad de la enzima GPx fue similar en machos y hembras. Disminuyó en los grupos envejecidos, y fue restablecida con el tratamiento con aMT, en el caso de los grupos SAMP8, por encima del valor de los animales con 5 meses de edad. Estos resultados son similares a estudios previos de este grupo de investigación [Rodríguez y cols., 2008], así como de otros grupos [Okatani y cols., 2002a]. Por otra parte, la actividad de la enzima GRd fue mayor en los machos que en las hembras. Excepto por esta variación, su comportamiento fue similar a la GPx, ya que su actividad se redujo en los animales envejecidos, siendo restaurada en los grupos tratados con aMT, superando a veces los valores de los animales de 5 meses de edad.

El GSH es un aminoácido tiol tripeptídico ubicuo que constituye la principal defensa para el mantenimiento del balance redox intracelular. En condiciones normales, se asocia con altos niveles de GSH una baja carga oxidante y una alta actividad biosintética. Esta situación es típica en condiciones de restricción calórica, la cual atenúa la tasa de producción mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 [Sohal y cols., 1994; Rebrin y cols., 2003]. La ratio GSH/GSSG es indicativa del estado redox global [Jones, 2005]. En este estudio, las hembras presentaron valores inferiores de GSH/GSSG que los machos en todos los grupos estudiados. La relación disminuyó en los grupos de 10 meses de edad, tanto machos como hembras de ambas cepas estudiadas, reflejando una tendencia oxidante debida a la generación de ROS, junto a una disminución del transporte citosólico de GSH hacia la mitocondria, como se ha observado en ratones SAM [Park y cols., 1996]. La melatonina restableció significativamente los valores de GSH/GSSG en todos los casos. Estos datos pueden explicarse ya que, siendo la melatonina un depurador de radicales libres, es muy efectiva en la eliminación de H_2O_2 [Tan y cols., 2000], el radical más importante producido en la mitocondria desde el $O_2^{\bullet-}$. Este hecho reduce la pérdida de la reserva de GSH intramitocondrial, y enlentece el daño mitocondrial [Karbownik y cols., 2000a, b].

Tras comprobar estos signos de estrés oxidativo, procedimos a averiguar si los mismos son el comienzo al fallo de la función mitocondrial. Iniciamos entonces el estudio de la actividad de los complejos respiratorios y la reserva de nucleótidos en las mitocondrias cerebrales de los ratones SAM. Estudios previos han documentado disfunciones en la mitocondria en ratones SAMP8 jóvenes [Nomura y cols., 1989; Liu y Mori, 1993], aunque la caída de ATP sólo se ha observado a edades mayores, a partir de 9 meses de vida. [Xu y cols., 2007; Nahakara y cols., 1998]

Estudios previos establecieron que la melatonina influye de manera dosisdependiente en la actividad de los complejos I y IV [Martín y cols., 2002]. Al incrementar el flujo de electrones a través de ETC, aumenta la producción de ATP. Nuestros experimentos confirman estos resultados en el complejo I, mientras que en el complejo IV sólo las hembras mostraron

un ascenso significativo de la función. Es remarcable que en este estudio se observó un aumento de la actividad del complejo II en los grupos tratados con aMT, así como lo hubo también en el complejo III en ambas cepas hembras. Los machos SAMR1 son los menos afectados por el daño producido a los complejos respiratorios, y como consecuencia de esto no sufrieron un incremento en los valores de ATP ni en la ratio ATP/ADP, cosa que sí ocurrió en el resto de grupos estudiados. Estos resultados son parecidos a otros obtenidos previamente en este laboratorio en el tejido cardíaco de las mismas subcepas estudiadas [Rodríguez y cols., 2007a]. El aumento del estrés oxidativo en el cerebro envejecido ha sido atribuido a una reducida eficiencia en la producción de energía en la mitocondria [Ames y cols., 2005]. Así, el aMT podría elevar la eficiencia de la fosforilación oxidativa y de la síntesis de ATP. Estos datos demuestran que el daño asociado al envejecimiento es mayor en mitocondrias SAMP8, seguramente aplicable a un mayor perjuicio en esta organela como resultado de un desacoplamiento causado por un daño a la membrana [Nakahara y cols., 1998]. El aumento en los valores de LPO de los ratones SAMP8 estaría en consonancia con esta hipótesis.

El dato más destacable de este trabajo es el descenso del daño oxidativo mitocondrial por parte de la melatonina, gracias a su acción antioxidante y depuradora de radicales libres [Tan y cols., 2000a, 2000b, 2002; Turjanski y cols., 2001; Antolín y cols., 1996]. Gran cantidad de estudios han demostrado cómo la administración aguda de aMT es eficaz combatiendo las taras mitocondriales en los ratones SAM [Okatani y cols., 2002a, b, c]. A dosis fisiológicas también se ha demostrado su acción antioxidante [Joo y cols., 1998], por lo que debe ser considerada parte del sistema antioxidante endógeno [Reiter y cols., 1998a, 2000a]. El aMT es muy efectiva en la eliminación de radicales libres. Una única molécula puede depurar dos moléculas de radicales libres, siendo ambas radicales hidroxilos o bien un radical hidroxilo y un anión superóxido [Nishikawa y cols., 1998; Castillo y cols., 2005]. La melatonina es además fácilmente disponible para la mitocondria, ya que su liposolubilidad le permite atravesar barreras biológicas con facilidad, con lo que puede acumularse intracelularmente, [Costa y cols., 1997; Menéndez-Peláez y cols., 1993a;] como ocurre en el caso de la mitocondria incluyendo la mitocondria, donde puede alcanzar altas concentraciones [Acuña-Castroviejo y cols., 2003; López y cols., (2009)].

Es extensa la bibliografía que demuestra la influencia de la melatonina en la homeostasis mitocondrial. El aMT estimula la acción de dos de las enzimas involucradas en el balance GSH/GSSG, como son la GPx y la GRd [Martín y cols., 2000a; Acuña-Castroviejo y cols., 2001, Tomás-Zapico y Coto-Montes, 2005; Escames y cols., (2010)], protegiendo la mitocondria para que pueda aumentar la producción de ATP. Otros trabajos también mostraron que el aMT mejora la función de la ETC mitocondrial [Martín y cols., 2002; Escames y cols., 2005; López y cols., 2006], aunque el mecanismo de acción no es conocido. Este estudio ha obtenido

resultados similares, y muestran una mejora en la reserva celular de ATP en los grupos tratados con aMT.

Los resultados aquí mostrados señalan que la administración crónica de aMT en los SAMP8 previene la disfunción mitocondrial como resultado del estrés oxidativo. En concreto, la aMT reduce la LPO en las mitocondrias del cerebro en determinadas grupos, concretamente las hembras, incluso por debajo de los valores encontrados a los 5 meses de edad tanto en SAMR1 como en SAMP8. Esta acción se debe principalmente a que la aMT es una molécula lipofílica, como mencionamos anteriormente, que cruza las membranas celulares con facilidad enriqueciendo los compartimentos subcelulares [Menéndez-Peláez y cols, 1993a]. El aMT se sitúa próxima a las cabezas polares de los fosfolípidos, interaccionando con los lípidos de membrana [Costa y cols., 1997], y estabilizando la membrana interna mitocondrial [García y cols., 1999]. desde esta localización la melatonina se encuentra óptimamente situada para depurar radicales libres, protegiendo a las membranas del daño oxidativo.

El valor antioxidante de la indolamina se refleja también en su capacidad para estimular la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GRd, de nuevo en ocasiones por encima del valor registrado en los grupos de 5 meses de edad, así como en la recuperación de la ratio GSH/GSSG en ambas cepas de ratón SAMR1 y SAMP8. Este hecho puede deberse principalmente a una elevación del GSH, ya que la melatonina ejerce una acción estimulante en la enzima gammaglutamilcisteina sintetasa, la enzima reguladora de la síntesis del GSH [Barrientos, 2002].

Además, el tratamiento crónico con aMT mejora la actividad de la ETC, así como aumenta los niveles mitocondriales de ATP. Estos datos coinciden con numerosos estudios que indican una acción reseñable de la aMT en la actividad de la cadena respiratoria [Martín y cols., 2000b, 2002; Escames y cols., 2005; López y cols., 2006].

En resumen, estos resultados apuntan que el estrés oxidativo atribuido a una excesiva génesis de radicales libres, sumado al menoscabo de la función de los sistemas defensivos contra el estrés oxidativo puede conllevar a un perjuicio a la actividad mitocondrial registrada en los ratones SAMP8. Estas observaciones están en armonía con las predicciones expuestas en la teoría mitocondrial del envejecimiento [Miquel, 1998].

Si el incremento del estrés oxidativo con la edad puede deberse a una reducción de los niveles de aMT en diferentes tejidos de los SAMP8, como se ha sugerido [Lardone y cols., 2006], el tratamiento sustitutivo con aMT en el agua de bebida debe prevenir la disfunción mitocondrial asociada a la edad, lo que efectivamente ocurre sobre todo en los animales SAMP8. Estos datos, así como la inexistencia de efectos perjudiciales apuntan a que el uso de aMT puede mejorar las alteraciones mitocondriales relativas a la edad en humanos, siendo una

herramienta terapéutica para las enfermedades en las que estas disfunciones mitocondriales están involucradas.

1.2.- Pulmón

El pulmón es el otro órgano estudiado para registrar el daño mitocondrial asociado al envejecimiento. Es un tejido muy sensible al ataque por parte de los radicales libres. Tiene una alta vascularización y está expuesto directamente al O₂ atmosférico. Estudios previos han revelado que el estrés oxidativo, producido por una generación excesiva de ROS, puede ser un componente importante en los mecanismos de acción de varios compuestos tóxicos que llegan al pulmón mediante la respiración [Milatovic y cols., 2006, Yaren y cols., 2007]. Su funcionalidad debe salvaguardarse del ataque oxidativo, ya que su eficiencia en el intercambio gaseoso es vital para la vida, así como el mantenimiento de un aporte adecuado de O₂, necesario para la producción de ATP debe ser adecuado para los requisitos del organismo. El envejecimiento puede alterar los mecanismos de defensa antioxidante del pulmón, disminuyendo la eficiencia pulmonar.

Este estudio documenta la existencia de un notorio estrés oxidativo dependiente de la edad en las mitocondrias pulmonares, tanto de machos como hembras, de las cepas SAMR1, y especialmente, en el modelo patológico SAMP8. De acuerdo con la mayoría de los marcadores de estrés oxidativo medidos, los ratones SAMP8 mostraron un mayor daño oxidativo mitocondrial estadísticamente significativo que los animales SAMR1. También se ha observado un incremento del estrés oxidativo y de sus resultados perjudiciales a las células entre los cinco y los diez meses de edad, hecho que apoya la teoría mitocondrial del envejecimiento [Miquel J, 1998]. Como se preveía, la mayoría de resultados reflejaron que los ratones SAMP8 tienen mayor índice de estrés oxidativo. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo como consecuencia de la generación de radicales libres, combinado con una menor eficiencia del sistema antioxidante puede causar las disfunciones mitocondriales observadas en los modelos de envejecimiento. Hay que destacar la eficacia de la administración crónica de aMT en la prevención del estrés oxidativo relacionado con la edad. Así, y contando con la falta de toxicidad de la melatonina previamente observada, ésta debe ser la principal molécula en la terapéutica contra las enfermedad relacionadas con el estrés oxidativo [Janhke y cols., 1999; De Lourdes y cols., 2000; Jan y cols., 2000].

Este estudio defiende que los ratones SAMP8 están expuestos a unos elevados valores de estrés oxidativo desde una edad temprana hasta los 10 meses, y que esto puede ser la causa de los perjuicios relacionados con la senescencia y la degeneración del pulmón entre otros tejidos periféricos. Algunas características propias del pulmón apuntan a que es un órgano muy sensible al estrés oxidativo. Como ya se ha mencionado, en las células aeróbicas, un 90-95% del ATP se obtiene en la fosforilación oxidativa, un proceso que ocurre en la

mitocondria. Una pequeña proporción de este O_2 se desvía hasta la producción de ROS [Haliwell y Gutteridge, 1999; Di Lisa y Bernardi, 2005], como se ha explicado anteriormente en el apartado 1.1. El complejo III es el principal responsable de la producción de O_2^{\bullet} en la mitocondria pulmonar [Turrens y cols., 1982].

Nuestros resultados confirman el incremento en los valores de LPO en los grupos envejecidos, en comparación con los animales de cinco meses de edad, lo que puede ser achacado a la generación de ROS. Es particularmente notable el aumento de la LPO en los SAMP8 machos, quizás debido al envejecimiento acelerado [Liu y Mori, 1993; Matsugo y cols., 2000; Nomura y cols., 1989], aunque no es tan claro en el caso de las hembras. Un mayor nivel de LPO puede acarrear una reducción de la fluidez de la membrana durante el envejecimiento, como se encontró en el caso de animales SAMP8 [Karbownik y cols., 2000a]. Se ha observado la disminución de LPO en los grupos tratados con aMT. Tanto la melatonina como algunos de sus metabolitos son potentes depuradores de radicales libres poseyendo, por tanto, propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, [Tan y cols., 2007; León y cols., 2006; Manda y cols., 2007] tal y como se mencionaba en el apartado 2.1.2. Otra ventaja del aMT es que este derivado de la triptamina es altamente lipofílico, lo que le permite cruzar las membranas biológicas y entrar tanto en el citoplasma como en el núcleo celular, así como estabilizar las membranas, como ya se mencionó anteriormente. Una administración aguda de aMT contrarrestó deficiencias mitocondriales en ratones SAM [Okatani cols., 2002 a, b, c]. En este trabajo hemos observado cómo la melatonina inhibe el aumento de los valores de la lipoperoxidación y el daño oxidativo mitocondrial acaecidos con la edad en los ratones SAMR1 Y SAMP8. No se observaron diferencias significativas entre machos y hembras, salvo la comentada anteriormente.

Como ya hemos comentado, en la mitocondria también se producen RNS. La mitocondria posee su propia maquinaria para la producción de NO^{\bullet} con fines regulatorios. De hecho, tanto la isoforma constitutiva (c-mtNOS) como la inducible (i-mtNOS) de la óxido nítrico sintasa están presentes en la mitocondria [Escames y cols., 2007; Boveris y cols., 2002]. Un incremento de los niveles mitocondriales de NO^{\bullet} inhibe la actividad de los complejos IV, III y I [Escames y cols., 2007; Squadrito y cols. 1998; Escames y cols., 2006]. Esto sucede en situaciones donde se da una inflamación, cuando la isoforma inducible produce grandes cantidades de NO^{\bullet} [Escames y cols., 2007; Escames y cols., 2006; Navarro y Boveris, 2008], el cual, en estas condiciones, reacciona con O_2^{\bullet} produciendo $ONOO^-$, compuesto muy reactivo capaz de dañar todos los complejos respiratorios así como otras proteínas y lípidos [Ferrándiz y cols., 1994; Navarro y Boveris, 2007]. La reacción de O_2^{\bullet} con $ONOO^-$ forma NO_2 como producto intermediario. Por esto la medida de nitritos es un parámetro indirecto del estrés nitrosativo. En la literatura existen trabajos que vinculan la acción de estos radicales libres con la toxicidad producida al pulmón, así como que la melatonina aliviaba el daño producido [Ucar y cols., 2007]. Todos los grupos envejecidos tuvieron niveles significativamente más elevados de

NO₂ que los grupos de cinco meses de edad, salvo el grupo de las hembras SAMP8, en el cual el aumento no fue significativo. Este incremento de los nitritos refleja el aumento del estrés nitrosativo. En los grupos tratados con aMT, tanto machos como hembras, ya sean SAMP8 o SAMR1, el aumento de nitritos fue contrarrestado en parte o incluso equiparado a los valores de los grupos de 5 meses de edad, efecto que puede deberse a la acción depuradora de la melatonina sobre el radical NO[•], inhibiendo de esta manera su acción directa como radical, al ser eliminado previamente a ser convertido en el dañino ONOO⁻, y también disminuye su acción proinflamatoria.

Recordemos que el ciclo del glutatión es una defensa antioxidante de la mitocondria contra los oxidantes. Es muy activo en la mitocondria, puesto que la mitocondria no sintetiza GSH, ya que lo importa del citosol, y tampoco posee catalasa. Al estudiar el ciclo del glutatión en las mitocondrias de pulmón, se observó que la actividad de la GPx era similar en machos y hembras, aunque los machos SAMR1 destacan por encima del resto de grupos estudiados. La actividad enzimática desciende con la edad en los grupos envejecidos, y es parcialmente recuperada con el tratamiento con aMT, y en el caso de los machos SAMR1, por encima de los valores del grupo de 5 meses de edad. Estos valores son similares a otros encontrados en este laboratorio previamente [Rodríguez y cols., 2008]. Por otro lado, la actividad de la enzima GRd se observó mayor en los machos que en las hembras, aunque siguió el mismo comportamiento que la GPx, esto es, descendió su actividad en los grupos envejecidos, y se recuperó de nuevo en los grupos tratados con melatonina, siendo superior que la actividad registrada por los grupos de 5 meses en el caso de los ratones SAMP8. La melatonina regula la expresión de algunos genes, sobre todo la de aquellos relacionados con el estado redox celular, como es el caso de la GPx, la GRd, y la iNOS [Antolín y cols., 1996; Crespo y cols., 1999; García-Mauriño y cols., 2000]. *In vitro*, concentraciones nanomolares de aMT normalizaron la reserva de GSH e incrementaron la actividad de enzimas antioxidantes, incluidas la GPX y la GRd, en mitocondrias con la reserva de GSH agotada [Martín y cols., 2001; Acuña-Castroviejo y cols., 2001].

La ratio GSH/GSSG disminuyó a los 10 meses de edad, tanto en los grupos SAMR1 como en los SAMP8, sin distinción de sexos, reflejando una tendencia a la oxidación debida a la generación de ROS. Nuestros datos muestran que esta tendencia es mayor en los SAMP8 que en los SAMR1. La melatonina restableció significativamente la ratio en todos los casos, excepto en el caso de las hembras SAMP8, mientras que en el caso de los machos, ambos grupos tratados superaron los valores de sus respectivos grupos de 5 meses de edad.

Los resultados aquí descritos muestran un incremento en la actividad de los complejos I, II y IV. El aMT está relacionado con la estimulación de la actividad de los complejos de la ETC. Estudios previos obtuvieron resultados similares tanto *in vivo* como *in vitro* [Escames y cols., 2005; Rebrin y Sohal, 2004]. Martín y colaboradores [Martín y cols., 2002] llevaron a

cabo un estudio en el cual la melatonina influenció de manera dosis dependiente la actividad de los complejos I y IV, y nuestros experimentos confirman esos datos. Aún más interesante, el complejo II en tres de los grupos tratados con aMT también restableció su actividad, llegando a valores superiores a los registrados para los grupos de 5 meses de edad. Nuestros datos documentan también mayores niveles de ATP en los grupos tratados con aMT, de acuerdo con otros estudios, en los que se defiende que la melatonina puede mejorar la capacidad de la mitocondria en la producción de ATP, interactuando con los complejos de la ETC debido a su alto potencial redox, con lo que dona y acepta electrones, incrementando el flujo electrónico [Escames y cols., 2005; Rebrin y Sohal, 2004; Vastillo y cols., 2005]. Los datos obtenidos en este trabajo muestran también un incremento en la ratio ATP/ADP en los grupos tratados con aMT, enriqueciendo la reserva celular de ATP, con lo que la melatonina podría elevar la eficiencia de la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP, coincidiendo con trabajos previos [Reiter y cols., 2008a]. También puede prevenir posibles disfunciones mitocondriales relacionadas con una caída de la función respiratoria mitocondrial, posiblemente como resultado del desacoplamiento causado por daños en la membrana, como otros estudios encontraron en ratones SAMP8 [Nahakara y cols., 1998].

Consideraciones finales

En conjunto, los resultados apoyan que los ratones SAMP8 muestran un estrés oxidativo mitocondrial mayor que los SAMR1, así como una cadena respiratoria mitocondrial más perjudicada. Este trabajo documenta también evidencias significativas de estrés oxidativo en mitocondrias cerebrales a la edad de 10 meses, en comparación con las de 5 meses. Estos resultados están de acuerdo con la teoría mitocondrial del envejecimiento [Miquel, 1991]. En los parámetros estudiados no se encontraron diferencias remarcables entre machos y hembras. El papel neuroprotector y antioxidante de los estrógenos descrito en otros estudios no parece ser suficiente para tener un efecto reseñable, al menos no hasta los 10 meses de edad. Por otra parte, la melatonina y sus metabolitos, cuyos beneficiosos resultados han sido aquí descritos, así como en otros trabajos [Rodríguez y cols., 2007b], son potentes depuradores de radicales libres con lo que poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias [León y cols., 2006; Rodríguez y cols., 2007c], que pueden contrarrestar los efectos del estrés oxidativo en enfermedades asociadas con el envejecimiento.

Las propiedades antioxidantes del aMT, administrada en el agua de bebida a partir del primer mes de vida, y continuando durante nueve meses más, y específicamente, su papel en la reducción del daño oxidativo mitocondrial dependiente de la edad, han quedado ratificadas. El tratamiento con aMT de manera crónica contrarrestó el deterioro de la función mitocondrial en los pulmones, siendo éste más evidente en los ratones SAMP8 que en los SAMR1. No se registraron efectos secundarios aparentes tras la administración de aMT.

En conclusión, la melatonina, por sus propiedades antienvjecimiento, cuyos beneficiosos resultados sobre las mitocondrias del cerebro, del pulmón y de otros tejidos han

sido probados [Rodríguez y cols., 2007a], reúne óptimas condiciones para ser el candidato ideal para estudios posteriores en la aplicación terapéutica contra las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y procesos que cursen de manera similar como es el envejecimiento.

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. En definitiva, consideramos que la aMT es un antioxidante excepcional cuya administración constante ayudará significativamente en la consecución de un proceso de envejecimiento saludable.

CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES

1ª- Se aprecian evidencias significativas de estrés oxidativo y daño en la cadena respiratoria en las mitocondrias de cerebro y pulmón a los 10 meses de edad. Esto apoya la Teoría Mitocondrial del Envejecimiento. En particular, a los 10 meses de edad, los ratones SAMP8 muestran mayor daño en mitocondrias de cerebro y pulmón que los SAMR1. Existen diferencias mínimas entre ambos sexos.

2ª- La administración exógena de aMT desde el primer mes de vida y durante 9 meses frena el deterioro de la función mitocondrial asociada al envejecimiento en los dos tejidos estudiados, ya que contrarresta el estrés oxidativo hasta niveles incluso por debajo de los encontrados a los 5 meses de edad.

3ª- La administración crónica de aMT en el agua de bebida contrarresta también el estrés nitrosativo producido por la inflamación, ya que se comporta como una molécula muy activa frente al envejecimiento, a causa de sus propiedades antiinflamatorias.

4ª- Por tanto, el envejecimiento debe ser considerado bajo la Teoría Inflamatoria Mitocondrial, que depende no sólo del daño producido por los radicales de oxígeno, sino que es también producido por la acción de los radicales libres de nitrógeno, como consecuencia de procesos inflamatorios.

5ª- La mejora de la bioenergética mitocondrial por la administración de aMT sugiere que esta molécula puede ser beneficiosa para retrasar los efectos del envejecimiento humano asociados con este proceso.

BIBLIOGRAFÍA

1. BIBLIOGRAFÍA

Abe M, Itoh MT, Miyata M, Ishikawa S, Sumi Y (1999) Detection of melatonin, its precursors and related enzymes activities in rabbit lens. *Exp Eye Res* 68: 255-62

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 Medicin 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 glaucomaous chickens. *J Ocular Pharmacol* 1: 149-60.

Akbulut KG, Gonül B, Akbulut H (2008) Exogenous melatonin decreases age-induced lipid peroxidation in the brain. *Brain Research*; 1238:31-5

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.

Álvarez B, Radi R (2001) peroxynitrite decay in the presence of hydrogen peroxide, mannitol and ethanol: a reappraisal. *Free Radic Res* 43:467-75

Álvarez B, Radi R (2003) peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25; 295-311

Álvarez-García O, Vega-Naredo I, Sierra V, (2006) Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age. *Biogerontology* 7:43-52.

Ames BN, ShigenagaMK, Hagen TM (1995) Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta* 1271: 165-70.

Ames BN, Atamna H, Killilea D (2005) Mineral and vitamin deficiencies can accelerate the mitochondria decay of aging *Mol Aspects Med* 26: 363-78

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, Sain 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.
- Arendt J (1995) Melatonin and the mammalian pineal gland. London, Chapman & Hall.
- 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 transduce. *Science* 184: 1341-8.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging *Cell* 120:483-95
- 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.
- Barja G (2004) Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 27: 595– 600.
- 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.
- Benzi G, pastoris O, Marzatico F, Villa RF, Dagani F, Curti D. The mitochondrial electron transfer alteration as a factor envolved in the brain aging. *Neurobiol Aging* 13: 361-8
- 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.
- Boveris A, Álvarez S, navarro A (2002) The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free radic Biol Med* 33:1186-93.
- Bowling AC, Mutisya Em, Walker LC, Price DL, Cork LC, Beal MF. Age-dependent impairment of mitochondrial function in primate brain. *J Neurochem* 60:1964-7
- 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.
- Burkhardt S, Reiter RJ, Tan DX, Hardeland R, Cabrera J, Karbownik M (2001) DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 775–783.
- 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.
- Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernández C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodríguez-Colunga MJ, Coto-Montes A (2008) Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.* 45:302-11.

- 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.
- 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.
- Chen Q, Vázquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 279:41975-84
- 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.
- Curti D, Giancare MC, Redolfi ME, Fugaccia I, Benzi G. (1990) Age-related modifications of cytochrome C oxidase in discrete brain regions. *Mech Ageing Dev.* 55:171-80
- 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.
- De Almeida EA, Martinez GR, Klitzke CF, de Medeiros MH, Di Mascio P (2003) Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen ($O_2^1\Delta_g$) 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.
- Demicheli V, Quijano C, Álvarez B, Radi R (2007) Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med* 42: 1359-68

- Di Lisa F, Bernardi P (2005) Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition. *Cardiovascular Research* 66: 222-32
- Dringen R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progr Neurobiol* 2000; 62:649–671.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Droge W (2003) Oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol* 543:191–200.
- 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 D (2003) Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthases in rats. *FASEB J* 17: 365-375.
- Escames G, López A, García JA, García L, Acuña-Castroviejo D, García JJ, López LC (2010) The role of mitochondria in the aging brain and the effects of melatonin. *Current Neuropharmacology*, en prensa.
- 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.
- Escames G, López LC, Ortiz F, Lñopez A, García JA, Ros E, Acuña-Castroviejo D (2007) Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J* 274: 2135-47.
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186: 407-21.
- Fahn S, Cohen G (1992) The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurobiol* 32: 804–812
- Feldman ML, Navaratnam V (1981) Ultrastructural changes in atrial myocardium of rat. *J Anatomy* 133: 7-17.
- Ferrández ML, Martínez M, De Juan E, Díez A, Bustos G, Miquel J (1994) Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in the brain of aged mice. *Brain res* 644:335-8.
- Floyd RA, Carney JM (1993) The role of metal ions in oxidative processes and aging. *Toxicol Ind Health* 9:197–214.
- Floyd RA, Hensley K (2000) Nitron inhibition of age-associated oxidative damage. *Ann N Y Acad Sci* 899: 222-237.
- Floyd RA, Hensley K (2002) Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 23:795–807.

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-Mauriño S, Pozo D, Calvo JR, Guerreo JM (2000) Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J. Pineal Res* 29:129-37.

García JJ, Piñol-Ripoll G, Martínez-Ballarín E, Fuentes-Broto L, Miana-Mena FJ, Venegas C, Caballero B, Escames G, Coto-Montes A, Acuña-Castroviejo D (2010) Melatonin reduces membrane rigidity and oxidative damage in the brain of SAM mice. *Neurobiol Aging* doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.12.013.

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.

Ghafourifar P, Richter C (1999). Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 418, 291-296

Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, Szabó C (1997) Melatonin is scavenger of peroxynitrite. *Life Sci* 60: PL169-74.

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-5methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro- AMK. *J Pineal Res* 39: 251-260.

Gutierrez-Cuesta J, Sureda FX, Romeu M, Canudas AM, Caballero B, Coto-Montes A, Camins A, Pallás M (2007) Chronic administration of melatonin reduces cerebral injury biomarkers in SAMP8. *J Pineal Res* 42:394–402.

Halliwell 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) Nonvertebrate melatonin. *J Pineal Res* 34: 233-241. Harman D (1956) Aging: a theory based of free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.

Hardeland R (2005) Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 27, 119–130.

Hardeland, R., Pandi-Perumal S. R. and Poeggeler, B. (2007) Melatonin in plants – focus on a vertebrate night hormone with cytoprotective properties. *Funct. Plant Sci. Biotechnol.* 1, 32 –45.

Harman D (1972) The biological clock: The mitochondria. *J Am Geriatr Soc* 20: 145-147.

Harman, D (1956) *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J. Gerontol. 11:298-300.

Harper ME, Bevilacqua L, Hagopian K, Weindruch R, ramsey JJ (2004) Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. Acta Physiol. Scand. 182: 321- 31

Hill JM, Switzer RC (1984) The regional distribution and cellular localization of iron in rat brain. Neuroscience 11:595– 603.

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.

Horstman JA, Wrona MZ, Dryhurst G (2002) Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. Bioorg Chem 30: 371-82

Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G, Price C (1999) Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. Toxicol Res 50:271–4.

Jan JE, Hamilton D, Seward N, Fast DK, Freeman RD, Laudon M (2000) Clinical trials of controlled-release melatonin in children with sleep-wake cycle disorders. J Pineal Res 29:34–49.

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.

Joo JY, Uz T, Manev H (1998) Opposite effects of pinealectomy and melatonin administration on brain damage following cerebral focal ischemia in rats. Restor Neurol Neurosci, 13: 185–91.

Jou MJ, Peng TI, Yu PZ, Jou SB, Reiter RJ, Chen JY, Wu HY, Chen CC, Hsu LF (2007) Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. J Pineal res 43: 389-403

Karasek M (2006) Role of melatonin in aging. In *Aging and age-relates diseases: the basics*. M karasek (ed). Hauppauge, NY, Nova Science, pp 83-102.

Karasek M, Pawlikowski M (1999) Pineal gland, melatonin and cancer. Neuroendocrinol Lett 20: 139–44.

Karownik M, Reiter RJ, Garcia JJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC (2000a) Melatonin reduces rat hepatic macromolecular damage due to oxidative stress caused by delta-aminolevulinic acid. Biochim Biophys Acta 1523: 140-146.

Karownik M, Tan D, Manchester LC, Reiter RJ. (2000b) Renal toxicity of the carcinogen δ -aminolevulinic acid: antioxidant effects of melatonin. Cancer Lett 161:1-7

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, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Pelaez 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.

Krauss GJ, Pissarek M, Blasing I. (1997) HPLC of nucleic acid components with volatile mobile phases: part 2. Separations on polymeric supports. *J High Res Chromatogr* ; 20:693–696.

Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* 368:545-53

Kvetnoy I (2002) Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. *Neuro Endocrinol Lett* 1: 92-6.

Lahiri DK, Ge YW, Sharman EH, Bondy SC (2004) Age-related changes in serum melatonin in mice: higher levels of combined melatonin and 6-hydroxymelatonin sulfate in the cerebral cortex than serum, heart, liver and kidney tissues. *J Pineal res* 36: 217-23

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, Acuña-Castroviejo D, Saínz 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.

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.

Liu T, Borjigin, J (2005) N-acetyltransferase is not the ratelimiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res* 39: 91-6

López A, Garcia JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, López LC, Acuña-Castroviejo D (2009) Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J. Pineal Res.* 46:188-198

López LC, Escames G, Ortiz F, Ros E, Acuña-Castroviejo D. (2006) Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuroendocrinol.Lett.* 27 (5):623-630.

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.

Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ (2005) Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug metab Dsipos* 33:489-94

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

Manda K, Ueno M, Anzai K (2007) AFMK, a melatonin metabolite, attenuates X-ray-induced oxidative damage to DNA, proteins and lipids in mice. *J Pineal Res* 2007; 42:386–393

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.

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

Martín M, Macías M, Escames G, Reiter RJ, Agapito GG, Ortiz D, Acuña-Castroviejo D (2000b) Melatonin-induced increases activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res* 28: 242-8.

Martín M, Macías M, León 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.

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

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.

Milatovic D, Gupta RC, Aschner M (2006) Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *Sci World J* 6:295–310

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, Cavaillon JM (1991) Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 88: 1747-1754.

Muravchick S (2008) Clinical implications of mitochondrial diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1553-60

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.

Navarro A, Boveris A. (2007) The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol* 292: 670-86.

Navarro A, Boveris A. (2008) Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1534-44.

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, Mallol 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.

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.

Ortí-Pareja M, Jiménez-Jiménez FJ, Molina-Arjona JA (1998) Envejecimiento cerebral y mitocondrias. *Rev. Neurol.* 1998; 26: 107-111

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.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physio Rev* 87: 315-424

Pandi-Perumal SR, Srinivassan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggler B, Harderland R. Melatonin. Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 2006; 273: 2813-2836

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.

Pawlikowski M, Winczyk K, Karasek M (2002) Oncostatic action of melatonin: facts and question marks. *Neuroendocrinol Lett* 23 (1): 24-29.

Pieri C, Marra M, Moroni F, Pecchioni R, Marcheselli F (1994) Melatonin: a peroxy 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.

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.

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.

- Quay, WB.(1964) Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hidroxy indole-3-acetic acid. *Proc Soc Exp Biol Med* 115:710-3
- Ragusa N, Turpeenoja L, Magri G, Lähdesmäki P, Giuffrida Stella AM (1989) Age-dependent modifications of mitochondrial proteins in cerebral cortex and striatum of rat brain. *Neurochem Res* 14:415-8
- 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. *Endocr Rev* 12:151-80
- Reiter RJ (1992) The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays* 14: 169-175.
- Reiter RJ. (1995) Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 9:526–33.
- Reiter RJ (1998a) Neuroendocrinology of melatonin. En: Miles A, Phibrick DRS, Thompson C (eds) *Melatonin: clinical perspectives*. Oxford University Press, Oxford UK. pág 1.
- Reiter RJ (1998b) Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 56: 359-84
- Reiter RJ, Paredes SD, Korkmaz A, Jou MJ, Tan DX (2008a) Melatonin combats molecular terrorism at the mitochondria level. *Interdisc Toxicol* 1:137-49
- Reiter RJ, Richardson BA, Johnson LY, Ferguson BN, Dinh DT (1980) Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science* 210, 1372– 1373
- 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, Jou MJ, Korkmaz A, Manchester LC, Paredes SD (2008b) Biogenic amines in the reduction of oxidative stress: melatonin and its metabolites. *Neuro Endocrinol Lett* 29: 391-8

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- Burrillo S, Sainz RM and Mayo JC (2003) Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol* 527: 539-548.

Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sainz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antoln I, Zsizsik B, Reiter RJ, Hardeland R (2003) Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep.* 8: 205–213.

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.

Ribelayga C, Pevet P, Simmoneaux V (2000) HIOMT drives the photoperiod changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am J Physiol regul Integr Comp Physiol* 278:1339-45

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 (2007a) Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radical Res* 41: 15-24.

Rodríguez MI, Escames G, López LC, López A, Ortiz F, Acuña- Castroviejo D (2007b) Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.*42:272-9

Rodríguez MI, Escames G, López LC, García JA, Ortiz F, López A, Acuña-Castroviejo D (2007c) Melatonin administration prevents cardiac and diaphragmatic mitochondrial oxidative damage in senesce-accelerated mouse. *J Endocrinol* 194: 637-43.

Rodríguez MI, Escames G, López LC, López A, García JA, Ortiz F, Sánchez V, Romeu M, Acuña-Castroviejo D. (2008) Improved mitochondrial function and increased life span after chronic melatonin treatment in senescent prone mice. *Exp Gerontol.* 43:749-56

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.

Sánchez-Hidalgo M, Alarcon de la Lastra C, Carrascosa_Salmoral MP, Naranjo MC, Gomez-Corvera A, Caballero B, Guerrero JM (2009) Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol* 44: 328-34

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, Estrela JM, Miquel J, Viña J (1996) Aging of the liver: ageassociated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology* 24: 1199-205.

- Sato E, Oda N, Ozaki N, Hashimoto S, Kurokawa T, Ishibashi S (1996) Early and transient increase in oxidative stress in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech Ageing Dev* 86:105–14.
- 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.
- Seabra ML, Bignotto M, Pinto LR Jr, Tufik S (2000) Randomised double blind clinical trial, controlled with placebo of the toxicology of chronic melatonin treatment. *J Pineal Res* 29:193–200.
- Semak I, Naumova M, Korik E, Terekhovich V, Wortsman J, Slominski A (2005) A novel metabolic pathway of melatonin: oxidation by cytochrome c. *Biochemistry* 44: 9300-07
- 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.
- Simonneaux V, Ribelayga C. (2003) Generation of the melatonin endocrine message on mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by orepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55(2):325-95
- 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.
- Slominski A, Fischer TW, Zmijewski MA, Wortsman J, Semak I, Zbytek B, Slominski RM, Tobin DJ, (2005) On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine* 27, 137–148.
- 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.
- Squadrito GL, Pryor WA. (1998) Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 25:392–403.
- 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.
- Sugden, D (1979) Circadian changes in rat pineal tryptophan content: lack correlation with serum tryptophan. *J neurochem* 33: 811
- 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.
- 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 BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, Shepherd AM (1998) A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun*; 253:614–620.

Tan, DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, Farley, NJ (1999) High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci* 65, 2523- 29

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-metoxkyknuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 15: 2294-2296.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP et al. (2007) One molecule, many derivates: a never-ending interacting of melatonin with reactive and oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 42:28–42.

Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, yan MT, El –Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R (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.

Tapias V, Escames G, López LC, Entrena A, Camacho E, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D. (2009) N¹-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin, protects against MPTP-induced mitochondrial damage in mice. *J Neurosci Res* 87:3002-3010.

Tijmes m, Pedraza R, valladares L (1996) Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids* 61: 65-8

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.

Touitou Y, Fevre-Montange M, Proust J, Klinger E, Nakache JP (1985) Age- and sex-associated modification of plasma melatonin concentrations in man. Relationship to pathology, malignant or not, and autopsy findings. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 108 (1), 135–144.

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.

Turrens, JF, Freeman BA, Levitt JG, Crapo JD (1982) The effect of hyperoxia on superoxide reduction by lung submitochondrial particles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 217: 401–10.

Ucar M, Korkmaz A, reiter RJ, Yaren H, Oter S, Kurt B, Topal T (2007) Melatonin alleviates lung damage induced by the chemical warfare agent nitrogen mustard. *Toxicol Lett* 173: 124-31

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.

Xu J, Shi C, Li Q, Wu J, Forster EL, Yew DT (2007) Mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of senescence-accelerated mice. *J Bioenerg Biomembr* 39:195–202.

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.

Yaren H, Mollaoglu H, Kurt B, Korkmaz A, Oter S, Topal T, Karayilanoglu T (2007) Lung toxicity of nitrogen mustard may be mediated by nitric oxide and peroxynitrite in rats. *Res vet Sci* 83:116-22

Yasui F, Ishibashi M, matsugo S, Kojo S, Oomura Y, Sasaki K (2003) Brain lipid hydroperoxide level increases in senescence-accelerated mice at an early age *Neurosci Lett* 350(1): 66-8

Zang LY, Cosma G, Gardner H, Vallynathan V (1998) Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1425: 469-77.

Zhang H, Squadrito GL, Uppu R, Pryor WA. (1999) Reaction of peroxynitrite with melatonin with: a mechanistic study. *Chem Res Toxicol* 12:526-34

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.