



ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Restricción dietaria y envejecimiento: ¿una cuestión de calorías?

Dietary restriction and aging: a matter of calories?

Reinald Pamplona

Departamento de Medicina Experimental, Universidad de Lleida-IRBLleida, Lleida, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

On-line el 31 de mayo de 2010

Introducción

El envejecimiento causa multitud de cambios perjudiciales en el organismo a todos los niveles de la organización biológica, disminuye las capacidades funcionales máximas y la homeostasis, y aumenta la probabilidad de padecer enfermedades degenerativas asociadas a la edad y finalmente la muerte. Todos estos cambios tienen su origen en un pequeño número de causas que operan continuamente a lo largo de toda la vida. Una teoría del envejecimiento debería ser capaz de explicar el carácter progresivo y endógeno del proceso fisiológico de envejecimiento¹. Diferentes especies animales envejecen a velocidades muy diferentes en ambientes similares y estas tasas pueden oscilar, en vertebrados, en un orden de magnitud superior a 40. La hipótesis inicialmente propuesta por Denham Harman de que los radicales libres², y especialmente los de origen mitocondrial^{3,4}, están entre las causas principales del envejecimiento, es consistente con los resultados obtenidos en numerosas investigaciones⁵. Las evidencias demuestran que estos orgánulos celulares son la fuente principal de radicales libres (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y, en consecuencia, estrés oxidativo en tejidos normales sanos. La generación mitocondrial de ROS (mtROS) tiene lugar continuamente durante toda la vida con una intensidad que es específica de la especie⁵ y está determinada endógenamente. La tasa de producción de mtROS es especialmente elevada en tejidos con altas tasas metabólicas aeróbicas tales como el cerebro, el corazón, el músculo esquelético, o incluso el hígado, órganos todos ellos en los que los cambios durante el proceso de envejecimiento son especialmente marcados.

Efecto de la restricción calórica sobre la generación mitocondrial de ROS y el estrés oxidativo

Las evidencias aportadas por los estudios relacionados con la teoría del envejecimiento basada en los radicales libres de origen

mitocondrial permiten explicar, en parte, la variabilidad de la longevidad entre diferentes especies animales. Sin embargo, la correlación con la longevidad (en la dirección apropiada) es condición necesaria pero no suficiente para validar una teoría del envejecimiento, porque correlación no necesariamente significa que tenga que existir una relación causa-efecto. Así, son necesarios estudios experimentales en los que la tasa de envejecimiento pueda ser modificada con el objeto de clarificar si la producción de mtROS y el estrés oxidativo también cambian en la dirección esperada. La restricción calórica (RC) es la manipulación experimental mejor conocida que disminuye la tasa de envejecimiento y aumenta la longevidad en especies tanto de invertebrados como vertebrados, y tiene efectos beneficiosos para la salud en ratones, ratas, y muchos otras especies animales, incluyendo primates⁶ y humanos⁷. Los beneficios inducidos por la RC en invertebrados y vertebrados incluyen mejoras en el estrés oxidativo mitocondrial, con disminución concomitante de la producción de mtROS y la lesión oxidativa al ADN mitocondrial (ADNmt) y otras macromoléculas intracelulares, y un incremento de la longevidad^{8–10}. Estas investigaciones, habitualmente aplicando un 40% de RC, demuestran consistentemente que la RC a largo plazo disminuye significativamente la tasa de generación de mtROS en tejidos de rata incluyendo músculo esquelético, riñón, hígado, corazón y cerebro, mientras que después de una RC a corto plazo (entre semanas y hasta 4 meses) estas disminuciones solo son detectadas en algunos estudios y órganos⁸. No obstante, se ha constatado en ratas y ratones que 6–7 semanas de restricción son suficientes para disminuir, a nivel hepático, la producción de mtROS y la lesión oxidativa a carbohidratos, lípidos, proteínas y ADN, lo que convierte al hígado en un órgano especialmente relevante y útil en estudios experimentales para evaluar a nivel molecular los efectos a corto plazo de la RC sobre el estrés oxidativo. También se ha observado que la disminución en la producción mitocondrial de ROS en ratas expuestas a RC ocurre específicamente a nivel del complejo I de la cadena de transporte electrónico en todos los órganos en los que se ha estudiado hasta el momento (corazón, hígado y cerebro), lo que indica que la eficacia de la cadena

Correo electrónico: reinald.pamplona@mex.udl.cat

respiratoria mitocondrial para evitar la producción de ROS aumenta en los animales sometidos a RC⁸⁻¹⁰. Estos cambios son sorprendentemente similares a los descritos anteriormente comparando especies animales con diferentes longevidades, sugiriendo que puede existir un mecanismo altamente conservado de extensión de la longevidad que es el mismo tanto entre especies como dentro de una misma especie. Es interesante destacar que el descenso en la generación de mtROS observado en ratas restringidas está acompañado de descensos significativos en los niveles de oxidación del ADN y proteínas, siendo dicho grado órgano-dependiente. Estos hallazgos nos inducen a sugerir que la disminución de la tasa de producción de ROS es un mecanismo común utilizado tanto por animales longevos como por animales sometidos a RC con el objeto de disminuir el estado basal de lesión oxidativa a carbohidratos, lípidos, proteínas, y especialmente al ADNmt, y por tanto en las mutaciones del ADNmt y la tasa de envejecimiento.

A pesar de que numerosos estudios han documentado el descenso en la producción de mtROS y lesión oxidativa a macromoléculas durante la restricción calórica, el factor dietético que causa dichos cambios beneficiosos es desconocido. Actualmente se están llevando a cabo investigaciones que tienen precisamente por objeto dilucidar este aspecto. Clarificar que factor/es causan la disminución de la producción de mtROS y el estrés oxidativo y el incremento de la longevidad durante la RC es una forma de desvelar algunos de los mecanismos fundamentales del proceso de envejecimiento. Además, tales tipos de estudios pueden sugerir intervenciones que sean más fácilmente practicables para los seres humanos que la restricción calórica *senso stricto*. Esta muy extendida la idea de que el efecto anti-envejecimiento de la RC se debe a la reducción en la ingesta de calorías por sí mismas más que a una disminución de componentes específicos de la dieta. Sin embargo, algunos hallazgos recientes cuestionan este consenso clásico y se sabe que variaciones en las proporciones de algunos de los principales componentes dietéticos pueden también afectar la longevidad⁸. Se exponen a continuación una selección, ordenada cronológicamente, de estudios relevantes publicados en el período 2003-2010 sobre los efectos biológicos de una restricción dietaria basada en la modificación específica de determinados nutrientes y sus implicaciones en el proceso de envejecimiento.

Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N. *Nutritional control of aging*. **Exp Gerontol.** 2003; 38:47-52.

Durante más de 60 años la restricción calórica ha constituido la única manipulación dietaria que ha demostrado retrasar el proceso de envejecimiento induciendo una extensión de la longevidad media y máxima en diversas especies animales sometidas a una reducción de la ingesta de energía. Más recientemente, sin embargo, una manipulación dietaria alternativa también ha demostrado extender la supervivencia en roedores. Esta intervención consiste en la disminución del contenido de aminoácidos sulfurados en la dieta retirando el contenido en cisteína y restringiendo la concentración de metionina lo que induce un aumento significativo de la longevidad en los roedores sometidos a dicha manipulación nutricional. Con el objetivo de controlar una posible reducción de la ingesta de calorías de los animales sometidos a restricción de metionina, se controlaba e igualaba la ingesta de ambos grupos para que consumieran la misma cantidad. En estas condiciones, los animales sometidos a una restricción de metionina experimentaban un incremento significativo de la longevidad, indicando que dicho efecto era específico de la restricción en metionina y no debido a una reducción de la ingesta calórica. Este efecto se observó en diferentes cepas de ratas con diferentes perfiles de envejecimiento, lo que indicaba que dicha intervención actuaba

modificando la tasa de envejecimiento y no simplemente corrigiendo defectos atribuibles a la cepa.

Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M. *Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance*. **Aging Cell.** 2005; 4: 119-25.

Estudios previos realizados con cepas diferentes de ratas demuestran que una dieta con restricción en el aminoácido metionina (RMet) alarga la longevidad. En este trabajo se documenta que la RMet también aumenta la longevidad en ratones (BALB/cJ x C57BL/6J)F1. Comparados con los ratones control, los ratones RMet mostraron unas concentraciones séricas de IGF-1, insulina, glucosa y hormona tiroidea significativamente menores. Los ratones RMet mostraron también niveles hepáticos significativamente más elevados de RNA mensajero para MIF (macrophage migration inhibition factor), factor del que ya se sabía que mostraba niveles también más elevados en otros modelos de ratones longevos. Los ratones RMet desarrollaron de forma significativamente más lenta la opacidad del cristalino (cataratas) y cambios asociados a la edad en diferentes subpoblaciones de células T. Los ratones RMet también se mostraron dramáticamente más resistentes a la lesión oxidativa a nivel hepático evaluado mediante la inducción de un estado oxidativo severo mediante la administración de dosis tóxicas de acetaminofeno. El espectro de enfermedades terminales en el grupo de RMet fue similar al observado en el grupo control. Los estudios en ratones sobre la biología celular y molecular de la restricción de metionina pueden, en paralelo a los estudios sobre restricción calórica, proporcionar nuevos hallazgos sobre las vías a través de las cuales los factores nutricionales pueden modular la longevidad y las enfermedades asociadas a la edad.

Sanz A, Caro P, Ayala V, Portero-Otin M, Pamplona R, Barja G. *Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins*. **FASEB J.** 2006; 20: 1064-73.

Estudios previos han demostrado que la restricción calórica (RC) disminuye la generación mitocondrial de radicales libres y la lesión oxidativa mitocondrial del ADN y proteínas, y aumenta la longevidad, a pesar de que los mecanismos responsables de dichos efectos son desconocidos. Estudios recientes también han demostrado que la restricción de proteínas (RP) muestra efectos en la misma línea que la RC e independientemente de la restricción de energía. Adicionalmente, diversos hechos vinculan la metionina con el envejecimiento. Así, la restricción de metionina (RMet) sin restricción de energía aumenta, de forma similar a la RC, la longevidad. Con estas premisas, en este estudio se hipotetiza que la RMet es responsable de la disminución de la producción mitocondrial de radicales libres y estrés oxidativo observado durante la restricción calórica y la de proteínas. Para demostrar dicha hipótesis, en este trabajo se sometieron ratas macho a un protocolo dietario idéntico a los estudios precedentes demostrando que la RMet incrementaba la longevidad. Los resultados demostraron, por primera vez, que la RMet significativamente reducía la producción mitocondrial de radicales libres, la lesión oxidativa del ADN mitocondrial, la insaturación de membrana, y los marcadores de lesión oxidativa proteica en mitocondrias de corazón e hígado. La disminución de la generación mitocondrial de radicales libres tenía lugar a nivel de hígado en los complejos mitocondriales I y III, mientras que en corazón tenía lugar exclusivamente en el complejo I. En ambos casos, dicho efecto se debía a un incremento de la eficiencia de la cadena respiratoria evitando la fuga de electrones al oxígeno y

consiguiente formación de radicales libres. En asociación a dicho efecto, también se observó una disminución significativa del contenido mitocondrial del complejo I. Todos estos cambios son sorprendentemente similares a los observados en restricción calórica y de proteínas, sugiriendo que la disminución de la ingesta de metionina es presuntamente responsable de la disminución de la producción mitocondrial de radicales libres y el consiguiente estrés oxidativo, y posiblemente también de parte de la reducción de la tasa de envejecimiento que tiene lugar durante la restricción calórica.

Malloy VL, Krajcik RA, Bailey SJ, Hristopoulos G, Plummer JD, Orentreich N. Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell*. 2006; 5:305-14.

La reducción de la ingesta de metionina (hasta un 0,17% de metionina en la dieta, lo que representa una restricción de metionina del 80%, RMet) y la restricción calórica (RC) aumentan la longevidad en ratas Fischer 344. Aunque los mecanismos de acción de dichas intervenciones no están todavía descifrados, ambos regímenes se caracterizan por una pérdida de peso corporal y reducción de la adiposidad. La reducción de la deposición de grasa durante la RC está asociada a la preservación de la respuesta a la insulina en los animales viejos. En este escenario, el presente estudio realizado en ratas define las condiciones experimentales para evaluar si los efectos de la restricción de metionina (restricción del 80% respecto al grupo control) sobre la adiposidad y respuesta a insulina son análogos a los observados durante la RC. Los resultados demuestran que las ratas sometidas a RMet presentan una reducción significativa de la grasa visceral con un descenso concomitante de la insulina basal, glucosa, y leptina, e incremento de adiponectina y triiodotironina. En una cohorte separada, se constató que la respuesta insulínica de animales viejos con RMet, determinada mediante una prueba de tolerancia oral a la glucosa, era similar a la de animales jóvenes. Y en un estudio longitudinal sobre los efectos de la RMet se observó que la RMet prevenía el aumento asociado a la edad de los lípidos plasmáticos. Colectivamente, estos resultados indicaban que la RMet reducía la grasa visceral y preservaba la actividad insulínica en ratas envejecidas independientemente de la restricción de energía.

Komninou D, Leutzinger Y, Reddy BS, Richie Jr JP. Methionine restriction inhibits colon carcinogenesis. *Nutr Cancer*. 2006; 54: 202-8.

Estudios previos habían demostrado que, en ratas, la restricción de metionina (RMet) a largo plazo aumentaba la longevidad e inhibía los procesos patológicos asociados al envejecimiento. El presente estudio examinó los efectos de la RMet sobre la formación de focos de cripta aberrantes en el colon de ratas tratadas con azoximetano, agente carcinogénico particularmente eficaz en inducir carcinomas de colon. Se denominan focos de cripta aberrantes (FCA) a un conglomerado de glándulas anormales en forma de tubo en el revestimiento del colon y el recto. Los FCA se forman antes que los pólipos colorrectales y son uno de los cambios más tempranos que se pueden observar en el colon que podrían conducir al cáncer. Así pues, los denominados FCA constituyen un precursor del cáncer colorrectal y por lo tanto, pueden ser usados como marcador de carcinogénesis en individuos con un riesgo aumentado. En el presente estudio, realizado con ratas F344 macho, se definió un grupo control (0,86% metionina, dieta control) y un grupo de RMet (0,17% metionina). Transcurrida una semana de la intervención nutricional, se procedió al tratamiento con azoximetano (15 mg/kg/sem, s.c.) durante 2 semanas consecutivas. Diez semanas después de finalizar el tratamiento con azoximetano, se observó una formación de FCA marcada y significativamente menor en las

ratas de RMet (del orden del 80%) comparado con el grupo control. A las 5 semanas ya se había observado una reducción significativa de la proliferación celular colónica. Estos resultados sugerían que la RMet inhibe el desarrollo de tumores colónicos en la rata, efecto que tiene lugar durante las fases post-iniciales de la carcinogénesis y que pueden deberse, en parte, a una inhibición de la proliferación celular colónica.

Ayala V, Naudí A, Sanz A, Caro P, Portero-Otin M, Barja G, Pamplona R. Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007; 62: 352-60.

La restricción calórica (RC) disminuye la lesión oxidativa, lo que contribuye a un enlentecimiento de la tasa de envejecimiento. Se desconoce, sin embargo, si esta disminución es consecuencia de la reducción de calorías por sí mismas o a la de componentes dietarios específicos. En este estudio realizado con ratas Wistar macho, se procedió a aplicar una intervención nutricional consistente en una restricción significativa del 40% del contenido de proteínas (RP) respecto al grupo control. Después de una intervención de 7 semanas de duración, el hígado mostró una disminución significativa de diversos marcadores de lesión oxidativa a proteínas, el grado de insaturación de membrana, y el contenido mitocondrial en complejo I. Estos resultados, junto con observaciones previas, sugieren de forma clara que la disminución de la tasa de envejecimiento inducida por la RP puede deberse en parte a la reducción de la tasa de producción mitocondrial de radicales libres y modificación oxidativa de proteínas y ADN, el incremento en componentes de membrana más resistentes a la lesión oxidativa, y una reducción de la expresión del complejo I, análogamente a lo que acontece durante la RC.

Naudí A, Caro P, Jové M, Gómez J, Boada J, Ayala V, et al. Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation Res*. 2007; 10: 473-84.

El envejecimiento juega un papel central en la aparición y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. La restricción calórica (RC) mitiga el estrés oxidativo reduciendo la tasa de generación de lesión endógena, un mecanismo que puede contribuir al enlentecimiento de la tasa de envejecimiento inducida por dicha intervención. Varios estudios han documentado recientemente una asociación entre metionina y envejecimiento, y la restricción de metionina (RMet) sin restricción energética también aumenta la longevidad. Con estas premisas, en este estudio se hipotetiza que la RMet puede ser responsable, al menos en parte, de la disminución de la lesión oxidativa endógena observada durante la RC. En esta investigación se someten ratas Wistar macho al mismo protocolo dietario de RMet (restricción de un 80%) que se sabe aumenta la longevidad. Los resultados obtenidos en cerebro demostraron que la RMet: 1) disminuía el contenido y actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, así como el contenido de complejo III (los complejos I y III son los responsables de la generación mitocondrial de radicales libres), mientras que los complejos II y IV no se veían afectados. No se detectaron diferencias en el contenido de ATP; 2) aumentó el contenido del factor de biogénesis mitocondrial PGC1 α ; 3) aumentó la resistencia del cerebro al estrés oxidativo y metabólico incrementando el contenido cerebral de la proteína desacopladora UCP4, y 4) redujo la lesión oxidativa del ADN mitocondrial, la lesión oxidativa a proteínas y el grado de insaturación de membrana. No se observaron cambios en el perfil composicional de aminoácidos de las proteínas cerebrales. Así pues, los cambios beneficiosos (en términos de estrés oxidativo) inducidos por la RMet probablemente derivan de la

reprogramación metabólica a nivel celular y tisular que pueden jugar un papel protector clave contra la aparición y progresión de desordenes neurodegenerativos asociados al proceso de envejecimiento.

Perrone CE, Mattocks DA, Hristopoulos G, Plummer JD, Krajcik RA, Orentreich N. *Methionine restriction effects on 11-HSD1 activity and lipogenic/lipolytic balance in F344 rat adipose tissue.* **J Lipid Res.** 2008; 49: 12-23.

La restricción de metionina (RMet) limita, en ratas F344, la adiposidad asociada a la edad. Con el objeto de valorar el mecanismo de resistencia a la adiposidad, en este trabajo se examinó el efecto de la RMet sobre la actividad, a nivel de tejido adiposo, del enzima conversor de cortisona a cortisol 11 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11beta-HSD1). La RMet indujo, en todo el tejido adiposo, la actividad de 11beta-HSD1, correlacionando con un aumento de los niveles tisulares de corticosterona. Se observó, sin embargo, una relación inversa entre la actividad de 11beta-HSD1 y el tamaño del adipocito. Dado que la restricción dietaria controla las tasas lipogénicas y lipolíticas, se procedió a evaluar los efectos de la RMet sobre enzimas de ambas rutas metabólicas. La RMet indujo, en el tejido adiposo, un aumento del contenido en proteína de los enzimas trigliceridolipasa y acetil-CoA carboxilasa (ACC), esta última mostrando también una mayor fosforilación a nivel de residuos de serina lo que originaba un enzima inactivo, sugiriendo alteraciones basales de la lipólisis y lipogénesis. Por el contrario, no se observaron cambios en los niveles basales o fosforilados de lipasa hormona-sensible. Los lugares de fosforilación de ACC eran específicos para la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK); por ello, se procedió a evaluar la activación de AMPK. Los resultados demostraron la existencia de diferencias en las ratas RMet en el contenido de AMPK, grado de fosforilación y actividad exclusivamente a nivel de la grasa retroperitoneal. No se detectaron diferencias en los niveles intracelulares de AMPK y fosforilación de proteína quinasa A. Estudios in vitro también revelaron un incremento significativo de la degradación lipídica y una tendencia (sin llegar a ser significativa) hacia un aumento de la síntesis lipídica, sugiriendo la existencia de un ciclo futile. En conclusión, la RMet indujo cambios lipogénico/lipolíticos que probablemente están en la base de la resistencia a la adiposidad en ratas F344.

Hipkiss AR. *On methionine restriction, suppression of mitochondrial dysfunction and aging.* **Rejuvenation Res.** 2008;11: 685-88.

Ratas y ratones, cuando son sometidos a restricción de metionina (RMet) pueden vivir más con cambios beneficiosos a nivel mitocondrial. La mayor parte de las explicaciones a estas observaciones se han centrado sobre como la RMet suprime los efectos derivados de los radicales libres. En este trabajo teórico se sugiere que los efectos de la RMet sobre el metabolismo proteico deberían ser también considerados cuando se intenta explicar sus más que aparentes acciones anti-envejecimiento. Metionina es el aminoácido iniciador de la traducción del ARN mensajero. Se propone que la RMet disminuye la tasa de biosíntesis proteica debido a la limitación de metionina, lo que conlleva una disminución en la generación de errores proteicos mediados por el ribosoma, lo que a su vez reduce la carga total de proteínas anormales con las que deben tratar las proteasas y chaperonas celulares (tanto mitocondriales como citoplasmáticas). Esto aumentaría las proteasas disponibles para la eliminación de proteínas lesionadas postranscripcionalmente (por ejemplo, oxidadas) y retrasaría la agregación y acumulación de proteínas anormales, el principal «síntoma» del envejecimiento. La menor (enlentecida) tasa de síntesis de proteínas puede también

modificar el plegamiento de las mismas, lo que puede también cambiar su susceptibilidad al ataque oxidativo. La RMet aumentaría también la proteólisis lisosomal, incluyendo la autofagia de mitocondrias disfuncionales, y promovería la mitogénesis. Sin olvidar los potenciales efectos de los metabolitos derivados de metionina como, por ejemplo, S-adenosil metionina, cuyo papel en el silenciamiento génico podría ser también clave y deberían también ser considerados. Todo ello podría explicar, al menos en parte, los efectos beneficiosos de la RMet.

Sun L, Sadighi Akha AA, Miller RA, Harper JM. *Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age.* **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 2009; 64: 711-22.

La longevidad puede alargarse en roedores mediante una restricción en la disponibilidad de alimentos (restricción calórica, RC) o bien proporcionando alimentos con un bajo contenido en metionina (restricción en metionina, RMet). En este trabajo, los investigadores demostraron que un periodo de restricción de alimentos limitado a los primeros 20 días de vida, a través de la ampliación en un 50% del tamaño de la camada, muestran un aumento significativo de la longevidad media y máxima del ratón en comparación con las camadas de tamaño normal y que una RMet iniciada a los 12 meses de edad también aumenta significativamente la longevidad. Además, los ratones expuestos a RC mostraron, a su vez, cambios en el patrón hepático de ARN mensajero, en el de fosforilación de las quinasas Erk, Jnk2 y p38, y en la fosforilación de mTOR y su sustrato 4EBP1, y proteína ligadora HE 1 que no se detectaron en el hígado de los ratones con la misma edad pero sometidos a RMet. Estos resultados introducen nuevos protocolos que pueden aumentar la longevidad y sugieren que el espectro de cambios metabólicos inducidos por la RC y la RMet pueden diferir entre ellos.

McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. *The low-methionine content of vegan diets may make methionine restriction feasible as a life extension strategy.* **Med Hypotheses.** 2009; 72: 125-28.

Estudios recientes confirman que la restricción dietaria de metionina (RMet) aumenta la longevidad media y máxima en ratas y ratones, alcanzando efectos «retardantes» del envejecimiento similares a los de la restricción calórica, incluyendo una disminución de la producción mitocondrial de radicales libres. Aunque una restricción calórica voluntaria es poco probable que gane mucha popularidad como estrategia prolongeva para los humanos, puede ser más factible conseguir una restricción moderada de metionina, a la luz del hecho de que las dietas vegetarianas tienden a ser relativamente bajas en este aminoácido. Las proteínas vegetales (especialmente las derivadas de legumbres y frutos secos) tienden a un menor contenido de metionina que las proteínas animales. Además, el contenido proteico total de las dietas vegetarianas, como una función del contenido calórico, tienden a ser menores que las de las dietas omnívoras, y las proteínas vegetales tienen una menor biodisponibilidad que las proteínas animales. Las dietas vegetarianas globales que moderan la ingesta de judías y soja, mientras que incluyen amplias cantidades de fruta y vino o cerveza, pueden ser bastante bajas en metionina, a la vez que suministran abundantes nutrientes saludables. Además, las dietas vegetarianas bajas en grasas, acopladas a un entrenamiento físico, cabe esperar que promuevan la longevidad reduciendo, entre otras variables, los niveles de insulina e IGF-1; este último efecto estaría amplificado por la restricción en metionina, aunque todavía no está claro si la regulación a la baja de IGF-1 está en la base del impacto de las dietas restringidas en metionina sobre la longevidad en roedores.

Caro P, Gomez J, Sanchez I, Naudi A, Ayala V, López-Torres M, Pamplona R, Barja G. Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. **Rejuvenation Res.** 2009; 12: 421-34.

Un 80% de restricción de metionina de la dieta (RMet) en roedores (sin restricción calórica) aumenta, como la restricción calórica (RC), la longevidad máxima y reduce drásticamente la producción mitocondrial de radicales libres y el estrés oxidativo. Un 80% de RMet también disminuye el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana en hígado de rata. La generación mitocondrial de radicales libres y el grado de insaturación de membrana son los 2 únicos factores conocidos que unen el estrés oxidativo con la longevidad en vertebrados. Se desconoce, sin embargo, si un 40% de RMet, el grado de restricción de metionina relevante para clarificar el mecanismo de acción de una RC estándar del 40%, puede reproducir dichos efectos a nivel mitocondrial en órganos vitales y relevantes para el proceso de envejecimiento. En esta investigación se estudió el efecto del 40% de RMet sobre la producción de radicales libres y el estrés oxidativo en mitocondrias de riñón y cerebro de rata. Para ello, ratas macho Wistar fueron alimentadas durante 7 semanas con dietas semipurificadas difiriendo únicamente en su contenido en metionina: dietas control o 40% RMet. Los resultados obtenidos demostraron que un 40% de RMet reducía la producción mitocondrial de radicales libres y la fuga mitocondrial de los mismos entre un 62-71% a nivel del complejo I tanto en las mitocondrias de cerebro como en las de riñón, aumentó la capacidad de la fosforilación oxidativa de las mitocondrias de cerebro, y redujo la lesión oxidativa al ADN mitocondrial de riñón y la lesión oxidativa proteica en ambos órganos. Un 40% de RMet también indujo una disminución significativa de los complejos respiratorios I, III y IV y el factor inductor de apoptosis (AIF) en las mitocondria de cerebro, y el complejo IV en las mitocondrias de riñón, sin constatar cambios en el grado de insaturación de las membranas mitocondriales tanto de cerebro como de riñón. Un 40% de RMet, a diferencia de un 80% de RMet, no inhibió el incremento en el peso corporal de la rata. Estos cambios fueron muy similares a los previamente descritos durante la restricción calórica y proteica en ratas. Los autores concluyen que la metionina es el factor dietario responsable de la disminución de la producción mitocondrial de radicales libres y el estrés oxidativo, y probablemente de parte del efecto de extensión de la longevidad que tiene lugar en la RC.

Tsai CW, Lin AH, Wang TS, Liu KL, Chen HW, Lii CK. Methionine restriction up-regulates the expression of the pi class of glutathione S-transferase partially via the extracellular signal-regulated kinase-activator protein-1 signaling pathway initiated by glutathione depletion. **Mol Nutr Food Res.** 2010; 54: 1-10.

Actualmente es motivo de creciente interés entender los mecanismos moleculares que subyacen en la regulación génica mediada por aminoácidos. En esta investigación, se exploró si el mecanismo por el cual la restricción de metionina afecta la expresión de la glutatión S-transferasa clase pi (GSTP) estaba relacionado con una posible depleción de glutatión (GSH). Para ello se procedió al cultivo de hepatocitos primarios de rata en ausencia/presencia de butionina sulfoximina (BSO) o con/sin restricción de metionina (RMet) durante 72 h. Tanto BSO como RMet indujeron, con un patrón similar y de una forma tiempo-dependiente, la expresión del ARN mensajero y la proteína de GSTP asociado a una disminución celular de los niveles de GSH. BSO y RMet también estimularon la fosforilación de ERK (extracellular signal-regulated kinase), pero no de «c-Jun NH(2)-terminal kinase» y p38. Asimismo, ambas intervenciones también

incrementaron el contenido de AP-1 (DNA-binding activity of nuclear activator protein-1). Con el inhibidor de ERK FR180204, la activación de AP-1 y la expresión de GSTP fueron abolidas. Además, la inducción de GSTP por RMet y BSO fue revertida por glutatión monoetil ester y N-acetilcisteína. Por todo ello, estos resultados sugieren que RMet regula al alza la expresión génica de GSTP que parece estar iniciada por la vía de señalización ERK-AP-1 y mediada por un reajuste del contenido intracelular de glutatión en hepatocitos de rata.

Perrone CE, Mattocks DA, Jarvis-Morar M, Plummer JD, Orentreich N. Methionine restriction effects on mitochondrial biogenesis and aerobic capacity in white adipose tissue, liver, and skeletal muscle of F344 rats. **Metabolism.** 2010; doi:10.1016/j.metabol.2009.10.023.

La restricción de metionina (RMet) aumenta la longevidad en ratas y ratones y reduce la acumulación asociada a la edad de tejido adiposo en ratas Fischer 344. Estudios recientes han demostrado que el contenido y función mitocondrial del tejido adiposo está asociado con la adiposidad. En este escenario, en este estudio se procedió a examinar la expresión de genes implicados en la biogénesis mitocondrial y capacidad oxidativa en tejido adiposo blanco, hígado y músculo esquelético de ratas Fischer 344 sometidas a una dieta control (0,86% metionina) o con restricción de metionina (0,17% metionina) durante 3 meses. La RMet indujo cambios transcripcionales a nivel de PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) y PGC1alfa y 1beta (peroxisome proliferator-activated receptor coactivators 1α and 1β), y algunos de sus genes diana conocidos en todos los tejidos estudiados. Además, también se observó una respuesta órgano-específica a nivel de proteína. Así, en el tejido adiposo inguinal, la RMet aumentó los niveles de los genes diana de PPAR y PGC1. También indujo el número de copias de ADN mitocondrial, sugiriendo un aumento de la biogénesis mitocondrial, y que se correspondió con un aumento de la actividad citrato sintasa. Por el contrario, RMet indujo cambios en la actividad mitocondrial de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y los niveles proteicos de estearoil-CoA desaturasa 1 solo en hígado, y los niveles de proteína de la proteína desacopladora UCP3 y la subunidad IV de citocromo C oxidasa solo en músculo esquelético. No se observó ningún incremento en el número de copias de ADN mitocondrial a nivel de hígado o músculo esquelético a pesar de detectarse un incremento de la actividad mitocondrial citrato sintasa. Los resultados sugieren que la resistencia a la adiposidad de las ratas sometidas a RMet está asociada a una biogénesis mitocondrial a nivel del tejido adiposo inguinal y un aumento de la capacidad aeróbica mitocondrial en hígado y músculo esquelético.

Elshorbagy AK, Valdivia-Garcia M, Refsum H, Smith AD, Mattocks DA, Perrone CE. Sulfur amino acids in methionine-restricted rats: Hyperhomocysteinemia. **Nutrition.** 2010; doi:10.1016/j.nut.2009.09.017.

La restricción dietaria de metionina (RMet) en ratas Fischer 344 influye favorablemente en la masa grasa visceral, la sensibilidad a insulina, parámetros metabólicos, y la longevidad. Sin embargo, disponemos de poca información sobre los efectos de la RMet en los niveles séricos de metionina y sus metabolitos sulfurados. En este breve estudio, se procedió a investigar el perfil sérico en aminoácidos sulfurados de ratas macho Fischer 344 sometidas a una dieta con restricción de metionina durante 3 meses. Utilizando técnica de espectrometría de masas, los autores observaron una marcada y significativa reducción de las concentraciones séricas de metionina, cistationina, cisteína, y taurina en el grupo de RMet comparado con el grupo control, y una elevación de 2,5 veces la concentración de homocisteína. Estos resultados sugieren que la transulfuración de homocisteína podría estar inhibida por la RMet, y que algunos de los efectos de

la RMet podrían estar mediados por metabolitos sulfurados resultantes del metabolismo de metionina.

Mecanismos de acción de la restricción de proteínas y metionina sobre el estrés oxidativo mitocondrial

La reconsideración de los estudios clásicos llevados a cabo en roedores sobre los efectos de la restricción de proteínas muestran que en la mayoría de las investigaciones se ha observado un incremento en la longevidad máxima⁸, a pesar de que la magnitud del aumento (~20%) fue más bajo que la típicamente descrita para RC (~40%). Esto sugiere que la restricción de proteínas puede ser responsable de alrededor de la mitad (un 50%) de los efectos de prolongación de la longevidad de la restricción calórica. Estudios recientes en *Drosophila* también parecen indicar que dicho efecto sobre la longevidad de la RC no es debido a las calorías por sí mismas, mientras que si serían compatibles con un papel específico para una ingesta proteica disminuida⁸. Esta posibilidad también estaría de acuerdo con los estudios que describen que un 80% de restricción de metionina (RMet) aumenta la longevidad máxima en ratas independientemente de la restricción de energía^{11,12} aunque los mecanismos moleculares responsables de dichos efectos se desconocen.

Acerca de los efectos de la RMet sobre parámetros de estrés oxidativo, se han evaluado los cambios en los niveles de glutathion (GSH) en sangre e hígado¹², pero nunca se han investigado los efectos sobre la producción mitocondrial de radicales libres y la subsiguiente lesión oxidativa a nivel molecular. Se ha observado el aumento de la longevidad máxima en ratas Fisher 344 en al menos 2 estudios independientes^{11,12}, y existen evidencias¹³ que indican que la RMet también alarga la longevidad en al menos otras 3 cepas diferentes de ratas (Brown Norway, Sprague-Dawley y Wistar). También se ha descrito que la RMet aumenta la longevidad en ratones BALB cJ x C57BL/6¹⁴. Estos aumentos de longevidad se acompañaban de unas concentraciones más bajas de GSH hepático y probablemente de una secreción aumentada de GSH desde el hígado a la sangre, causando un incremento sanguíneo de GSH, un aumento de la resistencia a la lesión hepática de origen oxidativo, enlentecimiento en el desarrollo de cataratas, menores cambios con la edad en subpoblaciones de células T (CD8, CD8M, CD4P y CD8P), niveles más elevados de MIF (macrophage migration inhibition factor, que se sabe que aumenta en otros modelos de extensión de la longevidad en roedores), y concentraciones plasmáticas más bajas de glucosa, insulina, IGF-I y T₄¹¹⁻¹⁴. Es interesante destacar que la magnitud esperada del aumento de la longevidad máxima inducido por la RM et al 40% (calculada a partir de la que se encuentra con un 80% RMet) es probablemente similar (22% de incremento) a la observada con un 40% de restricción en proteínas (aproximadamente un 20% aumento en la longevidad máxima). La restricción de calorías y la restricción de proteínas comparten muchos efectos comunes además de prolongar la longevidad, incluyendo activación de la inmunidad celular, o la disminución de las lesiones preneoplásicas y tumores. Las dietas bajas en proteínas, como la RC, también desaceleran la glomerulosclerosis en ratones, retrasan la nefropatía crónica y la cardiomiopatía en ratas, y protegen el hígado de rata contra la exposición a agentes tóxicos⁸. Una extensión de la longevidad menor (pero significativa) en la RP que en la RC también concuerda con la noción ampliamente aceptada de que el envejecimiento es un proceso que tiene su origen en diversas causas. La RC podría disminuir la tasa de envejecimiento a través de la disminución en la producción de mtROS y el estrés oxidativo inducido por la restricción en proteínas, así como a través de otros mecanismos

desconocidos posiblemente inducidos por calorías en sí mismas o por otros componentes de la dieta.

Recientemente se ha observado que 6-7 semanas de una restricción en proteínas del 40% sin una restricción significativa de calorías disminuye la producción de mtROS específicamente a nivel del complejo I, disminuye el % de fuga de radicales libres de la cadena respiratoria y disminuye la lesión oxidativa del ADNmt¹⁵, así como de lípidos y proteínas en mitocondrias de hígado de rata¹⁶, análogamente a como acontece en mitocondrias de hígado de rata después de 6-7 semanas de un 40% de restricción de calorías. Llamativamente, la magnitud, tipo de cambios, mecanismos y sitios de acción de las disminuciones son similares tanto en RP como en RC, mientras que la restricción de lípidos y carbohidratos sin RC no origina dichos descensos^{17,18}. Estos resultados sugieren que la restricción de la ingesta de proteínas puede ser la responsable de las disminuciones de producción de mtROS y estrés oxidativo que tienen lugar durante la RC y, consiguientemente, de parte del aumento de la longevidad que ocurre durante la RC. De acuerdo con esta posibilidad, se sabe que reduciendo progresivamente el nivel de proteínas de la dieta en ratones, de 24% al 12% y del 12% al 6%, disminuye la peroxidación lipídica en hígado, se reducen las actividades de enzimas lisosomales en cerebro, hígado e intestino, y disminuye la acumulación de lipofucsina¹⁹. Por otro lado, recientemente se ha constatado que 6-7 semanas de restricción de metionina sin restricción calórica también disminuye la generación de mtROS, % de fuga mitocondrial de radicales libres, los niveles de oxidación del ADN mitocondrial, y marcadores específicos de modificación proteica de origen oxidativo, en mitocondrias de hígado y corazón de rata²⁰. Esto, junto con el hecho ya sabido de que la RMet aumenta la longevidad en ratas y ratones, y con la disminución inducida por RC y RP en la generación de mtROS, oxidación del ADNmt, y lesión proteica mitocondrial, sugiere de forma clara que la restricción de la ingesta de metionina puede ser la responsable de la disminución de la producción de ROS y estrés oxidativo que tiene lugar en la RC y de parte del aumento de la longevidad inducido por dicha manipulación dietética.

Otras investigaciones recientes también apuntan a una relación entre metionina y envejecimiento⁸. Así, una suplementación excesiva de metionina en la dieta lesiona muchos sistemas orgánicos vitales y aumenta el estrés oxidativo tisular. La suplementación con metionina aumenta los niveles plasmáticos de hidroperóxidos y colesterol-LDL; aumenta los niveles de hierro y la peroxidación lipídica, dienos conjugados, y colesterol en hígado de rata; es hepatotóxica y altera antioxidantes hepáticos como SOD, catalasa, GSH-peroxidasa y GSH en ratas; aumenta el estrés oxidativo en hígado; incrementa los niveles de homocisteína en plasma, corazón y aorta generando angiotoxicidad y degeneración mitocondrial de las células musculares lisas arteriales; acelera el proceso de envejecimiento del sistema vascular en ratas; induce hipertensión y enfermedad coronaria; disminuye los niveles de vitamina E en hígado y corazón, y posiblemente acelera el envejecimiento cerebral. El elevado contenido en metionina presente en la dieta de las sociedades industrializadas puede también predisponer a los seres humanos a las enfermedades cardiovasculares. También son especialmente destacables los efectos negativos de la suplementación con metionina que se han descrito en ratas alimentadas con dietas con contenido elevado de proteínas (50%) y metionina (2%) durante 2 años. Dietas ricas en proteínas (50% de proteína durante 1 semana), y dietas ricas en caseína comparadas con dietas ricas en proteínas de soja, aumentan en las ratas los niveles plasmáticos de carbonilos proteicos y son colesterolémicas y aterogénicas, lo que es especialmente interesante ya que la caseína tiene un contenido significativamente más elevado en metionina que la

proteína de la soja, y puesto que la oxidación de proteínas parece jugar un papel central en la aterosclerosis y otras enfermedades degenerativas.

Un elevado contenido de metionina en la dieta podría ser también perjudicial debido a su conversión a homocisteína. Se ha propuesto que el aumento en los niveles plasmáticos de homocisteína inducido por la suplementación de metionina en la dieta aumenta la producción de radicales libres, lo que conduce a la oxidación de las LDL y la progresión del proceso aterosclerótico. Los niveles de homocisteína aumentan con la edad en humanos y representan un factor de riesgo para el envejecimiento y las enfermedades degenerativas asociadas a radicales libres incluyendo, al menos, la aterosclerosis, trombosis, cáncer, apoplejía, insuficiencia renal crónica y enfermedades degenerativas como la enfermedad de Parkinson. La homocisteína tiene un grupo tiol libre que puede ser fácilmente oxidado conduciendo a la generación de puentes disulfuro entre subunidades de una misma proteína o entre diferentes proteínas. También se ha observado que la unión de glutatión oxidado al complejo I mitocondrial aumenta su tasa de generación de radicales superóxido. Así pues, estas observaciones nos sugieren que la producción mitocondrial de ROS puede estar regulada por agentes tiólicos tales como la homocisteína, ofreciendo un mecanismo molecular plausible que explicaría los efectos de la RMet o su suplementación sobre el estrés oxidativo mitocondrial, la lesión tisular y la longevidad.

Conclusiones

La mayoría de los datos disponibles indican que un 40% de restricción calórica disminuye la tasa de generación de especies reactivas derivadas del oxígeno y reduce la lesión molecular en mitocondrias de diferentes órganos. Las especies longevas también poseen bajos niveles de dichos parámetros en comparación con los de vida más corta, sugiriendo la existencia de al menos un mecanismo común de extensión de la longevidad en ambos casos. Sin embargo, se desconoce qué componente específico de la dieta, si es que existe, causa esos descensos durante la RC. Se sabe que un 40% de restricción de proteínas aumenta la longevidad máxima, y que este aumento es menor (alrededor del 20%) que el observado en un 40% de restricción calórica (alrededor de un 40% de aumento). En el caso de la restricción de metionina, se ha constatado un aumento del 44% de la longevidad máxima, pero este aumento tuvo lugar después de una restricción de metionina del 80%, no del 40%. Así, es probable que un 40% de restricción de metionina aumente la longevidad máxima en menor medida, y que esta sea similar a la observada en la restricción de proteínas, alrededor de un 20% de aumento de la longevidad máxima. Por lo tanto, la disminución de la ingesta de metionina podría ser la responsable de forma total, o en su mayoría, del aumento de la longevidad máxima observado en la restricción de proteína, así como de alrededor del 50% de aumento de la longevidad máxima observado en la restricción calórica. Por otro lado, recientemente se ha observado que un 40% de restricción de proteína sin restricción calórica disminuye la generación de mtROS y la lesión oxidativa a todo tipo de macromoléculas, mimetizando así totalmente la restricción calórica tanto cuantitativa como cualitativamente. Por el contrario, la restricción en lípidos y carbohidratos no induce cambios en

dichos parámetros. Además, se ha observado recientemente que la restricción en metionina también disminuye la generación de mtROS y la lesión molecular en mitocondrias de hígado y corazón de rata. Todos estos hallazgos sugieren que la reducción de la ingesta de metionina durante la RC y RP puede ser la causa de la disminución de la producción de mtROS y lesión oxidativa, y puede ser la responsable en un 50% del aumento de la longevidad observado en la restricción calórica. Muchos otros tipos de estudios también conectan la metionina y sus metabolitos, incluyendo la homocisteína, con el proceso de envejecimiento. En cualquier caso, existe una clara necesidad de desarrollar trabajos experimentales sobre los efectos de la metionina sobre el estrés oxidativo mitocondrial y los mecanismos por los que la RMet conduce a un enlentecimiento del proceso de envejecimiento.

Bibliografía

1. Strehler BL. Time, cells and aging. New York: Academic Press; 1962. [p. 456].
2. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11:298–300.
3. Harman D. The biological clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 1972;20:145–7.
4. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson Jr JE. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol.* 1980;15:575–91.
5. Sanz A, Pamplona R, Barja G. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid Redox Signal.* 2006;8:582–99.
6. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science.* 2009;325:201–4.
7. Pamplona R. Caloric restriction and aging in humans. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2009;44:225–30.
8. Pamplona R, Barja G. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757:496–508.
9. Pamplona R, Barja G. Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res Rev.* 2007;6:189–210.
10. Sanz A, Soikkeli M, Portero-Otín M, Wilson A, Kemppainen E, McIlroy G, et al. Expression of the yeast NADH dehydrogenase Ndi1 in *Drosophila* confers increased lifespan independently of dietary restriction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010. doi:10.1073/pnas.0911539107.
11. Orentreich N, Matias JR, DeFelice A, Zimmerman JA. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr.* 1993;123:269–74.
12. Richie Jr JP, Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy V, Orentreich N, Zimmerman JA. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J.* 1994;8:1302–7.
13. Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N. Nutritional control of aging. *Exp Gerontol.* 2003;38:47–52.
14. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheeloc M. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Ageing Cell.* 2005;4:119–25.
15. Sanz A, Caro P, Barja G. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J Bioenerg Biomembr.* 2004;36:545–52.
16. Ayala V, Niubo A, Sanz A, Caro P, Portero-Otín M, Barja G, et al. Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *J Gerontol Biol Sci Med Sci.* 2007;62:352–60.
17. Sanz A, Caro P, Sanchez JG, Barja G. Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1067:200–9.
18. Sanz A, Gómez J, Caro P, Barja G. Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J Bioenerg Biomembr.* 2006;38:327–33.
19. De AK, Chipalkatri S, Aiyar AS. Some parameters of ageing in relation to dietary protein. *Mech Ageing Dev.* 1983;21:37–48.
20. Sanz A, Caro P, Ayala V, Portero-Otín M, Pamplona R, Barja G. Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J.* 2006;20:1064–73.