

Envejecimiento cerebral y mitocondrias

M. Ortí-Pareja ^a, F.J. Jiménez-Jiménez ^a, J.A. Molina-Arjona ^b

Resumen. Son múltiples las evidencias que corroboran la importancia de las alteraciones mitocondriales en relación con los procesos de destrucción celular que provocan el envejecimiento, así como que el estrés oxidativo es el principal inductor de estas alteraciones. Se han descrito mutaciones del ADN mitocondrial (deleciones, duplicaciones), déficit de la función de los complejos enzimáticos que integran la cadena respiratoria y variadas modificaciones estructurales, todas ellas en relación con la edad. Este daño mitocondrial, provocado por la acción progresiva de los radicales libres con el tiempo, influiría en los mecanismos de mantenimiento de la célula, originando su muerte. En el presente trabajo revisamos los hallazgos más relevantes acerca de las alteraciones mitocondriales en relación con la edad [REV NEUROL 1998; 26 (Supl 1): S 107-11].

Palabras clave. Envejecimiento. Estrés oxidativo. Mitocondria.

BRAIN AGEING AND MITOCHONDRIAS

Summary. There are multiple evidences that corroborate the importance of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of cellular destruction that causes the aging, and that oxidative stress is the main inductor of these alterations. Damage of the mitochondrial DNA (deletions, duplications), defects of the respiratory chain function, and varied structural modifications have been described in humans and animals with the age. This mitochondrial damage, caused by the progressive action of oxidative stress, would influence in the mechanisms of maintenance of the cell, causing its death. We revised the most important discoveries regarding mitochondrial alterations with aging [REV NEUROL 1998; 26 (Supl 1): S 107-11].

Key words. Aging. Mitochondria. Oxidative stress.

INTRODUCCIÓN

Un hecho común en el ciclo de la vida de todos los organismos multicelulares es el declinar progresivo de la eficacia de las funciones fisiológicas, una vez que la fase reproductiva ha terminado, produciéndose así la muerte del organismo [1]. Este proceso degenerativo universal, denominado envejecimiento, ha sido y es uno de los objetivos más importantes en la investigación científica, no sólo para tratar de conocer sus causas, sino también para intentar proponer medios para retrasar su evolución, es decir, intentar obtener una hipotética 'fórmula de la inmortalidad'. Pero aparte de estas interpretaciones 'románticas' de la conducta de la ciencia, es cierto que, en la actualidad, únicamente se dispone de teorías, más o menos basadas en datos demostrados. Dichas teorías establecen que el envejecimiento es el resultado de una acumulación progresiva de defectos celulares como consecuencia de la pérdida de los sistemas defensivos necesarios [2]. Quizás, la hipótesis del envejecimiento más importante en el momento actual es la del estrés oxidativo, en la que se afirma que las sustancias reactivas derivadas del oxígeno (O₂), producidas por el metabolismo aerobio celular, originarían daño oxidativo progresivo en toda la célula, induciendo su degeneración y muerte [1,3].

Otra de las teorías es la que implica a la principal fuente energética celular, la mitocondria. Fruto de la intensa investigación realizada en la última década, se ha puesto de manifiesto la existencia de numerosas alteraciones estructurales, funcionales y genéticas de esta organela asociadas con el envejecimiento [3-5], por lo que se postula que la lesión mitocondrial crónica provocaría

la degeneración celular con el tiempo. Veamos, pues, cuáles son los avances más recientes en el estudio de la degeneración mitocondrial con la edad, y su relación con el estrés oxidativo, una de las principales teorías del envejecimiento.

HIPÓTESIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL ENVEJECIMIENTO

Esta hipótesis está basada en la 'paradoja' de la acción del O₂ en los organismos aerobios, por la que esta molécula sería esencial para el mantenimiento del sistema energético celular, mientras que a largo plazo originaría efectos tóxicos irreversibles. El O₂, tras los procesos metabólicos en los que está implicado (principalmente fosforilación oxidativa), se transforma en agua, generando las denominadas *especies reactivas del oxígeno*, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ion hidroxilo (OH·) y peróxido (O₂·), potentes radicales libres capaces de producir extenso daño oxidativo. En la actualidad, se considera que aproximadamente el 2-3% del O₂ consumido en el metabolismo energético de las células aerobias se transforma en especies reactivas de oxígeno. Una exposición crónica a estos radicales libres, junto con la alteración de los sistemas defensivos celulares, ocasionarían que macromoléculas esenciales para la estabilidad celular, como los ácidos grasos de la membrana, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y las proteínas, se dañaran por la acción de estos tóxicos, dando lugar a la degeneración celular y muerte [1].

Siguiendo esta hipótesis, Miquel et al proponen por primera vez, a finales de la década de los 80, que el daño oxidativo sobre las estructuras mitocondriales podría estar implicado en los procesos de envejecimiento; es la denominada *teoría mitocondrial del envejecimiento* [6-9]. Esta organela es la principal fuente energética celular y consume cerca del 85% del O₂ que utiliza la célula. Por lo tanto, también sería la principal fuente de las especies reactivas del oxígeno, que actuarían sobre los lípidos de membrana mitocondrial, las proteínas de sus sistemas enzimáticos y, fundamentalmente, sobre el ADN mitocondrial (ADNmt), muy susceptible al daño oxidativo. Todo ello produciría un deterioro crónico y progresivo en la mitocondria y, por lo tanto, en la función celular.

Recibido: 15.12.97. Aceptado: 31.12.97.

^a Sección de Neurología. Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Alcalá de Henares, Madrid. ^b Servicio de Neurología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid, España.

Correspondencia: Dr. Miguel Ortí Pareja. Cinco, 6, bajo izda. E-28022 Madrid. Fax: 341-8801825.

Financiado por las Becas FIS (97/5578, 97/1262) y por la Fundación Neurociencias y Envejecimiento.

© 1998, REVISTA DE NEUROLOGÍA

ADN MITOCONDRIAL Y ENVEJECIMIENTO

El ADNmt es una doble cadena de ADN circular de pequeño tamaño, estimado en torno a 16.569 pares de bases. Contiene los genes para la codificación de 13 polipéptidos implicados en la cadena respiratoria mitocondrial y en la fosforilación oxidativa, dos ácidos ribonucleicos (ARN) ribosómicos y 22 ARN de transferencia, imprescindibles para la síntesis proteica en las mitocondrias [10]. Así, la integridad del genoma mitocondrial es esencial para el mantenimiento de la función energética de esta organela y, por lo tanto, de las células. La mayoría de las células somáticas contienen, aproximadamente, 5 ADNmt en cada mitocondria, variando esta cifra según el tejido [11].

El ADNmt está situado en la vecindad de la membrana interna mitocondrial, estructurada donde tienen lugar los procesos de fosforilación oxidativa que proporcionan energía, y donde se generan los radicales libres derivados del oxígeno [3]. El ADNmt es vulnerable a la agresión que producen estos radicales, ya que, al contrario de lo que ocurre con el ADN nuclear (ADNn), carece de los mecanismos de reparación adecuados y no tiene la protección que suponen las histonas [4]. Numerosos estudios han demostrado la existencia de daño oxidativo en el ADNmt, en relación con la edad [4, 12-14], como el descubrimiento de mutaciones (roturas de la doble cadena, daños de bases y deleciones), incremento de 8-oxoguanina (un indicador de alteración oxidativa) en el ADNmt [15], e incluso, recientemente, daño en el genoma mitocondrial inducido por peróxido de hidrógeno (potente agente oxidante) [16].

Mutaciones en el ADNmt

En 1989, Linnane et al, al igual que Miquel et al, proponen también la teoría de que la acumulación de mutaciones en el ADNmt durante la vida de los seres vivos, con la consiguiente alteración de la cadena respiratoria mitocondrial, podría estar implicada en los procesos de envejecimiento [17, 18]. En la presente década han sido numerosos los trabajos publicados en los que se ha demostrado la acumulación de mutaciones en el ADNmt en relación con la edad (Tabla I).

Así, más de una docena de deleciones en el ADNmt han sido identificadas en varios tejidos de humanos en relación con la edad, de las cuales han sido las más frecuentes e importantes las deleciones localizadas en 4.977-bp, 7.436-bp, 6.063-bp y 10.422-bp [32, 34]. La aparición de estas alteraciones del ADN varía no sólo con la edad del sujeto, sino también con el tipo de tejido utilizado. La deleción 4.977-bp es la más frecuente (tanto es así que es conocida como la *deleción común*) y aparece en el ADNmt de varios tejidos humanos a partir de la tercera década de la vida. Sin embargo, la deleción 7.436bp sólo ocurre en el corazón de sujetos en el último tercio de su vida; el resto de alteraciones se detectan en personas mayores de 40 años [34]. Es decir, las deleciones no aparecen en ningún tejido de personas jóvenes, ni en las células sanguíneas de sujetos de cualquier edad. Y, es más, en los sujetos ancianos, las deleciones se detectan más fácilmente en aquellos tejidos con altas demandas de energía. En resumen, estos datos indican que las alteraciones del genoma mitocondrial en forma de deleciones se localizan preferentemente en tejidos posmitóticos (cerebral, músculo esquelético y cardíaco) con alta producción de energía y, por lo tanto, de estrés oxidativo [32, 35-38]. En este sentido, Wei et al, en un reciente trabajo (1996), establecen correlación positiva entre la cantidad de deleciones 4.977-bp y el contenido de peróxido lipídico mitocondrial [32].

Al igual que las deleciones, también se ha descubierto la presencia de duplicaciones en la doble cadena del ADNmt. Así, Lee et al [10], analizando músculos de humanos, determinan un incre-

Tabla I. Mutaciones en el ADNmt en relación con la edad.

Gupta et al 1990 [19]	Modificaciones en el ADNmt de hígado de rata en relación con la edad
Cortopassi et al 1990 [20]	Describen, por PCR, deleciones en el ADNmt en músculo cardíaco y cerebro en adultos normales
Hattori et al 1991 [21]	Analizan tejido cardíaco humano por PCR y detectan un aumento significativo de las deleciones del ADNmt en los pacientes ancianos (sobre todo la deleción 7,4 Kb)
Yen et al 1991 [22]	Analizan tejido hepático por PCR de humanos y descubren una deleción 4.977-bp entre las posiciones 8.469 y 13.477, en todos los pacientes mayores de 50 años
Katayama et al 1991 [23]	Deleción 3.610-bp entre posición 1.837-5.447 en el ADNmt del músculo esquelético de pacientes mayores de 80 años
Simonetti et al 1992 [24]	Incremento significativo de la deleción 4977-bp en tejidos humano en relación con la edad (más llamativo en músculo)
Cooper et al 1992 [25]	Acumulación de la deleción 4.977-bp en 1 de cada 5.000 pacientes de más de 78 años
Yen et al 1992 [26]	De nuevo, analizan tejido hepático por PCR de humanos y descubren una deleción 6.063-bp entre las posiciones 7.842 y 13.9.5, dependiente de la edad
Gadaleta et al 1992 [27]	Deleción 4.834-bp en el ADNmt de tejido hepático de rata
Lee et al 1993 [28]	Acumulación de numerosas deleciones en el ADNmt del músculo esquelético de monos en relación con la edad
Lee et al 1994 [29]	Determinan que la deleción 4.977-bp es la más frecuente en el músculo, hígado y testículos en humanos en relación con la edad
Hsieh et al 1994 [30]	Incremento de las deleciones 4.977-bp, 6.063-bp y 7.436-bp en músculo de humanos mayores de 60 años
Lezza et al 1994 [31]	Establecen relación entre la deleción 4977-bp en el ADNmt y la alteración en la cadena respiratoria mitocondrial en los músculos de pacientes ancianos
Wei et al 1996 [32]	Incremento de las deleciones 4.977-bp y 7.436-bp en tejido de humanos, en relación con niveles de peroxidación lipídica mitocondrial
Filburn et al 1996 [33]	Incremento de la deleción 4,8 Kb en el ADNmt de cerebros de ratas

mento de las duplicaciones en tándem (de 260-bp y 200-bp) en el ADNmt en relación con la edad. Posteriormente, Wei et al [39] describirían hasta 10 tipos de duplicaciones en tándem en tejidos de pacientes ancianos, no apreciándose en jóvenes ni en las células sanguíneas a cualquier edad. Estos investigadores concluyen que, de momento, no puede establecerse una relación significativa entre estas duplicaciones y las deleciones en los pacientes de edad, pero que, indudablemente, constituyen una de las bases de la degeneración mitocondrial causante del envejecimiento.

Presencia de daño oxidativo en el ADNmt

Tanto la 8-hidroxi-deoxiguanosina como la 8-oxo-2-deoxiguanosina, ambas moléculas consideradas como marcadores del daño oxidativo en el ADN, han aparecido significativamente incrementadas en los tejidos de pacientes ancianos [14, 40]. Así, la 8-hidroxi-deoxiguanosina está aumentada hasta 25 veces en el músculo diafragmático de ancianos mayores de 85 años y en tejido cerebral de mayores de 90 años [3], así como en variados tejidos de animales (ratas) [41].

Otras evidencias del daño oxidativo en el ADNmt incluyen la demostración directa, por técnicas PCR, de que el daño inducido por H₂O₂ es más rápido e intenso en el ADNmt que en el nuclear, y que se correlaciona con la pérdida de función mitocondrial [16].

Todos estos estudios sostienen la teoría del daño oxidativo

Tabla II. Alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial, en relación con la edad.

Trounce et al 1989 [43]	Deterioro de la cadena respiratoria mitocondrial, con la edad
Ragusa et al 1989 [44]	Análisis por electroforesis del contenido de proteínas mitocondriales de tejido cerebral, de rata: disminuido con la edad
Yen et al 1989 [45]	Disminución del ratio ADP/O (un indicador de función) de la cadena respiratoria mitocondrial, de tejido hepático humano
Curti et al 1990 [46]	Disminución de la actividad del citocromo c oxidasa (complejo IV de la cadena respiratoria) en tejido cerebral, de ratas envejecidas
Ji et al 1991 [47]	La actividad de varias enzimas relacionadas con la producción energética mitocondrial, muestra un declinar en relación con la edad en el miocardio de ratas
Byrne et al 1991 [48]	Disminución significativa con la edad del complejo III de la cadena respiratoria en tejidos de animal, es y humanos
Torii et al 1992 [49]	Disminución de los complejos I y IV en el tejido diafragmático y muscular de las ratas en relación con la edad
Cooper et al 1992 [25]	Disminución de los complejos I y IV en el músculo esquelético humano en relación con la edad
Benzi et al 1992 [50]	Reducción de los niveles de citocromo c en cerebros de ratas
Byrne et al 1992 [51]	Reducción de los niveles de citocromo c oxidasa en el músculo diafragmático de ancianos
Schapiro et al 1992 [52]	Relación de la edad con el declinar de la función mitocondrial
Bowling et al 1993 [53]	Reducción de la actividad de los complejos I y IV en el tejido cerebral, de primates
Ferrández et al 1994 [54]	Reducción de la actividad de los complejos IV y V en cerebros de ratones
Hsieh et al, 1994 [30]	Disminución de la actividad del citocromo c oxidasa en el músculo humano
Boffoli et al 1994 [55]	Reducción de la actividad de los complejos mitocondriales I, II y IV en músculo humano en relación con la edad
Genova et al 1995 [56]	Pérdida drástica de actividad del complejo I en el tejido cardíaco y hepático de animales
Morel et al 1995 [57]	Reducción de la actividad de los complejos I, III y IV en moscas
Muller et al 1996 [58]	Depleción de los complejos III, IV y V en tejido muscular variado de monos
Desai et al 1996 [59]	Reducción de la actividad de los complejos I, III y IV en músculos de ratones
Lefai et al 1997 [60]	Disminución de la actividad del citocromo c oxidasa en el tejido muscular humano en relación con la edad

mitocondrial: una exposición crónica del ADNmt a los radicales libres generados en la cadena respiratoria mitocondrial podría producir su alteración (en forma de mutaciones, deleciones, duplicaciones, acumulación de derivados oxidativos...), lo cual repercutiría en la síntesis proteica y en el funcionamiento de esta organela [13]. Sin embargo, esta teoría no está del todo demostrada. Si bien es cierto el descubrimiento de estas deleciones en relación con la edad, algunos investigadores ya han afirmado que dichas alteraciones del ADNmt no son lo suficientemente importantes como para provocar un deterioro significativo en la célula. Cooper et al [25], en su estudio de músculo esquelético humano, establecen que la deleción

4.977-bp aparece en 1 de cada 5.000 pacientes mayores de 78 años, frente a 1 de cada 100.000 en jóvenes de 21, pero, aun así, es insuficiente para justificar el grado de afectación de la cadena respiratoria mitocondrial detectada en esos mismos músculos. Lezza et al, un año más tarde [31], describen resultados similares. Las deleciones del ADNmt en relación con el envejecimiento también han sido descubiertas en pacientes afectados por miopatías hereditarias, pero en éstos aparecen con una frecuencia mucho mayor (entre un 30-80% frente al 0,1%) [3]. En definitiva, estos cambios descubiertos podrían considerarse como 'la punta del iceberg' de numerosas alteraciones del ADNmt no detectadas hasta ahora y responsables de la degeneración mitocondrial en relación con la edad.

ALTERACIONES DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN RELACIÓN CON LA EDAD

Una de las principales funciones de la mitocondria es la de generar energía mediante un sistema integrado por cinco complejos de proteínas. Dichas estructuras proteicas, denominadas complejos mitocondriales y situadas en la membrana interna mitocondrial, funcionan como cadenas transportadoras de electrones que catalizan así la fosforilación de ADP a ATP. No es de extrañar, por tanto, que los estudios acerca del funcionamiento mitocondrial a lo largo de la edad estén enfocados hacia estos sistemas productores de energía [42]. Así, las investigaciones realizadas, tanto en tejidos animales como humanos, muestran una disminución de la actividad de estos complejos mitocondriales en relación con la edad (Tabla II).

Como se observa, en los numerosos estudios realizados en el último lustro, se ha detectado una afectación de la cadena respiratoria mitocondrial (fundamentalmente los complejos I, II y IV mitocondriales) en relación con el envejecimiento, tanto en tejido muscular humano como en variados tejidos de animales e insectos. Pero, además, se ha determinado que dichas alteraciones en las estructuras mitocondriales están relacionadas con la producción de radicales libres. Así, Agarwal et al [61] muestran que el daño oxidativo en las proteínas (analizado por el contenido en restos carbonilos) está aumentado en las proteínas mitocondriales de alto peso molecular en relación con la edad; Sohal et al [62-64] indican que el declinar de la función de la citocromo oxidasa está vinculado con el exceso del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno.

A pesar de la aparente unanimidad de resultados, que demostrarían una afectación funcional mitocondrial en relación con la edad, la publicación de recientes trabajos que aportan resultados diferentes ha supuesto un revés importante a esta teoría. Así, Barrientos et al [65], determinando los complejos mitocondriales de 132 personas, afirman que la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en el músculo humano no se afecta con la edad. Un año más tarde, Brierly et al [66] indican que la alteración de la función mitocondrial descrita en la musculatura humana se debe más a la inactividad que al envejecimiento en sí, concluyendo que si las mitocondrias están implicadas en este proceso, debería ser por un mecanismo más sutil que un declinar global de la actividad de la cadena respiratoria.

ALTERACIONES ESTRUCTURALES MITOCONDRIALES ASOCIADAS CON LA EDAD

Se han descrito números cambios de la estructura mitocondrial asociados a la edad, como vacuolización, agrandamiento, inclusiones intramitocondriales paracrystalinas [4,67,68], acumulación de

glucógeno, agregaciones intracitoplasmáticas mitocondriales, pérdida de la matriz, inclusiones lipídicas [69] o bien tubulares y filamentosas [6,70]. Se han hallado cambios en la distribución intracelular de las mitocondrias asociados con el envejecimiento, como lo demuestra el hecho de que la musculatura de pacientes ancianos presente alteraciones similares a las observadas en la miopatía de fibras rojas, así como un incremento en las fibras citocromooxidasa negativas [4]. En un reciente estudio sobre estructura mitocondrial en músculos de humanos se demostró un aumento del área mitocondrial total, de la densidad numérica y de la densidad de volumen en relación con la edad [71].

A nivel molecular, se ha demostrado en la membrana mitocondrial una disminución de los niveles de ácido linoleico así como un incremento de los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena, una clase de ácidos grasos de membrana que exhiben una mayor sensibilidad a la acción de los procesos oxidativos [3,72]. Pero éstas no son las únicas alteraciones detectadas en relación con la edad; también se han descrito aumento de los niveles de colesterol, disminución del contenido de fosfolípidos [73], del potencial de membrana, y aumento de la generación de peróxido en membrana [74]. Quizás, el cambio estructural más significativo (por sus implicaciones directas en la función mitocondrial) es la disminución de los niveles de cardiolipina en la membrana interna mitocondrial. La cardiolipina es un difosfatidil glicerol que desempeña un papel muy importante en la estructura y función mitocondrial, sirve como anclaje de numerosas proteínas a la membrana interna mitocondrial (citocromooxidasa, ADP/ATP translocador, translocador de fosfatos, ATP-sintetasa mitocondrial, proteínas transportadoras y enzimas implicadas en el procesamiento de la carnitina), y está implicada en la permeabilidad y control de gradientes a través de dicha membrana. Se ha demostrado una disminución del contenido de cardiolipina en numerosos tejidos –como cardíaco, hepático y cerebral–, asociado con la edad, hecho que podría suponer una gran alteración en el funcio-

namiento mitocondrial [3,75,76]. Además, la cardiolipina contiene una gran cantidad de ácidos grasos insaturados en comparación con otros fosfolípidos de la membrana interna mitocondrial, lo cual aumenta su sensibilidad a la oxidación. El estrés oxidativo acumulado a lo largo de los años induciría la oxidación de estos ácidos grasos insaturados y, por lo tanto, la disminución de la cantidad de cardiolipina mitocondrial, con la consiguiente repercusión en los enzimas de la membrana interna y disminución de la permeabilidad, contribuyendo así a la degeneración.

CONCLUSIONES

Son múltiples las evidencias que corroboran la importancia de las alteraciones mitocondriales (tanto en el genoma, como en su función y estructura) en relación con el envejecimiento, así como que el estrés oxidativo es el principal inductor de este daño. Quizá el estrés oxidativo sea mayor en el genoma mitocondrial, hecho que demostraría las teorías de Miquel et al. Si bien es cierto que los hallazgos descubiertos hasta ahora no explican del todo la degeneración celular a lo largo del tiempo, sirven para afirmar, cada vez con mayor base científica, que el estrés oxidativo en la mitocondria no es un efecto, sino una de las causas de la destrucción celular con el tiempo.

Pero, además, se abre un posible campo terapéutico desconocido hasta ahora: si se redujera la producción de radicales libres, o bien se aumentararan las defensas celulares, se podría prevenir o, al menos retrasar, dicha degeneración. Por ejemplo, Kim et al [77] demuestran por primera vez en ratas que la restricción proteica y el ejercicio son capaces de preservar la fluidez de membrana y suprimir la producción de especies reactivas del oxígeno. Cabe esperar, pues, que en un futuro la acción terapéutica antioxidante en las mitocondrias suponga un avance, no tanto en el retraso del envejecimiento, sino en el tratamiento de las terribles enfermedades de origen mitocondrial, también producidas por una degeneración en esta organela, incurables en la actualidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Rajindar SS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 1996; 273: 59-63.
- Kowald A, Kirkwood TB. A network theory of ageing: The interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process. *Mutat Res* 1996; 316: 209-36.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10771-8.
- Schapira AHV. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders and aging. In Schapira AHV, DiMauro S, eds. *Mitochondrial disorders in neurology*. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1994.
- Muller Hocker J. Mitochondria and ageing. *Brain Pathol* 1992; 2: 149-58.
- Miquel J, Martínez M. Envejecimiento y muerte neuronal inducida. En Luquin MR, Jiménez-Jiménez FJ, Martínez-Villa E, Molina JA, Bermejo-Pareja F, Coria-Balanzat F, eds. *Mecanismos de muerte neuronal y neuroprotección en enfermedades neurológicas*. *Neurología* 1996; 11 (Supl 3): 7-12.
- Miquel J, Quintanilha AT, Weber H, eds. *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1989.
- Miquel J. An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat Res* 1992; 275: 209-16.
- Miquel J, de Juan E, Sevilla I. Oxygen-induced mitochondrial damage and aging. *EXS* 1992; 62: 47-57.
- Lee HC, Pang CY, Hsu HS, Wei YH. Ageing-associated tandem duplications in the D-loop of mitochondrial DNA of human muscle. *FEBS Lett* 1994; 354: 79-83.
- Schon EA. Mitochondrial DNA and the genetics of mitochondrial disease. In Schapira AHV, DiMauro S, eds. *Mitochondrial disorders in neurology*. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1994.
- Yakes FM, van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 514-9.
- Ozawa T. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 177-89.
- Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27: 647-53.
- De la Asunción JG, Millán A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 1996; 10: 333-8.
- Yakes FM, van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 514-9.
- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1989; 1: 642-5.
- Linnane AW, Zhang C, Baumer A, Nagley P. Mitochondrial DNA mutation and the ageing process: Bioenergy and pharmacological intervention. *Mutat Res* 1992; 275: 195-208.
- Gupta KP, van Golen KL, Randerath E, Randerath K. Age-dependent covalent DNA alterations (I-compounds) in rat liver mitochondrial DNA. *Mutat Res* 1990; 237: 17-27.
- Cortopassi GA, Arnheim N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6927-33.
- Hattori K, Tanaka M, Sugiyama S, Obayashi T, Ito T, Satake T, et al. Age-dependent increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart: Possible contributory factor to presbycardia. *Am Heart J* 1991; 121: 1735-42.
- Yen TC, Su JH, King KL, Wei YH. Ageing-associated 5 kb deletion in human liver mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 124-31.
- Katayama M, Tanaka M, Yamamoto H, Ohbayashi T, Nimura Y, Ozawa T. Deleted mitochondrial DNA in the skeletal muscle of aged individuals. *Biochem Int* 1991; 25: 47-56.

24. Simonetti S, Chen X, DiMauro S, Schon EA. Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: Analysis by quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1180: 113-22.
25. Cooper JM, Mann VM, Schapira AH. Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: Effect of ageing. *J Neurol Sci* 1992; 113: 91-8.
26. Yen TC, Pang CY, Hsieh RH, Su CH, King KL, Wei YH. Age-dependent 6kb deletion in human liver mitochondrial DNA. *Biochem Int* 1992; 26: 457-68.
27. Gadaleta MN, Rainaldi G, Lezza AM, Milella F, Fracasso F, Cantatore P. Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats. *Mutat Res* 1992; 75: 181-93.
28. Lee CM, Chung SS, Kaczowski JM, Weindruch R, Aiken JM. Multiple mitochondrial DNA deletions associated with age in skeletal muscle of rhesus monkeys. *J Gerontol* 1993; 48: B201-5.
29. Lee HC, Pang CY, Hsu HS, Wei YH. Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1226: 37-43.
30. Hsieh RH, Hou JH, Hsu HS, Wei YH. Age-dependent respiratory function decline and DNA deletions in human muscle mitochondria. *Biochem Mol Biol Int* 1994; 32: 1009-22.
31. Lezza AM, Boffoli D, Scacco S, Cantatore P, Gadaleta MN. Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 772-9.
32. Wei YH, Kao SH, Lee HC. Simultaneous increase of mitochondrial DNA deletions and lipid peroxidation in human aging. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 786: 24-43.
33. Filburn CR, Edris W, Tamatani M, Hogue B, Kudryashova I, Hansford RG. Mitochondrial electron transport chain activities and DNA deletions in regions of the rat brain. *Mech Ageing Dev* 1996; 87: 35-46.
34. Wei YH. Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. *Mutat Res* 1992; 275: 145-55.
35. Zhang C, Bills M, Quigley A, Maxwell RJ, Linnane AW, Nagley P. Varied prevalence of age-associated mitochondrial DNA deletions in different species and tissues: A comparison between human and rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 230: 630-5.
36. Kadenbach B, Munscher C, Frank V, Muller Hocker J, Napiwotzki J. Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA. *Mutat Res* 1995; 338: 161-72.
37. Reynier P, Malthiery Y. Accumulation of deletions in MtDNA during tissue aging: Analysis by long PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 59-67.
38. Ozawa T. Mitochondrial DNA mutations associated with aging and degenerative diseases. *Exp Gerontol* 1995; 30: 269-90.
39. Wei YH, Pang CY, You BJ, Lee HC. Tandem duplications and large-scale deletions of mitochondrial DNA are early molecular events of human aging process. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 786: 82-101.
40. Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Takasawa M, Ozawa T. Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Mol Cell Biochem* 1993; 119: 95-103.
41. Takasawa M, Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Ito T, Ozawa T. Age-associated damage in mitochondrial function in rat hearts. *Exp Gerontol* 1993; 28: 269-80.
42. Schapira AH, Cooper JM. Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing. *Mutat Res* 1992; 275: 133-43.
43. Trounce I, Byrne E, Marzuki S. Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: Possible factor in ageing. *Lancet* 1989; 1: 637-9.
44. Ragusa N, Turpeenoja L, Magri G, Lahdesmaki P, Giuffrida Stella AM. Age-dependent modifications of mitochondrial proteins in cerebral cortex and striatum of rat brain. *Neurochem Res* 1989; 14: 415-8.
45. Yen TC, Chen YS, King KL, Yeh SH, Wei YH. Liver mitochondrial respiratory functions decline with age. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 944-1003.
46. Curti D, Giangare MC, Redolfi ME, Fugaccia I, Benzi G. Age-related modifications of cytochrome c oxidase activity in discrete brain regions. *Mech Ageing Dev* 1990; 55: 171-80.
47. Ji LL, Dillon D, Wu E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* 1990; 258: R918-23.
48. Byrne E, Trounce I, Dennett X. Mitochondrial theory of senescence: Respiratory chain protein studies in human skeletal muscle. *Mech Ageing Dev* 1991; 60: 295-302.
49. Torii K, Sugiyama S, Takagi K, Satake T, Ozawa T. Age-related decrease in respiratory muscle mitochondrial function in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 88-92.
50. Benzi G, Pastoris O, Marzatico F, Villa RF, Dagani F, Curti D. The mitochondrial electron transfer alteration as a factor involved in the brain aging. *Neurobiol Aging* 1992; 13: 361-8.
51. Byrne E, Dennett X. Respiratory chain failure in adult muscle fibres: Relationship with ageing and possible implications for the neuronal pool. *Mutat Res* 1992; 275: 125-31.
52. Schapira AH, Cooper JM. Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing. *Mutat Res* 1992; 275: 133-43.
53. Bowling AC, Mutisya EM, Walker LC, Price DL, Cork LC, Beal MF. Age-dependent impairment of mitochondrial function in primate brain. *J Neurochem* 1993; 60: 1964-7.
54. Ferrández ML, Martínez M, de Juan E, Díez A, Bustos G, Miquel J. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in the brain of aged mice. *Brain Res* 1994; 644: 335-8.
55. Boffoli D, Scacco SC, Vergari R, Solarino G, Santacroce G, Papa S. Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1226: 73-82.
56. Genova ML, Castelluccio C, Fato R, Castelli GP, Merlo Pich M, Formigini G, et al. Major changes in complex I activity in mitochondria from aged rats may not be detected by direct assay of NADH: Coenzyme Q reductase. *Biochem J* 1995; 311: 105-9.
57. Morel F, Mazet F, Touraille S, Alziari-S. Changes in the respiratory chain complexes activities and in the mitochondrial DNA content during ageing in *D. subobscura*. *Mech Ageing Dev* 1995; 84: 171-81.
58. Muller Hocker J, Schafer S, Link TA, Possekel S, Hammer C. Defects of the respiratory chain in various tissues of old monkeys: A cytochemical-immunocytochemical study. *Mech Ageing Dev* 1996; 86: 197-213.
59. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, Feuers RJ. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys* 1996; 333: 145-51.
60. Lefai E, Vincent A, Boespflug Tanguy O, Alziari S. Quantitative decrease of human cytochrome c oxidase during development: Evidence for a post-transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1318: 191-201.
61. Agarwal S, Sohal RS. Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging. *Mech Ageing Dev* 1995; 85: 55-63.
62. Sohal RS. Aging, cytochrome oxidase activity and hydrogen peroxide release by mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1993; 14: 583-8.
63. Sohal RS, Dube A. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release and aging. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 621-6.
64. Sohal RS, Sohal BH, Orr WC. Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage and longevity in different species of flies. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 499-504.
65. Barrientos A, Casademont J, Rotig A, Miró O, Urbano Márquez A, Rustin P, et al. Absence of relationship between the level of electron transport chain activities and aging in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 536-9.
66. Brierly EJ, Johnson MA, Bowman AK, Ford GA, Subhan F, Reed JW, et al. Mitochondrial function in muscle from elderly athletes. *Ann Neurol* 1997; 41: 114-6.
67. Feldman ML, Navaratnam V. Ultrastructural changes in atrial myocardium of the ageing rat. *J Anatomy* 1981; 133: 7-17.
68. Frenzel H, Fiemann J. 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* 1984; 27: 24-41.
69. Coleman R, Weiss A, Finkelbrand S, Silbermann M. Age and exercise-related changes in myocardial mitochondria in mice. *Acta Histochem* 1988; 83: 81-90.
70. Vanneste J, van den Bosch de Aguilar P. Mitochondrial alterations in the spinal ganglion neurons in ageing rats. *Acta Neuropathol* 1981; 54: 83-7.
71. Zucchini C, Pugnali A, Pallotti F, Solmi R, Crimi M, Castaldini C, et al. Human skeletal muscle mitochondria in aging: Lack of detectable morphological and enzymic defects. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 37: 607-16.
72. Castelluccio C, Baracca A, Fato R, Pallotti F, Maranesi M, Barzanti V, et al. Mitochondrial activities of rat heart during ageing. *Mech Ageing Dev* 1994; 76: 73-88.
73. Paradies G, Ruggiero FM. Age-related changes in the activity of the pyruvate carrier and in the lipid composition in rat-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1016: 207-12.
74. Sastre J, Pallardo FV, Pla R, Pellin A, Juan G, O'Connor JE, et al. Aging of the liver: Age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology* 1996; 24: 1199-205.
75. Ruggiero FM, Cafagna F, Petruzzella V, Gadaleta MN, Quagliariello E. Lipid composition in synaptic and nonsynaptic mitochondria from rat brains and effect of aging. *J Neurochem* 1992; 59: 487-91.
76. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 165-70.
77. Kim JD, McCarter RJ, Yu BP. Influence of age, exercise and dietary restriction on oxidative stress in rats. *Ageing Milano* 1996; 8: 123-9.