

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Biosíntesis de Coenzima Q:
Mantenimiento de la homeostasis
redox y adaptación metabólica**

**Cristina Parrado Fernández
Córdoba, 2010**

TITULO: *Biosíntesis de coenzima Q: mantenimiento de la homeostasis redox y adaptación metabólica*

AUTOR: *Cristina Parrado Fernández*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2010
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-693-4172-8

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Biosíntesis de Coenzima Q: Mantenimiento de la homeostasis redox y adaptación metabólica

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Cristina Parrado Fernández**,
Licenciada en Biología y en Bioquímica, para optar al grado de **Doctora
en Ciencias**.

Los Directores

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom.

JOSE MANUEL VILLALBA MONTORO
Catedrático de Biología Celular
Universidad de Córdoba

A handwritten signature in blue ink, featuring a series of vertical, slightly curved strokes that resemble the letters 'P' and 'N'.

PLÁCIDO NAVAS LLORET
Catedrático de Biología Celular
Universidad Pablo de Olavide

En Córdoba, a 12 de Mayo de 2010



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

D. JOSE MANUEL VILLALBA MONTORO, DOCTOR EN CIENCIAS Y CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,

INFORMA

Que **CRISTINA PARRADO FERNÁNDEZ**, Licenciada en Biología y en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**BIOSÍNTESIS DE COENZIMA Q: MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS REDOX Y ADAPTACIÓN METABÓLICA**”, que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora en Ciencias

Y para que conste, firmo la presente en Córdoba, a 12 de Mayo de 2010

JOSE MANUEL VILLALBA MONTORO



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

D. PLÁCIDO NAVAS LLORET, DOCTOR EN CIENCIAS POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AMBIENTALES DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE,

INFORMA

Que **CRISTINA PARRADO FERNÁNDEZ**, Licenciada en Biología y Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "**BIOSÍNTESIS DE COENZIMA Q: MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS REDOX Y ADAPTACIÓN METABÓLICA**", que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora en Ciencias

Y para que conste, firmo la presente en Córdoba, a 12 de Mayo de 2010

D. PLÁCIDO NAVAS LLORET

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de los Dres. Jose Manuel Villalba Montoro y Plácido Navas Lloret. Dicho trabajo ha sido subvencionado mediante un Proyecto de Excelencia de la Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía)

Resumen

Introducción

El coenzima Q (ubiquinona o CoQ) es el único antioxidante lipídico endógenamente sintetizado en todos los organismos eucarióticos, funcionando además como intermediario en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria. La restricción calórica (RC) es la única intervención no genética conocida que modula los componentes grasos de la membrana como medida adaptativa contra el daño oxidativo de patologías y procesos biológicos asociadas a la edad. Teniendo en cuenta que la distribución del coenzima Q no es homogénea en el organismo y que los tejidos postmitóticos son más propensos al estrés oxidativo durante el envejecimiento, debería reconsiderarse el efecto conjunto del contenido graso en las dietas con RC en el metabolismo del coenzima Q, ya que el consumo de grasas con distintos grados de insaturación modula directamente la respuesta final de cada tejido al daño oxidativo.

Objetivo general

Estudiar el efecto del componente graso de la dieta y la restricción calórica sobre el sistema del coenzima Q en tejidos mitóticos y postmitóticos de ratones jóvenes.

Objetivos específicos

1. Estudiar la distribución de coenzima Q (niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀ y relación CoQ₉/CoQ₁₀) en el hígado, riñón, cerebro, músculo esquelético y corazón en un estado metabólico basal.
2. Cuantificar los niveles de transcrito de genes *COQ* (*mSPS1*, *mDLP1*, *mCOQ2*, *mCOQ3*, *mCOQ7* y *mCOQ8*), que codifican enzimas responsables de la etapa final de síntesis de coenzima Q, así como los niveles de las proteínas Coq2p y Coq3p, responsables del primer y último paso en la ruta específica de síntesis de CoQ.
3. Establecer el efecto de la RC a corto plazo sobre la distribución de coenzima Q y sobre los niveles de transcrito de genes y proteínas en los órganos indicados anteriormente.

4. Estudiar la influencia del grado de instauración del componente graso de tres dietas (grasa animal altamente saturada, aceite de soja rico en ácido linoleico o aceite de pescado rico en ácidos grasos poliinsaturados n-3) sobre el contenido de coenzima Q, la expresión de genes COQ y los niveles de Coq2p y Coq3p.

5. Estudiar la posible interacción entre la RC y el componente graso de la dieta sobre los parámetros señalados anteriormente.

Material y métodos

Se utilizaron ratones C57BL/6 macho, obtenidos de la *NIA Aging Rodent Colony* (USA) con una edad de 3 meses. Colonias de 18 ratones se distribuyeron de manera aleatoria en 6 grupos dietéticos y fueron alimentados durante un mes con una dieta purificada AIN-93M. Las intervenciones dietéticas fueron: *Ad libitum* (AL)-grasa ternera, RC-grasa ternera, AL-soja, RC-soja, AL-pescado, RC-pescado. Los animales de los correspondientes grupos de RC se alimentaron con una cantidad de dieta correspondiente al 60% de la ingesta calórica de la correspondiente dieta AL, conteniendo todos los componentes vitamínicos y minerales suficientes para asegurar que la ingesta absoluta de vitaminas y minerales fuera la misma para todos los grupos experimentales. Una vez sacrificados, se extrajeron muestras de hígado, riñón, cerebro, músculo esquelético y corazón. Las concentraciones de coenzima Q₉ y Q₁₀ en cada tejido se determinaron mediante HPLC (*High performance liquid chromatography*) de fase reversa con monitorización en un detector electroquímico y ultravioleta; y la integración de las áreas de pico y las correspondientes comparaciones con estándar externos. Igualmente se cuantificaron los niveles de expresión de los genes COQ mediante RT-PCR a tiempo real y se cuantificaron los niveles de las proteínas Coq2p y Coq3p mediante inmunodetección con anticuerpos. Las diferencias estadísticas entre AL y RC se determinaron usando el t-test. Para la comparación entre tejidos se realizó un análisis ANOVA (de una vía). Una vez finalizado el estudio se llevó a cabo un análisis de ANOVA (de dos vías) para estudiar los efectos del componente graso (grasa), RC (calorías) y la interacción “grasa*calorías”. En casos específicos se utilizó un análisis de correlación para estudiar la posible relación entre los ratios mSPS1/mDLP1 y CoQ₉/CoQ₁₀.

Resultados y discusión.

La heterogénea distribución tisular de coenzima Q sitúa al riñón y corazón como los órganos con los niveles más altos de este lípido y al músculo esquelético como el tejido con los niveles más bajos. De acuerdo con estos requerimientos cada tejido presenta un perfil de expresión de genes *COQ* característico, observándose una elevada expresión que se correlaciona con aquellos órganos cuyo metabolismo basal necesita más coenzima Q.

Nuestros resultados manifiestan una evidente y rápida regulación en la vía de síntesis de coenzima Q endógeno a través de la dieta, dejando patente que la RC utiliza esta ruta metabólica para ejercer sus efectos en el organismo. Además, en algunos tejidos este efecto se encuentra condicionado al grado de insaturación del componente lipídico de la dieta, que es incorporado posteriormente por las membranas celulares. Encontramos que la dieta enriquecida con aceite de pescado induce la expresión de genes *COQ* en todos los órganos y tejidos, incluso sin ser sometidos a RC. Esto puede indicar que la incorporación en las membranas de ácidos grasos más prooxidantes activa la expresión de la ruta de síntesis de coenzima Q para poder hacer frente a un posible desajuste redox. En el hígado y riñón de los ratones a los que se les aplica una reducción en las calorías sobre la dieta de pescado, se observa una bajada de los niveles de coenzima Q sin activación de la transcripción de los genes *COQ*. Nuestros datos apoyan que, en estas condiciones, el contenido en coenzima Q se reduce, ajustándose a la existencia de un metabolismo energético más reducido, manteniendo así el equilibrio redox y evitando la generación de especies oxidantes. Estos cambios no se repiten por igual en todos los tejidos, lo cual podría estar relacionado con la existencia de un patrón temporal de respuesta a la RC que es específico del metabolismo energético de cada tejido. El cerebro es el único órgano en el que no se modifican ni la biosíntesis de coenzima Q ni los niveles de coenzima Q con la RC, probablemente porque una alteración de la homeostasis del coenzima Q afecte más a su fisiología. En cambio, este órgano postmitótico (más susceptible a la acumulación de daño oxidativo generado), probablemente manifieste una respuesta muy particular a la RC y al componente lipídico a largo plazo, una vez que se hagan más patentes los procesos de envejecimiento.

Finalmente, observamos que los niveles de proteína Coq3p aumentaban significativamente en aquellas situaciones de RC (independientes del contenido graso de la dieta) donde los niveles de coenzima Q disminuían. Estos resultados sugieren a Coq3p como un sensor de la bajada de coenzima Q por la RC a nivel postranscripcional. Igualmente la RC independiente del contenido graso, disminuye de manera consistente la expresión de los transcritos de *mCOQ8*, de nuevo sugiriendo otra posible diana de la RC para regular la biosíntesis de coenzima Q.

El único órgano donde podría asignarse un papel antioxidante mayor al CoQ₁₀ es el cerebro, cuyos niveles de CoQ₁₀ son muy elevados en comparación con su homólogo CoQ₉ y el resto de tejidos. La RC no parece tener un efecto decisivo sobre la relación CoQ₉/CoQ₁₀. Por su parte, el corazón es el único órgano donde la RC reduce los niveles de CoQ₁₀ en menor proporción que los niveles de CoQ₉.

Glosario de Abreviaturas

ABC1:	Actividad del complejo bc1
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico copia
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ADP	Adenosín difosfato
ALA:	Ácido linolénico
ANOVA:	Análisis de varianza
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP:	Adenosina trifosfato
CoA:	Acetil-coenzima A
COMT:	Catecol-O-metoiltransferasa
Coq1p:	Trans-prenil transferasa
Coq2p:	poliprenil 4-hidroxibenzoato transferasa
CoQ:	Coenzima Q
CpsI:	carbonyl phosphate synthetase I
CPT:	Camptotecina
DEHP	<i>Di(2-ethylhexyl) phthalate</i>
DHA:	Ácido docosahexaenoico
DMQ:	Demetoxi-CoQ
DNQH ₂ :	5-demetoxiubiquinol
DTT:	1,4-Ditiotreitol
EL:	Solución de Elución
ER:	Retículo endoplásmico
FPP:	Farnesil pirofosfato
hDPS1:	decaprenil difosfato sintasa
HHB:	3-hexaprenil 4-hidroxibenzoato
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IPPs:	Isopentenil pirofosfatos
mDLP1:	<i>D-less</i> poliprenil difosfato sintasa
mGAPDH:	Gliceroaldehído 3-fosfato deshidrogenasa

mHPRT:	Hipoxantina ribosiltransferasa
MnSOD	Superóxido dismutasa
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NAD(P)H:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NF:	Factor de normalización
NQO1:	NAD(P)H:quinona oxidorreductasa 1
OMP-sintasa	Orotato fosforibosil transferasa
ORF:	Marco abierto de lectura
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
Pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasas
PMSF:	Phentylmethanesulfonyl fluoride
PPAR α :	Receptor α proliferador de peroxisomas
PTPm	Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial
PUFA:	Ácido graso poliinsaturado
QH ₂ :	Ubiquinol
RC:	Restricción calórica
RIPA buffer:	Radio Immuno Precipitation Assay Buffer
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR:	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction.</i>
RXR:	Receptor reinoide X
SAM/AdoMet:	S-adenosimetionina
SDS:	Sodio duodecil sulfato
SDS-PAGE:	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TOP1:	Topoisomerasa nuclear 1
UCP:	Proteína desacoplante
WB:	Solución de lavado
4-HB:	4-hidroxibenzoato

Índice

Introducción

1. RESTRICCIÓN CALÓRICA.....	3
1.1. RC Y DAÑO OXIDATIVO CELULAR.....	3
1.2. EL COMPONENTE LIPÍDICO DE LA MEMBRANA Y LA RC.....	4
1.3. LA RC Y LA LONGEVIDAD.....	8
2. COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA DIETA	9
2.1. ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES.....	10
3. EL COENZIMA Q: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.....	12
3.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS	13
3.2. FUNCIONES DEL COENZIMA Q.....	14
3.2.1. FUNCIONES MITOCONDRIALES.....	14
3.2.1.1. Transporte de electrones.....	14
3.2.1.2. Los complejos mitocondriales.....	16
3.2.1.3. Proteínas desacoplantes	17
3.2.1.4. Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm).....	17
3.2.1.5. Aceptor final en la síntesis <i>de novo</i> de pirimidinas	18
3.2.2. FUNCIONES EXTRAMITOCONDRIALES.....	18
3.2.2.1. Sistema redox de la membrana plasmática	18
3.2.2.2. Estrés oxidativo. Función antioxidante.	19
3.2.2.3. CoQ y apoptosis	21
4. DISTRIBUCIÓN DEL COENZIMA Q.....	22
4.1. LOCALIZACIÓN INTRAMEMBRANOSA	22
4.2. DISTRIBUCIÓN CELULAR.....	23
4.3. DISTRIBUCIÓN TISULAR	24
4.4. DISTRIBUCIÓN A NIVEL DE ESPECIE.....	25
5. BIOSÍNTESIS DE COENZIMA Q.....	26
5.1. PROTEÍNAS QUE INTERVIENEN EN LA SÍNTESIS DE COENZIMA Q.....	29
5.1.1. Coq1p	29
5.1.2. Coq2p	30
5.1.3. Coq3p	31
5.1.4. Coq4p	32
5.1.5. Coq5p	32
5.1.6. Coq6p	33
5.1.7. Coq7p	34
5.1.8. Coq8p	35
5.1.9. Coq9p	36
5.2. TEORÍA DE UN COMPLEJO MULTIFUNCIONAL DE PROTEÍNAS COQ.....	37
6. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE Q	39
6.1. ESTUDIOS EN <i>Escherichia Coli</i> Y <i>Sacharomyces Cerevisiae</i>	39
6.2. ESTUDIOS EN MAMÍFEROS.....	41

6.2.1.	INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE CoQ	41
6.2.1.1.	Compuestos exógenos	41
6.2.1.2.	Regulación de la vía de mevalonato	42
6.2.1.3.	Metabolitos intermediarios	43
6.2.2.	ACTIVADORES DE LA SÍNTESIS DE CoQ	43
6.2.2.1.	Incorporación de CoQ	43
6.2.2.2.	Hormonas	44
6.2.2.3.	Temperatura	44
6.2.2.4.	Ejercicio	44
6.2.2.5.	Receptores nucleares	45
7.	IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN DEL COENZIMA Q	46

Objetivos

1. OBJETIVO GENERAL.....	51
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51

Material Y Métodos

1. ANIMALES.....	55	
2. INTERVENCIÓN DIETÉTICA	55	
3. TOMA DE MUESTRAS	56	
4. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS QUINÓNICOS	57	
5. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COENZIMA Q EN HPLC.....	58	
6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	60	
7. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL	61	
7.1.	SELECCIÓN DE CEBADORES	61
7.2.	VALIDACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS CEBADORES	62
7.2.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	62
7.2.2.	Electroforesis en gel de agarosa.....	62
7.3.	OBTENCIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR.....	62
7.3.1.	Purificación de productos de pcr.....	62
7.3.2.	Cuantificación de productos de PCR	63
7.4.	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	63
7.4.1.	Aislamiento de ARN.....	63
7.4.2.	Tratamiento con DNAasa I	64
7.4.3.	Síntesis de ADN _c	64
7.5.	RT-PCR A TIEMPO REAL.....	64
7.5.1.	Condiciones de PCR	64
7.6.	CONTROL INTERNO.....	65
8. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS	66	
8.1.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PROTEICAS.....	66
8.2.	ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE)	67
8.3.	ELECTROTRANSFERENCIA (<i>Western-Blot</i>)	67
8.4.	TINCIÓN CON ROJO PONCEAU.....	67
8.5.	REVELADO CON ECL.....	68
8.6.	ANÁLISIS DE IMAGEN.....	68
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	69	

Resultados

1. CARACTERÍSTICAS BASALES DEL CONTENIDO DE COENZIMA Q Y EXPRESIÓN DE GENES COQ.....	73
1.1. DISTRIBUCCION TISULAR DEL COENZIMA Q	73
1.1.1. Niveles de CoQ ₉ Y CoQ ₁₀	73
1.1.2. Relación CoQ ₉ /CoQ ₁₀	74
1.2. EXPRESIÓN DE GENES RESPONSABLES DE LA SÍNTESIS DE CoQ Y VALIDACIÓN A NIVEL DE PROTEÍNA	75
1.2.1. Niveles de expresión génica y de proteína	76
1.2.1.1. <i>mCOQ1</i>	76
1.2.1.2. <i>mCOQ2</i>	78
1.2.1.3. <i>mCOQ3</i>	79
1.2.1.4. <i>mCOQ7</i>	80
1.2.1.5. <i>mCOQ8</i>	81
2. EFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA SOBRE EL SISTEMA DEL CoQ.....	82
2.1. DISTRIBUCIÓN TISULAR DEL COENZIMA Q EN ANIMALES SOMETIDOS A RESTRICCIÓN CALÓRICA	82
2.1.1. Niveles de coenzima Q	82
2.1.2. Relación CoQ ₉ /CoQ ₁₀	83
2.2. CAMBIOS INDUCIDOS POR LA RESTRICCIÓN CALÓRICA EN LA EXPRESIÓN DE GENES Y PROTEÍNAS COQ	84
2.2.1. <i>mCOQ1</i>	85
2.2.2. <i>mCOQ2</i>	86
2.2.3. <i>mCOQ3</i>	87
2.2.4. <i>mCOQ7</i>	88
2.2.5. <i>mCOQ8</i>	88
3. EFECTO DEL COMPONENTE LIPÍDICO DE LA DIETA SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LA RC.....	90
3.1. DISTRIBUCIÓN DE COENZIMA Q	91
3.1.1. COENZIMA Q ₉	91
3.1.2. COENZIMA Q ₁₀	93
3.1.3. RATIO CoQ ₉ /CoQ ₁₀	96
3.2. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE BIOSÍNTESIS DE COQ Y NIVELES DE PROTEÍNA	98
3.2.1. Comparación de los valores de expresión en las dietas <i>ad libitum</i> y perfil de proteína	98
3.2.1.1. <i>mCOQ1</i>	99
3.2.1.2. <i>mCOQ2</i>	100
3.2.1.3. <i>mCOQ3</i>	102
3.2.1.4. <i>mCOQ7</i>	103
3.2.1.5. <i>mCOQ8</i>	104
3.2.2. Efecto de la RC y componente lipídico sobre la expresión de los genes COQ.	105
3.2.2.1. <i>mCOQ1</i>	105
3.2.2.1.1. <i>mSPS1</i>	105
3.2.2.1.2. <i>mDLP1</i>	106

3.2.2.2.	<i>mCOQ2</i>	107
3.2.2.3.	<i>mCOQ3</i>	108
3.2.2.4.	<i>mCOQ7</i>	109
3.2.2.5.	<i>mCOQ8</i>	110
3.2.3.	Efecto de la RC y componente lipídico sobre los niveles de proteínas COQ.....	111
3.2.3.1.	Coq2p.....	111
3.2.3.2.	Coq3p.....	112
3.3.	EFFECTO DE LA RC EN LA RELACIÓN <i>mSPS1/mDLP1</i> Y LA RELACIÓN <i>Q₉/Q₁₀</i> EN LAS TRES INTERVENCIONES DIETÉTICAS	113
3.3.1.	Hígado.....	114
3.3.2.	Riñón.....	115
3.3.3.	Cerebro.....	116
3.3.4.	Músculo.....	117
3.3.5.	Corazón.....	118

Discusión

1.	ESPECIFICIDAD TISULAR DE LA BIOSÍNTESIS Y CONTENIDO DE COENZIMA Q	122
2.	ADAPTACIÓN METABÓLICA DE LA BIOSÍNTESIS DE COENZIMA Q CON LA RESTRICCIÓN CALÓRICA Y SU INTERACCIÓN CON EL COMPONENTE GRASO DE LA DIETA EN RATONES JÓVENES	128
2.1.	HÍGADO.....	131
2.2.	RIÑÓN.....	134
2.3.	CEREBRO.....	137
2.4.	MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	141
2.5.	CORAZÓN.....	144
1.	¿EXISTE RELACIÓN ENTRE LA DIETA, LA RELACIÓN <i>mSP1/mDLP1</i> Y LA LONGITUD DE LA CADENA DE ISOPRENOS?	148

Conclusiones.....153

Bibliografía.....157

Anexos

ANEXO I:	Soluciones utilizadas en la metodología.....	185
ANEXO II:	Análisis post hoc del contenido de CoQ ₉ Y CoQ ₁₀ y ratio CoQ ₉ /CoQ ₁₀	186

Introducción

1. RESTRICCIÓN CALÓRICA

La Restricción Calórica, sin malnutrición, es la única intervención no genética que, de manera consistente, retarda los procesos asociados al envejecimiento y extiende la longevidad máxima en roedores de laboratorio (Weindruch *et al.* 1988). Además, la RC retrasa la aparición del cáncer, nefropatías, cataratas, diabetes, hipertensión e hiperlipidemia en estos mamíferos (Weindruch and Sohal 1997).

A mediados de los años noventa, se abrieron numerosas líneas de investigación encaminadas a entender los mecanismos por los cuales la RC extiende el ritmo de envejecimiento biológico en roedores, pues se hipotetizaba que esta intervención inducía numerosos cambios complejos difíciles de aislar en el organismo. Se encontraron cinco posibles vías que pudieran explicar los mecanismos de respuesta del organismo ante dicha intervención y que no eran excluyentes entre sí: disminución del estrés oxidativo (Sohal and Weindruch 1996), disminución de la glicación y glicoxidación (Kristal and Yu 1992), disminución de la temperatura corporal asociada al estado hipometabólico (Walford and Spindler 1997), cambios neuroendocrinos (Nelson *et al.* 1995); y alteraciones en la expresión de genes y degradación de proteínas (Xia *et al.* 1995).

1.1. RC Y DAÑO OXIDATIVO CELULAR

En 1956, Denham Harman (Harman 1956) postuló una teoría que proponía que las interacciones deletéreas de los radicales libres con los constituyentes celulares contribuían al desarrollo de los procesos biológicos desencadenados durante el envejecimiento. Actualmente sigue siendo una de las teorías más aceptadas para explicar sus causas. El organismo produce un gran número de especies reactivas de oxígeno (ROS) cuya formación se atribuye a procesos vitales de la célula donde intervienen las enzimas de los peroxisomas, oxidasas citosólicas, citocromo P-450, procesos inflamatorios y metabolismo aerobio.

Una disminución del daño oxidativo con RC (Sohal and Weindruch 1996) debería derivar de la reducción de ROS producidas en la mitocondria, principalmente en tejidos post-mitóticos los cuales tienen mayor dependencia del metabolismo redox, incluyéndose entre éstos al músculo, corazón y cerebro. La pérdida de células post-mitóticas durante el envejecimiento, debería ser particularmente deletéreo en el organismo, debido a la incapacidad del tejido por reemplazar dichas células.

Se han realizado diversos estudios para investigar si la RC altera la producción de ROS alterando el daño oxidativo celular. En roedores una RC del 30-40% atenúa la tasa de generación de especies reactivas en las mitocondrias (Sohal et al. 1994b; Bevilacqua et al. 2004; Hagopian et al. 2005), no se detecta un incremento en el daño oxidativo de lípidos (Kim et al. 1996; Lass et al. 1998) ni en proteínas mitocondriales asociados a la edad (Sohal et al. 1994b; Lass et al. 1998); y además se retarda la acumulación de daño oxidativo en distintos tejidos (Sohal et al. 1994a). Por otro lado, Kaneko y colaboradores, (Kaneko et al. 1997) demostraron que en el riñón, corazón, hígado y cerebro de ratas, la restricción en la dieta retrasa la aparición de un marcador de daño oxidativo en el ADN (Ácido desoxirribonucleico) que sí se incrementa en ratas más viejas.

Estos descubrimientos apoyan la idea de que un descenso en el estrés oxidativo con la RC puede ser un mecanismo que contribuye al retardo del envejecimiento.

1.2. EL COMPONENTE LIPÍDICO DE LA MEMBRANA Y LA RC

Hulbert, (Hulbert 2003) propuso que el gasto energético de membrana en reposo, relacionado anteriormente con los procesos de envejecimiento (Pearl 1928), era en alguna medida dependiente del componente lipídico de dichas membranas. Si eso se cumple, es tentativo hipotetizar que un mecanismo de acción de la RC en la célula sea modificar el componente lipídico de la membrana, alterando así el gasto energético celular contribuyendo en la extensión de la longevidad.

Existe una teoría denominada “marcapasos de membrana” que postula que la poliinsaturación de las membranas acentúa la actividad molecular de muchas proteínas de membrana y de esta manera la actividad metabólica de la célula. Este mecanismo se basa en una notable transferencia de energía durante las colisiones intermoleculares de las proteínas de membrana con dobles enlaces de carbono (C=C) de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), en comparación con enlaces simples de carbono de cadenas acilo saturadas, así como en la distribución de tales enlaces a través de la bicapa cuando las membranas contienen cadenas acilo poliinsaturadas en vez de monoinsaturadas (Hulbert and Else 1999). La bicapa lipídica es metabólicamente más activa cuanto más poliinsaturada sea. Por otro lado, el gasto energético en reposo de la membrana está determinado por sus grupos acilo, implicados en la depresión metabólica, control hormonal del metabolismo, evolución de la endotermia, así como sus implicaciones en el envejecimiento y salud humana (Hulbert and Else 2000). En conclusión, la membrana plasmática y su composición pueden actuar como marcapasos de los distintos procesos que contribuyen al gasto energético de la membrana como ocurre por ejemplo con la fuga de protones, la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, reciclado de Ca^{2+} y el recambio lipídico.

Los mecanismos exactos de la fuga de protones a través de la membrana interna mitocondrial son aún desconocidos, aunque se proponen a los lípidos de membrana, la adenina nucleótido translocasa y las proteínas desacoplantes como reguladores de la velocidad de paso de los protones. Se ha propuesto un mecanismo por el cual los ácidos grasos de cadena larga aumentan la fuga de protones alterando el grado de empaquetamiento de la membrana (Brand *et al.* 1994). De hecho varios experimentos correlacionan inversamente al ácido linoleico (C18:2n-6) con la fuga de protones y positivamente con el ácido docosahexaenoico (DHA) (C22:6n-3) (Brand *et al.* 1994; Porter *et al.* 1996; Brookes *et al.* 1998). Por otro lado, la RC a largo plazo incrementa el ácido linoleico de la mitocondria y disminuye el contenido de docosahexanoico (Laganiere and Yu 1989, 1993). Esto hace sospechar que la RC podría ayudar a disminuir la fuga de protones si los lípidos fueran determinantes en este proceso. Estudios recientes confirman una bajada en la respiración dependiente de la fuga de protones por la RC en tejido muscular

Introducción

esquelético (Bevilacqua *et al.* 2004), aunque no ocurre lo mismo en hígado hasta los 18 meses en RC. Otro mecanismo posible que explica la disminución de la fuga de protones es mediante el coenzima Q, un lípido hidrofóbico que al acumularse en el centro de las bicapas lipídicas interfiere en el paso de agua cargada en la membrana (Haines 2001).

En cuanto a la actividad de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, ésta se correlaciona positivamente con el contenido de ácido docosahexaenoico en la membrana (Turner *et al.* 2003). Este lípido parece estar estrechamente relacionado con la máxima actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ debido a su elevada área superficial molecular (Wu *et al.* 2001; Else *et al.* 2003). De forma contraria actúan el colesterol y el CoQ. El colesterol parece impedir el paso de moléculas de agua en la membrana y la formación de cadenas de transferencia de iones Na^+ . El CoQ, por su parte, inhibe la fuga de protones al acumularse en el centro de la bicapa lipídica, formando así una barrera que impide el movimiento del Na^+ entre las dos caras de la bicapa (Haines 2001). Si tenemos en cuenta que la RC incrementa en contenido en CoQ (De Cabo *et al.* 2004) y disminuye el ácido docosahexaenoico (Laganieri and Yu 1989, 1993), la RC debería disminuir la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$. De momento, únicamente se ha confirmado en eritrocitos de rata (Tarim *et al.* 1997) y en yeyuno de oveja (Rompala *et al.* 1987).

Dada su localización y composición particulares, la membrana plasmática está implicada en la respuesta celular frente al estrés oxidativo, y puede regular la fisiología celular controlando la relación de la célula con su ambiente. Como hemos citado anteriormente, existen estudios donde se observa que la RC disminuye la concentración de ROS. Estas especies reactivas se generan predominantemente en la membrana mitocondrial (Boveris and Chance 1973) y la membrana plasmática (O'Donnell and Azzi 1996). Cabe pensar que otro mecanismo de acción de la RC en la membrana, además de su intervención en los procesos celulares que controlan el gasto energético de la célula, sea la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos en las membranas, pues se ha demostrado que este cambio podría contribuir a la extensión de la longevidad haciendo las membranas más resistentes al daño oxidativo (Yu *et al.* 2002).

Los lípidos de membrana pueden afectar a la producción de ROS mediante su interacción con los complejos de transporte electrónico. Existen algunos estudios en los cuales se ha investigado la susceptibilidad de la membrana al estrés oxidativo (Pamplona *et al.* 2002), pero aún se ha dedicado poco esfuerzo por determinar el papel potencial que la composición lipídica de la membrana tiene en la regulación de la generación de ROS. Sí se conoce por ejemplo, el papel de la cardiolipina, un lípido necesario para la actividad adecuada de la cadena mitocondrial, que es requerido para asociarse a los complejos de transporte de electrones I (Fry and Green 1981), III (Fry and Green 1981; Hoch 1992), IV (Fry and Green 19802; Robinson *et al.* 1990) y V (Lopez-Moratalla *et al.* 1973) y conseguir una actividad óptima. Este caso podría constituirse como un método indirecto de la membrana para alterar la producción de ROS modificando la actividad de la cadena mitocondrial.

Ya que la membrana plasmática es el punto inicial de ataque de los oxidantes extracelulares, son de gran importancia los sistemas de óxido-reducción capaces de regenerar antioxidantes en esta localización, ya que éstos pueden proteger los componentes intracelulares del daño oxidativo (Se explica con mayor detalle en el apartado 3.2.2.2.).

Los sistemas de transporte electrónico, tanto en la membrana mitocondrial como en la plasmática, contribuyen a la defensa antioxidante manteniendo el coenzima Q en su estado reducido. El ubiquinol (CoQ reducido) funciona como antioxidante, bien directamente, reaccionando con los radicales y previniendo así la peroxidación lipídica, o indirectamente, regenerando el α -tocoferol hasta su forma reducida (James *et al.* 2004). Por tanto, las interacciones entre los sistemas de transporte de electrones y el CoQ juegan un importante papel determinando la resistencia de las membranas al daño oxidativo. Además, el contenido global de CoQ en la membrana puede influir tanto en la actividad de transporte electrónico, como en la susceptibilidad de la misma al daño por oxidación.

Algunos estudios se han propuesto investigar el efecto de la RC sobre el contenido mitocondrial de CoQ, en un intento por determinar si el menor daño oxidativo que tiene lugar con la RC se asocia con unos niveles mayores de CoQ mitocondrial. Así, se ha publicado que la RC incrementa el contenido en CoQ₉ del músculo esquelético (Lass *et al.* 1999a). De manera similar, la RC

prolongada también incrementa el contenido en CoQ₉ de mitocondrias de hígado, corazón, y riñón (Kamzalov and Sohal 2004). En contraste con estos resultados, en otro estudio se manifestaba que la RC prolongada disminuía el contenido tanto de CoQ₉ como de CoQ₁₀ en mitocondrias de hígado (Armeni *et al.* 2003).

Los cambios inducidos por la RC en el sistema antioxidante de la membrana plasmática se han estudiado recientemente en hígado de rata (De Cabo *et al.* 2004). Las disminuciones relacionadas con la edad en la relación CoQ₁₀/CoQ₉ y en los niveles de α -tocoferol de la membrana plasmática se atenuaron por la RC, y el transporte electrónico a través de la membrana plasmática, dependiente del CoQ, así como la translocación de NQO1 (NAD(P)H:quinona oxidorreductasa 1) a la membrana plasmática fueron también incrementados de manera significativa por la RC. En consecuencia, la membrana plasmática de los animales sometidos a RC mostró una mayor protección frente al estrés oxidativo. Por tanto, las modificaciones inducidas por la RC en el sistema redox de la membrana plasmática podrían no sólo mantener una mayor reducción de NAD(P)H (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido), sino también una mayor capacidad antioxidante, previniendo la acumulación de macromoléculas deletéreas durante el envejecimiento (De Cabo *et al.* 2004). No obstante, aún se requiere más trabajo para determinar el patrón temporal de los cambios inducidos por la RC en el sistema redox de la membrana plasmática en múltiples tejidos.

1.3. LA RC Y LA LONGEVIDAD

Se ha propuesto que la longevidad se encuentra inversamente relacionada con el grado de insaturación de los fosfolípidos de las membranas (Pamplona *et al.* 2002; Hulbert 2003). Esta “teoría de las membranas en el envejecimiento” surge de estudios comparativos en los cuales se ha investigado la relación entre ácidos grasos de las membranas y la longevidad. Cuando se realizan comparaciones entre especies, los estudios llevados a cabo en mamíferos indican que el número de dobles enlaces de los fosfolípidos mitocondriales está inversamente relacionado con la longevidad (Pamplona *et al.* 1998). De manera similar, las comparaciones entre aves y mamíferos de

tamaño corporal similar indican que las aves poseen una mayor longevidad y menos PUFA en los fosfolípidos del músculo esquelético (Hulbert 2003) y el corazón (Pamplona et al. 1999a; Pamplona et al. 1999b) que los mamíferos. Los átomos de carbono que forman un doble enlace en los ácidos grasos poliinsaturados son los más susceptibles al ataque oxidativo por los radicales libres. Los productos de esta peroxidación lipídica, como el hidroxinonenal, son a menudo reactivos por si mismos, y pueden causar un daño ulterior en otros componentes celulares. Por tanto, la disminución en el número de dobles enlaces de los ácidos grasos de las membranas puede constituir una adaptación de las especies más longevas para prevenir el desarrollo y la acumulación de daño oxidativo.

La RC podría actuar de una manera similar, ya que los estudios llevados a cabo en hígado de rata han demostrado que la RC se encuentra también asociada con una reducción en el contenido mitocondrial de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Laganiere and Yu 1989, 1993). Estudios llevados a cabo en bazo (Laganiere and Fernandes 1991; Venkatraman and Fernandes 1992), cortex cerebral (Tacconi et al. 1991), y corazón (Lee et al. 1999b) en la rata, también han apoyado la idea de que la RC disminuye la insaturación de los lípidos de membrana. Estos resultados han conducido a la teoría que establece que la RC puede incrementar la longevidad suprimiendo el daño oxidativo a través de la modulación de la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos en los tejidos (Yu et al. 2002).

2. COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA DIETA

La influencia de la nutrición sobre el proceso de envejecimiento y diversas patologías parece cada vez más evidente. En concreto, una alteración crónica en el patrón lipídico de la dieta, podría generar una enfermedad cardiovascular, reduciendo así la expectativa de vida del individuo.

El efecto de la dieta sobre el organismo, se manifiesta a través de los procesos asociados a la generación de ROS, aunque no se descartan otras agresiones celulares. Como ya hemos demostrado, la RC podría tener efectos

terapéuticos beneficiosos para luchar contra ROS y en consecuencia aplicarse como terapia antienviejimiento en la población humana.

Pero el componente graso de la dieta condiciona de manera importante los parámetros bioquímicos celulares, especialmente en la membrana mitocondrial (Mataix et al. 1998; Quiles et al. 1999a). La importancia del tipo de ácidos grasos de la dieta reside en el hecho de que las membranas biológicas son capaces de adaptar la composición de sus fosfolípidos a la grasa ingerida de forma mayoritaria (Huertas et al. 1991b; Ochoa-Herrera et al. 2001). De esta manera el sistema de transporte electrónico mitocondrial se adapta al tipo de grasa de la dieta, con mayor o menor repercusión sobre los diversos complejos del sistema. (Huertas et al. 1991a; Quiles et al. 2001; Battino et al. 2002b) Es estrés oxidativo está relacionado con la composición lipídica de las membranas, de forma que una fuente grasa poliinsaturada como el aceite de soja o de pescado generará membranas más susceptibles al daño oxidativo que una fuente saturada (grasa animal) o monoinsaturada como el aceite de oliva. Estas características han sido demostradas en numerosas publicaciones empleando modelos animales y humanos (Quiles et al. 1999b; Ramirez-Tortosa et al. 1999; Battino et al. 2002a; Ochoa et al. 2002; Quiles et al. 2002). Por tanto, la elección del tipo de aceite empleado en nuestra alimentación, regula en cierto modo la longevidad de los distintos órganos a lo largo de la vida.

2.1. ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES

Los ácidos grasos esenciales para el organismo humano son el ácido linoleico, precursor de la serie n-6, y el ácido α -linolénico, precursor de la serie n-3. Ambos son sintetizados en los organismos vegetales mediante reacciones químicas vinculadas indirectamente con la síntesis de clorofila (Calder 2004; Moyad 2005), en la que intervienen desaturasas que no son sintetizadas por los animales, y por lo tanto son incapaces de insertar un doble enlace en las posiciones n-6 y n-3 de la cadena hidrocarbonada del ácido graso (Roche 1999; Nakamura and Nara 2003; Smith et al. 2004). Sin embargo, ya en los años 30 se demostró que estos ácidos grasos son esenciales en los mamíferos. Las deficiencias de estos ácidos poliinsaturados se manifiestan en el organismo con fenotipos caracterizados por una reducción de del peso del

cerebro y del cuerpo, cambios en la piel, infertilidad, pérdida de tonificación muscular, cambios degenerativos renales, pulmonares y hepáticos, aumento de la susceptibilidad a infecciones, así como cambios de comportamiento (Smith *et al.* 2004).

El grado de instauración de los ácidos grasos influye en la fluidez de la membrana pero además influye en la facilidad a la oxidación. Los PUFA son muy oxidables. Su peroxidación afecta seriamente a la integridad de la membrana y a las funciones que desempeña. Sin embargo hay que destacar que estos los ácidos poliinsaturados contribuyen significativamente a las propiedades biofísicas de las bicapas de fosfolípidos proporcionando un entorno apropiado para las actividades de las proteínas asociadas a membrana. En general, los ácidos grasos de la serie n-6 están asociados a una influencia beneficiosa sobre las enfermedades cardiovasculares, vía proceso inflamatorio (Sacks and Campos 2006). Los ácidos grasos n-3 son componentes estructurales de todas las membranas pero especialmente abundantes en retina y cerebro, donde el DHA constituye más del 26% del total de ácidos grasos (SanGiovanni and Chew 2005; McNamara and Carlson 2006). Se ha demostrado que niveles elevados de DHA en madres, tras un consumo de pescado en el embarazo, está relacionado con el desarrollo de niño, favoreciendo el carácter visual y cognitivo (Helland *et al.* 2003; Oken *et al.* 2004; Innis 2005; Oken *et al.* 2005; Cheatham *et al.* 2006). De nuevo, la serie n-3 manifiesta una potente acción protectora contra las enfermedades cardiovasculares, y además desórdenes psiquiátricos (Logan 2004; McNamara and Carlson 2006), trastornos inmunes como lupus o neuropatías (MacLean *et al.* 2004), función cerebral (Chalon 2006; Freemantle *et al.* 2006), la enfermedad de Crohn (Connor 2000), diversos cánceres (Larsson *et al.* 2004; Hooper *et al.* 2006; MacLean *et al.* 2006), la osteoporosis (Fernandes *et al.* 2003), el asma y patologías alérgicas (Prescott and Calder 2004) y la artritis reumatoide (Rennie *et al.* 2003).

La composición de ácidos grasos en las membranas celulares y en particular la cantidad relativa de n-6 y n-3 produce cambios significativos en la función celular (Bakewell *et al.* 2006). Por lo tanto una óptima función tisular requiere de un suministro adecuado de poliinsaturados a través de la dieta para que puedan ser incorporados en las membranas celulares. Por otro lado las

células necesitan mantener un equilibrio entre los ácidos grasos n-3 y n-6 de la dieta (Smit *et al.* 2004), debido a su diferente papel biológico. Puesto que las elongasas y desaturasas de nuestro organismo actúan indistintamente sobre los ácidos grasos de cualquiera de las series, se crean fenómenos de competencia entre ellas. Aunque tienen afinidad por los ácidos grasos más insaturados (serie n-3) (Nakamura and Nara 2003).

3. EL COENZIMA Q: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El coenzima Q (ubiquinona, Q o CoQ) fue detectado por primera vez en los lípidos insaponificables de mucosa intestinal de caballo (Festenstein *et al.* 1955) y fue dos años después cuando Crane y colaboradores (Crane *et al.* 1957) lo aislaron de las mitocondrias de corazón de ternera y observaron su capacidad redox, así como su presencia en los complejos de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria. En 1958, Wolf (Wolf 1958) determinó su compleja estructura (2,3-dimetoxi-5-metil-6-poliprenil-1,4-benzoquinona), tratándose de un compuesto lipídico formado por un anillo benzoquinónico con propiedades redox conectado a una cadena larga isoprenoide (**Figura 1**), lo cual requiere una localización específica dentro de las membranas biológicas (Turunen *et al.* 2004).

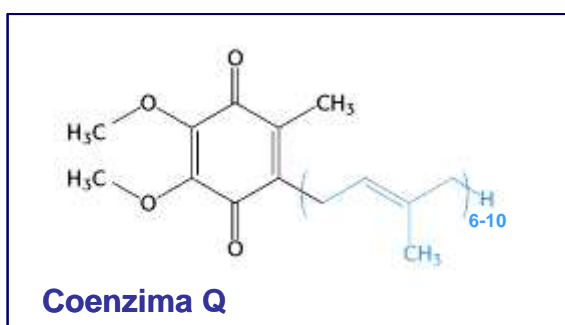


Figura 1. Estructura química del CoQ

El CoQ se localiza principalmente en la mitocondria donde además de ser componente esencial en la respiración (Trumpower 1990), también interviene en la β -oxidación de los ácidos grasos (Ferman 1988), síntesis de uridina (Nagy *et al.* 1992; Nagy *et al.* 1995), como cofactor de la proteínas descoplantes de la bomba de protones mitocondrial (Echtay *et al.* 2000; Echtay *et al.* 2001) y regulador de las propiedades fisicoquímicas de la membrana y como regulador de la disfunción endotelial vía incremento de óxido nítrico. (Turunen *et al.*

2004). Se han descrito también otras funciones como la de transportador de electrones en otros sistemas redox asociados a membranas, como el complejo de Golgi (Crane and Navas 1997) y la membrana plasmática (Sun et al. 1992; Villalba et al. 1995; Santos-Ocana et al. 1998b).

A parte de su función redox en la cadena de transporte de electrones (Crane et al. 1957), este lípido en su forma reducida (ubiquinol) actúa como un potente antioxidante en diversas membranas y lipoproteínas plasmáticas (Ernster and Dallner 1995; Navarro et al. 1998) que reacciona de forma directa contra radicales de oxígeno y lipoperóxidos para prevenir el daño a moléculas en diferentes tejidos y compartimentos celulares o de forma indirecta a través del reciclado de otros antioxidantes lipídicos como la vitamina E (Thomas et al. 1996), o hidrosolubles como la vitamina C o ácido ascórbico. Esta función es de gran relevancia desde que es conocido como el único antioxidante lipofílico endógenamente sintetizado en todos los organismos.

3.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS

El CoQ es un lípido hidrofóbico compuesto por un anillo benzoquinónico doblemente hidroxilado en las posiciones 1,4, y unido en la posición 3 a una cadena lateral de isoprenos. El número de unidades de isopreno que componen la cola hidrofóbica determina el tipo de coenzima Q. Así, nos podemos encontrar con 6 unidades (CoQ₆) en *Sacharomyces cerevisiae*, 8 unidades (CoQ₈) en *Escherichia coli*, 9 unidades (CoQ₉) en *Caenorabditis elegans* y 10 unidades (CoQ₁₀) en *Schizosaccharomyces pombe*. Sin embargo la especificidad no es completa, pues podemos encontrarnos con ciertos organismos que producen distintas variedades (aunque en proporciones distintas), como en el caso de CoQ₉ y CoQ₁₀ en roedores y humanos y en *Pneumocystis* que produce CoQ₇, CoQ₈, CoQ₉ y CoQ₁₀ (Basselin et al. 2005).

Por otro lado el CoQ, en función del estado de oxido-reducción en el que se encuentre en las membranas, se denomina de distinta manera (**Figura 2**). Así en su estado oxidado se le denomina ubiquinona, presentando dos grupos cetónicos en posición *para*, que se transforma en semiquinona cuando se reduce uno de ellos aceptando un electrón, o ubiquinol cuando acepta los dos

Introducción

electrones, presentando dos grupos hidroxilo y actuando como un potente antioxidante.

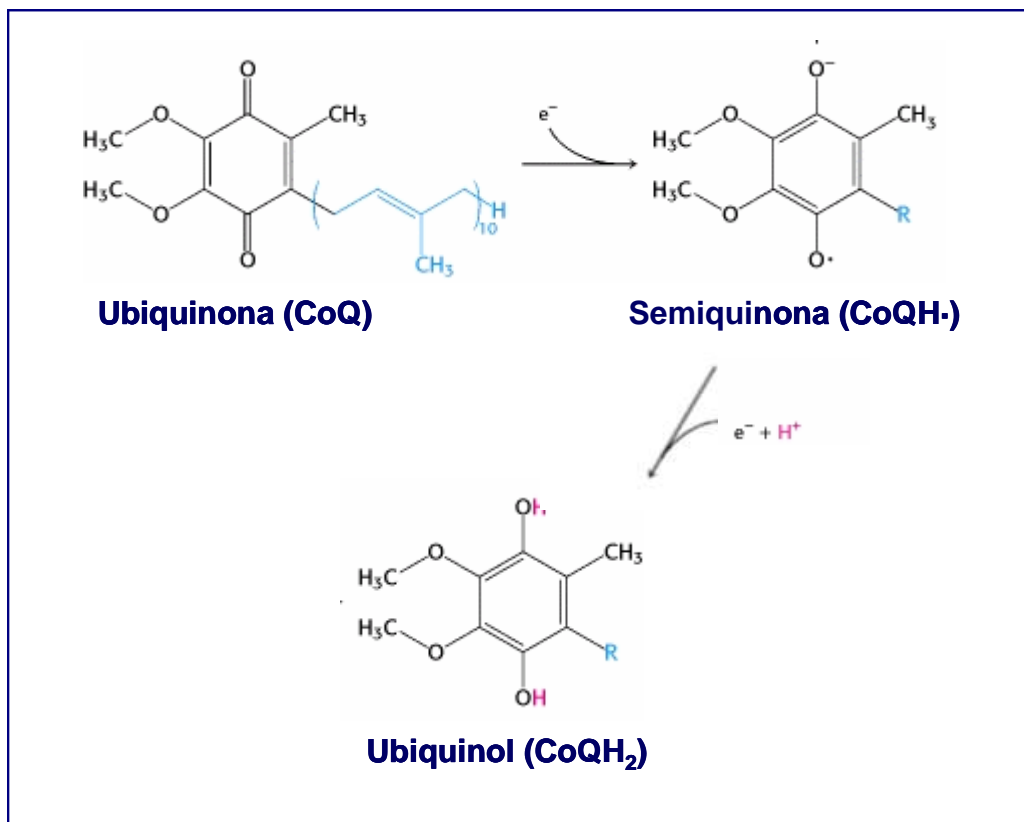


Figura 2. Química redox del coenzima Q

La cadena isoprenoide además determina la solubilidad de CoQ, siendo más soluble en solventes polares cuando menos números de isoprenos formen la cadena.

3.2. FUNCIONES DEL COENZIMA Q

3.2.1. FUNCIONES MITOCONDRIALES

3.2.1.1. Transporte de electrones

El coenzima fue descubierto en 1955 por Festenstein. (Festenstein *et al.* 1955). Seis años después Mitchell (Mitchell 1975) incluyó al CoQ en su teoría quimiosmótica de la conversión de la energía, como componente esencial en la respiración celular. Esta teoría hipotetizaba un flujo de electrones desde el NADH (dinucleótido de nicotinamida adenina) o el succinato hasta el oxígeno molecular en la cadena respiratoria, llevando consigo una liberación gradual de

energía y generación de un gradiente de protones a través de la membrana interna de la mitocondria para la síntesis de ATP (adenosina trifosfato) mediante la ATP sintetasa. Estudios metabólicos usando inhibidores de la cadena de transporte permitieron conocer los complejos de ésta. Mitchell (Mitchell 1975) atribuyó al CoQ la capacidad de transferir electrones desde los complejos I ó II hacia el complejo III y postuló las propiedades de la ubiquinona en función de tres atributos:

- En condiciones fisiológicas, la reducción de la ubiquinona a ubiquinol implica el intercambio de dos electrones y dos protones, permaneciendo la molécula neutra.
- El carácter hidrofóbico del CoQ lo mantiene confinado en las membranas. Su estructura permite la difusión a través de la bicapa lipídica y la buena accesibilidad de la cabeza polar a los bordes de la interfase membrana-agua (Braun *et al.* 1986; Warncke *et al.* 1994).
- La difusión del CoQ conecta complejos redox de forma lateral y también pone en contacto las fases acuosas de ambos lados de la membrana mediante el intercambio de protones.

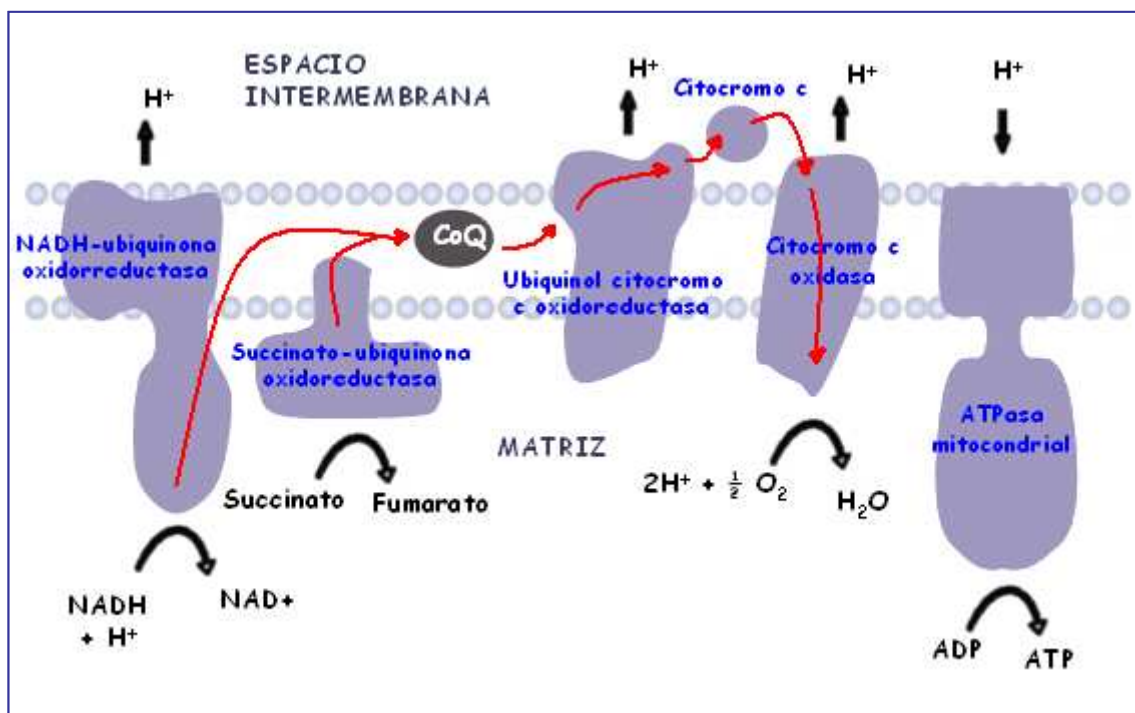


Figura 3. Transporte electrónico de la membrana interna mitocondrial

3.2.1.2. Los complejos mitocondriales

El transporte de electrones de la membrana interna mitocondrial se lleva a cabo a través de cinco complejos como se observan en la figura.

Complejo I o NADH-ubiquinona oxidoreductasa. EL NADH cede dos electrones a una molécula de CoQ que se reduce y capta dos protones (H^+) de la matriz. La energía liberada permite la transferencia de 4 H^+ desde la matriz al espacio intermembrana.

Complejo II o succinato-ubiquinona oxidoreductasa. El succinato dona dos electrones a una molécula de CoQ reduciéndola, que toma a su vez dos protones de la matriz. En este caso no hay transferencia de ningún protón al espacio intermembrana.

Complejo III o ubiquinol citocromo c oxidoreductasa. Dos electrones donados por el ubiquinol (QH_2) reducen dos moléculas de citocromo c, llevando consigo una transferencia de dos protones al espacio intermembrana. CoQ se oxida liberando otros dos protones más a espacio intermembrana, por lo tanto por cada molécula de CoQ que llega al complejo III, son transferidos 4 H^+ hacia el espacio intermembrana.

Complejo IV o citocromo c oxidasa. Un electrón donado por el citocromo c reduce una molécula de oxígeno. Se requieren 4 moléculas de citocromo c que reduzcan una molécula de oxígeno y forme una molécula de agua. Es este proceso se transfieren 4 protones al espacio intermembrana.

Complejo V o ATPasa mitocondrial. La transferencia de protones a través de los complejos de la cadena respiratoria crea una gradiente electroquímico entre la matriz y el espacio intermembrana. El complejo V conduce el paso de protones de nuevo hacia la matriz catalizando la formación de un enlace de alta energía, en forma de ATP, a partir de ADP y una molécula de fosfato.

3.2.1.3. Proteínas desacoplates

El CoQ tiene en la mitocondria otras funciones que no están directamente relacionadas con la cadena de transporte de electrones como la de cofactor para la función de proteínas desacoplates (UCPs). Las UCPs son proteínas de la membrana interna mitocondrial cuya función biológica es la disipación controlada del gradiente de protones originado en la cadena de transporte de electrones en forma de calor sin producción de ATP. Este mecanismo disipador de energía es usado por los mamíferos en la grasa parda para mantener la temperatura corporal en situaciones de bajas temperaturas.

Recientemente se ha descrito que las UCPs juegan un papel importante en el control de secreción de insulina y en la reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno, permitiendo un mecanismo adicional de defensa frente al estrés oxidativo (Zhang *et al.* 2001). En ausencia de CoQ la proteína Ucp1p en los lisosomas de *E.coli* es incapaz de permitir el transporte de protones, recuperando su funcionalidad al añadir CoQ a las membranas en presencia de ácidos grasos (Echtay *et al.* 2001).

3.2.1.4. Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm)

Esta proteína forma un canal de transición de la membrana interna mitocondrial sensible a Ca^{2+} y juega un papel importante en diferentes modelos de muerte celular (Marzo *et al.* 1998). La permeabilidad del poro está fuertemente regulada; y el calcio y varias quinonas actúan como inductores, inhibidores o inactivadores. Diversos estudios han demostrado que la longitud de la cola isoprenoide de los análogos de CoQ (Fontaine *et al.* 1998) modula la permeabilidad. El CoQ₁₀, con una cadena larga de isoprenos induce el cierre del canal, impidiendo la despolarización del potencial de membrana evitando la depleción de la producción de ATP, activación de la caspasa-9 y la fragmentación del ADN en queratinocitos, señal de apoptosis (Vincent *et al.* 2004).

3.2.1.5. Aceptor final en la síntesis *de novo* de pirimidinas

El CoQ actúa como aceptor de electrones en la síntesis *de novo* de pirimidinas por la vía del orotato (Jones 1980; Nagy *et al.* 1992). El dihidroorotato es formado en el citosol a partir de n-carbamil aspartato, a través de la dihidroorotasa. Éste entra en la mitocondria, y a través de una enzima de la membrana interna mitocondrial, la dihidroorotato deshidrogenasa, se transforma en orotato, cediendo dos electrones a CoQ que pasa a su estado reducido, ubiquinol. El orotato vuelve al citosol y tras varias reacciones catalizadas por la OMP-sintasa (Orotato fosforibosil transferasa) y la uracil monofosfato sintasa, se transforma en uracil monofosfato.

3.2.2. FUNCIONES EXTRAMITOCONDRIALES

El coenzima Q, además de en la mitocondria, se localiza en otras membranas extramitocondriales, como en la membrana plasmática (Santos-Ocana *et al.* 1998b), en el aparato de Golgi y lisosomas (Kalen *et al.* 1987; Takahashi *et al.* 1993); y granos azurófilos de los neutrófilos (Mollinedo and Schneider 1984; Segal and Abo 1993).

3.2.2.1. Sistema redox de la membrana plasmática

De manera análoga a la mitocondria, la membrana plasmática es también una estructura activa desde el punto de vista redox (Villalba JM 2001.). El sistema de transporte electrónico asociado a la membrana plasmática está basado principalmente sobre la participación de diferentes NAD(P)H-deshidrogenasas que aceptan electrones del NAD(P)H citosólico para reducir al CoQ, estando presente en la membrana plasmática a niveles comparables con los de la mitocondria (Kalen *et al.* 1987; Takahashi *et al.* 1993). En la membrana plasmática, la NADH-citocromo b_5 reductasa (NADH-AFR reductasa) puede reducir el CoQ a través de un mecanismo de 1 electrón (Nakamura and Hayashi 1994), estando esta enzima implicada en el mantenimiento de los niveles basales de CoQ reducido en condiciones normales (Navarro *et al.* 1995). Además, la enzima NQO1 puede reducir el CoQ a través de un mecanismo de dos electrones (Li *et al.* 1995),

particularmente bajo condiciones de estrés oxidativo (Navarro *et al.* 1998; Navarro *et al.* 1999). Estos sistemas son responsables de la regeneración de CoQ reducido.

3.2.2.2. Estrés oxidativo. Función antioxidante.

Estrés oxidativo se le denomina al estado celular ocasionado por el desequilibrio entre las moléculas prooxidantes, como las especies reactivas de oxígeno (ROS), y las moléculas antioxidantes en beneficio de las primeras. Las ROS se producen en la propia célula como consecuencia de la utilización del oxígeno como aceptor de electrones en el metabolismo celular de los organismos aerobios. Éstas son capaces de reaccionar con diferentes moléculas orgánicas que integran las estructuras vivas, desencadenando una serie de procesos de activación de sustancias antioxidantes que previenen o reparan el daño causado llegando incluso a inducir como mecanismo de defensa la muerte celular dirigida o apoptosis.

La membrana mitocondrial (Boveris and Chance 1973; Rolfe and Brown 1997) es el compartimento de mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ (anión superóxido) y H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) en la célula (Papa and Skulachev 1997; Skulachev 1998). La formación de ROS es dependiente del estado de respiración de forma que cuando el potencial de membrana es alto y los niveles de ADP (adenosín difosfato) son bajos, los niveles de ROS aumentan. Otra fuente de ROS es la producción de H_2O_2 por la monoamina oxidasa en la mitocondria, las flavina oxidasas en los peroxisomas y la fuga de electrones desde el citocromo P-450 en el retículo endoplásmico (Chance *et al.* 1979; Halliwell and Gutteridge 1984; Cadenas *et al.* 1992).

Las especies reactivas de oxígeno son capaces de dañar a los lípidos, proteínas y ADN. La peroxidación lipídica se inicia con la pérdida de un hidrógeno en un grupo metilo de una ácido graso poliinsaturado. A partir de aquí puede reaccionar con otras macromoléculas desestabilizándolas. La oxidación proteica afecta a los residuos aminoácidos formando radicales hidroxilo (Stadtman 1990; Stadtman and Berlett 1991). Su propagación puede darse dentro de la propia proteína e incluso en otros lípidos. Es más, la oxidación de las proteínas de membrana se debe también a los radicales libres

Introducción

derivados de la peroxidación lipídica (Forsmark-Andree *et al.* 1995). Las proteínas dañadas son reconocidas por proteasas específicas y son degradadas completamente a aminoácidos. La síntesis *de novo* es el único mecanismo de reparación de proteínas (Grune *et al.* 1997; Ullrich *et al.* 1999).

Debido a la elevada tasa de generación de ROS en la mitocondria, la falta de protección de histonas y la limitada habilidad de reparación, el ADN mitocondrial tiene una exposición diez veces mayor al daño oxidativo que el ADN nuclear (Ozawa 1997). Existen dos mecanismos enzimáticos de reparación del ADN llevados a cabo por la ADN polimerasa y ADN ligasa (Wood 1996).

Los antioxidantes son agentes enzimáticos y no enzimáticos capaces de eliminar o prevenir la formación de ROS. Dentro de las enzimas antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa y varias peroxidasas tales como la glutatión peroxidasa, catalasa, tioredoxin reductasa y peroxiredoxina (Holmgren and Bjornstedt 1995; Wood *et al.* 2003). Los agentes no enzimáticos incluyen a la vitamina C y E, carotenoides, glutatión, α -ácido lipoico, flavonoides y la forma reducida de CoQ (ubiquinol). Una forma de como las células responden al estrés oxidativo es incrementando la transferencia de electrones a través de la membrana plasmática para reducir oxidantes extracelulares con equivalentes de reducción intracelulares, principalmente el NAD(P)H y el ascorbato (May and Qu 1999; del Castillo-Olivares *et al.* 2000). Otra es manteniendo el coenzima Q en su estado reducido.

El CoQ reducido de la membrana plasmática es un potente antioxidante que protege los lípidos frente al daño oxidativo (Frei *et al.* 1990; Stocker *et al.* 1991), y mantiene otros antioxidantes en sus formas reducidas (Kagan *et al.* 1990; Beyer 1994; Santos-Ocana *et al.* 1998a). Bajo condiciones de estrés oxidativo, el sistema antioxidante dependiente del CoQ puede activarse en la membrana plasmática de hígado de rata debido al incremento de CoQ₉, CoQ₁₀ y de citocromo *b*₅ reductasa, así como por la translocación de NQO1 soluble hacia la membrana plasmática (Navarro *et al.* 1998; Navarro *et al.* 1999). Por tanto, la cadena de transporte electrónico de la membrana plasmática y el CoQ interactúan para proteger la célula del estrés oxidativo.

La oxidación de las proteínas de membrana puede también ser prevenida por CoQ reducido (Forsmark-Andree *et al.* 1995; Forsmark-Andree *et al.*

al. 1996; Forsmark-Andree *et al.* 1997). La oxidación del ADN medida por la formación de 8-hidroxideoxiguanosina en las mitocondrias de hígado de ratón y la rotura de las hebras de ADN en linfocitos humanos es también prevenida por la administración de CoQH₂ tanto *in vitro* como *in vivo* (Ernster and Dallner 1995; Tomasetti *et al.* 1999; Tomasetti *et al.* 2001)

Es importante señalar que, mientras que los incrementos en CoQ pueden tener efectos antioxidantes beneficiosos, el CoQ puede también actuar como prooxidante, de modo que un incremento excesivo en su contenido podría ser deletéreo (James *et al.* 2004; Rodriguez-Aguilera *et al.* 2005). Se requieren estudios adicionales para determinar hasta qué punto la RC altera el contenido mitocondrial de CoQ, la evolución temporal de tales cambios, y la distribución tisular de los mismos.

En condiciones de alto poder reductor en el citosol, el CoQ presente en la membrana plasmática reduce compuestos extracelulares estabilizando el ascorbato presente en el medio. Una vez oxidado, el estado ubiquinona se regenera por medio del NADH (Gomez-Diaz *et al.* 1997). Esto no es más que un sistema de protección frente a oxidantes extracelulares usando equivalentes de reducción citosólicos. De hecho este papel junto con el papel de reducción del radical tocoferilo para regenerar tocoferol en la bicapa lipídica (Stocker *et al.* 1991) es un modelo de protección antioxidante donde el CoQ protege tanto la fase acuosa como a la fase lipídica de la célula frente a compuestos oxidantes.

3.2.2.3. CoQ y apoptosis

Además de actuar como antioxidante, la reducción de CoQ por el sistema redox de la membrana plasmática puede también desempeñar un papel en la apoptosis. La ceramida se produce por una esfingomielinasa neutra dependiente de Mg²⁺ localizada en la membrana plasmática. Se cree que esta producción de ceramida es importante disparando la apoptosis en respuesta a la exposición de diversos factores de estrés (Navas *et al.* 2002; Navas and Manuel Villalba 2004). El CoQ reducido puede actuar como un eficaz inhibidor de la esfingomielinasa neutra de la membrana plasmática (Martin *et al.* 2001; Martin *et al.* 2002) y, por tanto, probablemente ejerce un efecto opuesto a la

apoptosis. El CoQ también parece inhibir la activación de la caspasa-3, presumiblemente disminuyendo la producción de ceramida (Navas *et al.* 2002). Por tanto, la estimulación del sistema redox de la membrana plasmática por la RC podría también contribuir a una extensión de la longevidad mediante la inhibición de al menos un factor que contribuye a la apoptosis.

4. DISTRIBUCIÓN DEL COENZIMA Q

Las distintas funciones de la ubiquinona como componente lipofílico esencial en la cadena de transporte de electrones así como el papel que desempeña sobre la bioenergética mitocondrial, el efecto sobre la fluidez de membrana y su función protectora sobre los fosfolípidos de membrana susceptibles de peroxidación hacen de la distribución de coenzima Q un elemento importante para determinar sus efectos.

La identificación de ubiquinona mediante cromatografía HPLC ha resultado ser un método relativamente sencillo y sensible para la cuantificación de este lípido consiguiendo una máxima resolución (Ikenoya *et al.* 1981). La cuantificación en base a la máxima absorción a 275 nm es muy ventajosa, pues no existen otros lípidos o contaminantes que interfieran en esta región. Numerosos artículos científicos basados en esta técnica han demostrado que la distribución de CoQ no es homogénea en la membrana (Saito *et al.* 2009), así como tampoco lo es a nivel celular o tisular ni entre especies.

4.1. LOCALIZACIÓN INTRAMEMBRANOSA

Los lípidos sintetizados a través de la vía del mevalonato alteran las propiedades de las membranas. La cadena de CoQ se encuentra localizada en la región central e hidrofóbica de la membrana, entre la bicapa

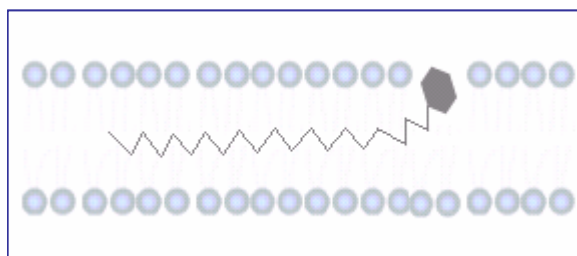


Figura 4. Localización intramembranosa del CoQ

de fosfolípidos (Cornell *et al.* 1987). El anillo benzoquinona del CoQ con

propiedades redox, se localiza en la superficie de la membrana externa o interna, dependiendo de su requerimiento funcional (**figura 4**). La cadena lateral desestabiliza la membrana, incrementando su fluidez y permeabilidad. Si la membrana fuera deficiente en isoprenos, podrían traer consecuencias funcionales deletéreas debido a que no alcance una fluidez óptima para ejercer adecuadamente sus funciones celulares.

4.2. DISTRIBUCIÓN CELULAR

La ubiquinona se ubica en la membrana mitocondrial interna en mayor concentración que otros componentes de la cadena de transporte de electrones. Una tasa normal de respiración requiere el mantenimiento de unos niveles elevados de ubiquinona, de forma que una bajada de esos niveles podría alterar el mantenimiento normal de esta función. La ubiquinona además está presente en todas las membranas celulares como la membrana plasmática (Fernandez-Ayala *et al.* 2005), endomembranas y lipoproteínas del suero (Kalen *et al.* 1987; Takahashi *et al.* 1993) actuando como un potente antioxidante (Villalba 2000).

La presencia de CoQ en las membranas extramitocondriales sugiere la existencia de un mecanismo de síntesis y distribución definido entre las membranas. La mitocondria contiene la mayoría de enzimas de la vía de síntesis (Jonassen 2000; Jiang *et al.* 2001) pero se ha comprobado que en el retículo endoplásmico y en las vesículas de Golgi también aparece actividad enzimática, incluso en peroxisomas (Kovacs *et al.* 2002; Tekle *et al.* 2002). La presencia de señales diana mitocondrial en los genes de síntesis de CoQ y la localización de esas proteínas en la mitocondria y no en el resto de orgánulos, sugieren que la biosíntesis se completa en la mitocondria desde donde el CoQ es transportado a las otras membranas dentro de la célula. Estudios recientes en células humanas (HL-60) apoyan esta hipótesis, al observar que la primera localización del CoQ endógeno se da en la mitocondria y que mediante una vía endo-exocítica se distribuye a lo largo de las membranas extramitocondriales, así como el CoQ exógeno es incorporado a la fracción endo-lisosomal y transportado posteriormente a la mitocondria siguiendo la vía antes mencionada (Fernandez-Ayala *et al.* 2005).

La heterogeneidad de CoQ parece ser requerida para realizar su función antioxidante (Matsura *et al.* 1991), siendo mayor su potencial antioxidante cuanto mayor número de isoprenos disponga la cadena lateral. En cambio, los ensayos muestran lo contrario, al menos en cerebro de rata donde una tercera parte de CoQ posee residuos de 10 isoprenos, siendo el patrón de distribución idéntico en distintas regiones y también en organelas subcelulares (Zhang *et al.* 1996). Al contrario que en estos ensayos, en otros casos se ha comprobado que el tipo de CoQ es relevante en la activación de UCPs así como que la regulación del poro PTP tiene un requerimiento de CoQ selectivo (Echtay *et al.* 2001; Walter *et al.* 2002). En células del ganglio dorsal de rata infectadas con paramixovirus (virus de pareras) se observaba una reducción de los niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀ ocasionando una degeneración neuronal (Edlund *et al.* 1994). Estas células eran recuperadas por adición de CoQ₁₀ en el cultivo pero no de CoQ₉.

4.3. DISTRIBUCIÓN TISULAR

La forma de CoQ predominante en ratas es la que contiene nueve residuos en su cadena lateral (CoQ₉), aunque también presenta niveles relativamente elevados de CoQ₁₀ (Aberg *et al.* 1992). Su distribución en varios órganos es bastante distinta del resto de lípidos sintetizados a partir de la vía del mevalonato. En cerebro, páncreas y pulmón, los niveles de ubiquinona son similares en ratas y humanos, pero en la mayoría de los otros órganos en humanos las cantidades son considerablemente más bajas que aquellas observadas en rata (Rousseau and Varin 1998). En humanos, el CoQ₉ constituye el 2-5 % del total de ubiquinona, siendo CoQ₁₀ la forma predominante. Los niveles de ubiquinona son determinantes en un gran número de patologías.

En ratones, el contenido de CoQ medido en homogenados de diferentes tejidos varía incluso hasta 100 veces, siguiendo el orden: riñón > corazón > esqueleto > músculo > cerebro > hígado (Lass *et al.* 1999b; Lass and Sohal 2000). Las concentraciones de CoQ en la mitocondria también variaban en los distintos tejidos, siendo el corazón el órgano que contenía niveles 3.6-, 3.3-, 2.7- y 1.5-veces más elevados que los observados en riñón,

hígado, cerebro y músculo esquelético respectivamente (Sohal and Forster 2007).

4.4. DISTRIBUCIÓN A NIVEL DE ESPECIE

Las variaciones encontradas en el contenido de CoQ y el ratio $\text{CoQ}_9/\text{CoQ}_{10}$ a nivel de tejido hizo cuestionarse si estos cambios eran fisiológicamente significativos afectando a las funciones mitocondriales. Un estudio realizado en mitocondrias aisladas del corazón de nueve especies de mamíferos mostraba una evidente diferencia en la distribución de los homólogos de CoQ a nivel de especie pero además la tasa de generación de O_2^- se correlacionaba directamente con el contenido mitocondrial de CoQ_9 e inversamente con el contenido de CoQ_{10} de todas las especies de mamífero estudiadas (Lass *et al.* 1997)

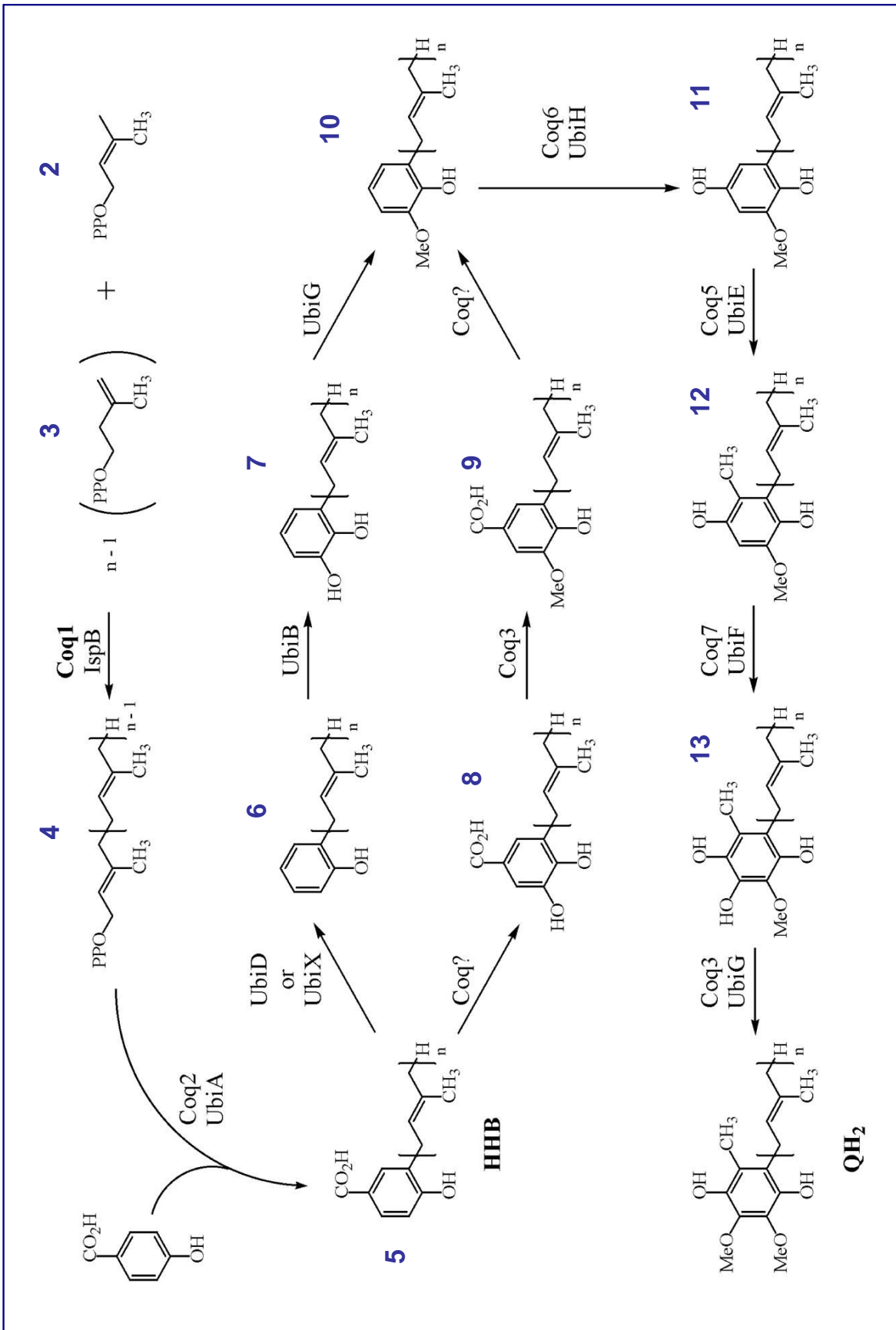
El contenido total de CoQ ($\text{CoQ}_9 + \text{CoQ}_{10}$) de cada mamífero variaba un factor de dos veces al compararse con el resto siguiendo este orden: caballo = ratón = vaca = oveja = cabra > rata > cerdo = conejo > cobaya, sin embargo el ratio $\text{CoQ}_{10}/\text{CoQ}_9$ variaban hasta 60 veces entre especies. El contenido total de CoQ no se relacionaba significativamente con la longevidad máxima de cada especie pero curiosamente el contenido de CoQ_9 era inversamente y el contenido de CoQ_{10} directamente correlacionado con la longevidad máxima de cada especie. En especies menos longevas como el ratón o rata, casi el 90% del contenido de CoQ mitocondrial era CoQ_9 mientras que el cobaya mantenía unos niveles equilibrados entre los dos homólogos de CoQ. En la mitocondria de especies más longevas, como el conejo, cerdo, cabra, oveja, vaca y caballo, el contenido de CoQ_{10} era la forma predominante, constituyendo el CoQ_9 un 1,3-4,0 % del contenido total de ubiquinona (Sohal and Forster 2007).

5. BIOSÍNTESIS DE COENZIMA Q

La ruta biosintética de CoQ en eucariotas ha sido caracterizada mediante los intermediarios acumulados en cepas de mutantes deficientes en CoQ en *Saccharomyces cerevisiae* (Meganathan and C 1996 ; Jonassen *et al.* 2001; Turunen *et al.* 2004). La biosíntesis de CoQ comienza con la formación de ácido hidroxibenzoico al que se le une una cola lipídica poliisoprenoide (Olson and Rudney 1983; Pennock 1983).

Este lípido es el producto de dos vías biosintéticas diferentes: la síntesis de 4-hidroxibenzoato (4-HB), derivado del metabolismo de la tirosina (aminoácido esencial en mamíferos) y la síntesis de la cadena lateral de isoprenos que comienza con la conversión de acetil-coenzima A (CoA) a través de la ruta de mevalonato, en farnesil pirofosfato (FPP). (Grunler *et al.* 1994). Entonces la trans-prenil transferasa (Coq1p) cataliza la condensación de FPP con varios IPPs (isopentenil pirofosfatos), todos en configuración *trans*, para formar la cadena larga isoprenoide (Turunen *et al.* 2004). Este enzima es por lo tanto el responsable de determinar el tipo de CoQ por el número de isoprenos que une a la cadena. Estas dos vías convergen en un paso terminal, donde 4-HB y poliprenil pirofosfato son unidos mediante una reacción de condensación catalizada por la enzima poliprenil 4-hidroxibenzoato transferasa (Coq2p), originando una molécula intermediaria denominada poliprenil 4-hidroxibenzoato.

Figura 5. Ruta de biosíntesis del CoQ. El dimetilalil (2) e isopentenil difosfato (3) son los precursores del poliprenil difosfato (4), catalizado por Coq1p (eucariotas) o Ispb (E.coli). Después de la formación de 3-poliprenil-4-hidroxibenzóico (5), que en S.cerevisiae es HHB o 3-hexaprenil-4-hidroxibenzoato, por la acción del ácidop-hidroxibenzóico:poliprenil transferasa (Coq2p o UbiA), las rutas biosintéticas de CoQ propuestas en eucariotas y procariotas divergen. Los demás intermediarios de la ruta son 2-poliprenilfenol (6); 2-poliprenil-6-hidroxifenol (7); ácido 3,4-dihidroxi-5-poliprenilbenzóico (8); ácido 3-metoxi-4-hidroxi-5-poliprenilbenzóico (9); 2-poliprenil-6-metoxifenol (10); 2 poliprenil-6-metoxi-1,4-benzoquinol (11); 2-poliprenil-3-metil-6-metoxi-1,4-benzoquinol o 5-demetoxiubiquinol (12); 2-poliprenil-3-metil-5-hidroxi-6-metoxi-1,4-benzoquinol o demetil-QH₂ (13) y coenzima QH₂. Los compuestos 11 y 13 son los intermediarios hipotéticos en la ruta de biosíntesis de *S. cerevisiae*, mientras que el compuesto 7 pertenece a la ruta de *E.coli*.



Introducción

El orden de las subsiguientes reacciones de modificación del anillo aromático es especulativo, pues únicamente algunos de los intermediarios de estos pasos de síntesis han recuperado su actividad en cepas mutantes de levaduras. Las modificaciones del anillo propuestas actualmente comienzan con una hidroxilación seguido de una O-metilación y descarboxilación para formar el intermediario fenólico 6-metoxi-2-poliprenil. A continuación son requeridos dos pasos de hidroxilación, una C-metilación y una O-metilación, para generar completamente el CoQ.

Hasta el momento han sido identificados nueve grupos de complementación de mutantes de levaduras deficientes en CoQ (COQ1 a COQ9) (Tzagoloff and Dieckmann 1990; Johnson *et al.* 2005). Los homólogos en mamíferos han sido identificados mediante homología de secuencias. Las proteínas *coq2p*, *coq3p* y *coq7p* complementaban la funcionalidad en mutantes nulos de levadura (Vajo *et al.* 1999; Jonassen 2000; Forsgren *et al.* 2004), indicando así que la vía de síntesis de Q está conservada en humanos. Se cree que todas las enzimas eucarióticas involucradas en la biosíntesis de ubiquinona son muy similares a las estudiadas en *S. cerevisiae*, excepto para la trans-poliprenil difosfato sintasa (Kawamukai 2002; Okada *et al.* 2004). Este enzima pertenece a la familia de trans-prenil transferasa de clase III y determina la longitud de la cadena isoprenoide del CoQ en microorganismos y presumiblemente en mamíferos. Mientras que la clase I y II producen cadenas cortas y medias de isoprenos, las enzimas de clase III únicamente producen cadenas largas de isoprenos aunque aún no están bien caracterizadas (Ogura and Koyama 1998).

Los mutantes *coq* en levaduras son incapaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables tales como glicerol o etanol y crecen formando colonias *petite* en presencia de glucosa. (Tzagoloff *et al.* 1975a; Tzagoloff *et al.* 1975b). La característica peculiar de estos mutantes es que son defectivos en la actividad NADH-citocromo *c* reductasa y succinato-citocromo *c* reductasa en mitocondrias aisladas de cada mutante *coq*, pudiendo recuperar esa función a niveles comparables a los de una cepa silvestre por adición de CoQ₂ (Tzagoloff *et al.* 1975b; Johnson *et al.* 2005). También el CoQ₆ exógeno puede recuperar

a los mutantes *coq* cultivados en medio líquido en condiciones aerobias, recuperando la respiración. (Jonassen *et al.* 1998; Do *et al.* 2001).

Actualmente se ha identificado un nuevo mutante *coq* en levaduras que muestra defectos en la respiración en Q dependiente de oxidación de NADH y succinato (Barros *et al.* 2005). Por otro lado, y en contra de los otros mutantes (*coq1-coq9*), el mutante *coq10* prácticamente posee niveles normales de CoQ₆, sugiriendo que la proteína que codifica COQ₁₀ no es requerida para la biosíntesis de CoQ. En cambio, el polipéptido Coq10p podría funcionar como una chaperona de unión a CoQ en el transporte de electrones de la respiración.

Mientras que a las proteínas Coq1p, Coq2p, Coq3p, Coq5p, Coq6p, y Coq7p se les asocia con funciones enzimáticas conocidas en la biosíntesis de Q (Jonassen *et al.* 2001; Gin *et al.* 2003), no está aún claro si las otras proteínas Coq también poseen actividad enzimática. Los polipéptidos Coq1p-Coq9p se localizan en la mitocondria (Hsu *et al.* 1996; Dibrov *et al.* 1997; Jonassen *et al.* 1998; Leuenberger *et al.* 1999; Belogradov *et al.* 2001; Do *et al.* 2001; Gin *et al.* 2003; Gin and Clarke 2005; Johnson *et al.* 2005).

5.1. PROTEÍNAS QUE INTERVIENEN EN LA SÍNTESIS DE COENZIMA Q

Aunque los genes responsables de la parte final de la biosíntesis de Q han sido clonados en bacteria y levaduras, aún hay una limitada información sobre las enzimas biosintéticas en mamíferos. A continuación se citan cada enzima por separado con los últimos avances en organismos eucariotas que nos aproximen a su posible función dentro de esta ruta biosintética.

5.1.1. Coq1p

En *S.cerevisiae* este enzima cataliza la formación de la cola isoprenoide (trans-poliprenil difosfato sintasa). Está codificada por el gen COQ1 (Ashby and Edwards 1990), que es responsable de determinar la longitud de la cadena de isoprenos específica de especie (Okada *et al.* 1996). Estas enzimas forman heterotretámeros en *Schizosaccharomyces pombe*, en ratones y en humanos (Saiki *et al.* 2003; Saiki *et al.* 2005). En otros organismos como bacterias, plantas (*Arabidopsis thaliana*) (Jun *et al.* 2004) y otras levaduras (*S. cerevisiae*)

la trans-prenil difosfato sintasa está formada por un solo polipéptido. Los componentes de *COQ1* se denominan *mSPS1* (solanesil difosfato sintasa) y *mDLP1* (D-less poliprenil difosfato sintasa) en ratón (*hDPS1*, decaprenil difosfato sintasa, y *hDLP1* en humanos, respectivamente). Las distintas isoprenil difosfato sintasas de eucariotas contienen siete motivos altamente conservados (Wang and Ohnuma 2000). La expresión de los homólogos de *COQ1* en una amplia variedad de organismos permiten restaurar la biosíntesis de Q y la respiración en mutantes nulos de *Coq1p* en levaduras (Okada *et al.* 1997; Jun *et al.* 2004).

La expresión de ambas subunidades de la trans-poliprenil difosfato sintasa en *S. pombe*, ratón y humanos restaura la producción de la enzima y síntesis de CoQ en los ensayos de complementación (Saiki *et al.* 2003; Saiki *et al.* 2005). Pero además se ha demostrado que la especificidad de *Coq1p* está conservada dentro su secuencia génica pues la expresión cruzada de diferentes trans-prenil transferasas altera la longitud de la cadena lateral en el CoQ (Okada *et al.* 1996). Las dos isoformas son necesarias para determinar la cadena lateral del coenzima Q, aunque la isoforma *mSPS1* (*hDPS1*) juega un papel más determinante que *mDLP1* (*hDLP1*) (Saiki *et al.* 2005). *Coq1p* en *S.cerevisiae* se encuentra periféricamente asociada con la membrana mitocondrial interna en el lado de la matriz (Gin and Clarke 2005) .

5.1.2. Coq2p

Este enzima, 4-hidroxibenzoato poliprenil-transferasa, posee una función crucial, pues es responsable de la condensación de la cadena lateral isoprenoide con el anillo 4-hidroxibenzoato, generando el primer intermediario de unión a membrana, el ácido 4-hidroxi-3-poliprenil benzoico. El gen que codifica este enzima en *S.cerevisiae* y *Homo sapiens* se denomina *COQ2* (Ashby *et al.* 1992; Forsgren *et al.* 2004). Ortólogos/homólogos han sido

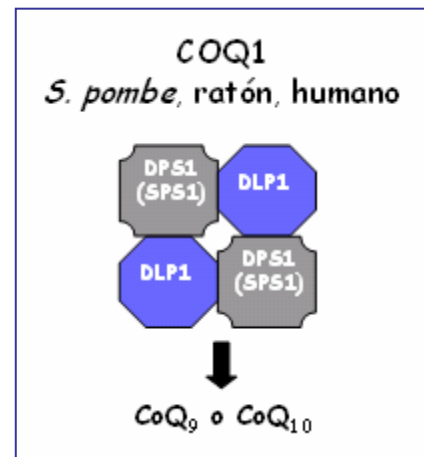


Figura 6. Esquema de COQ1 en *Schizosaccharomyces pombe*, ratón y humano.

aislados en otros eucariotas (Uchida *et al.* 2000; Okada *et al.* 2004; Ohara *et al.* 2006). Ensayos *in vitro* en hígado de rata demostraron que su actividad está presente principalmente en la mitocondria (Momose and Rudney 1972). En general, estos homólogos no demuestran especificidad por la longitud de la cadena que dispone el sustrato isoprenil difosfato (Ashby *et al.* 1992; Meganathan 2001; Okada *et al.* 2004; Gin and Clarke 2005). Sin embargo dicha especificidad se ve afectada por la concentración de Mg^{2+} en extractos crudos de levadura (Ashby *et al.* 1992). Mediante estudios *in vitro* se ha demostrado que el polipéptido es importado y enteramente procesado dentro de la mitocondria (Leuenberger *et al.* 1999). Esta proteína se comporta como una proteína integral de membrana asociada a la membrana mitocondrial interna del lado de la matriz.

5.1.3. Coq3p

Este enzima, codificada por el gen COQ3, cataliza dos pasos de O-metilación en la ruta biosintética (Poon *et al.* 1999). El gen COQ3 fue originalmente identificado en *S. cerevisiae* (Clarke *et al.* 1991) por su capacidad en restaurar la biosíntesis de CoQ y la respiración en un mutante *coq3* llamado C39 (Tzagoloff *et al.* 1975b; Sippel *et al.* 1983). Los homólogos funcionales de este gen han sido también aislados en mamíferos (Marbois *et al.* 1994; Avelange-Macherel and Joyard 1998; Jonassen 2000). La secuencia aminoacídica de la proteína codificada por los homólogos COQ3 en ratones, *A. thaliana*, y humanos contiene cuatro regiones conservadas en una gran familia de enzimas metiltransferasas que usan S-adenosimetionina (SAM or AdoMet) como donador de metilo (Kagan and Clarke 1994; Niewmierzycka and Clarke 1999) y requiere un catión divalente (Turunen *et al.* 2004). Como la mayoría de los otros polipéptidos Coq, también presenta una secuencia de reconocimiento de mitocondria en el extremo N-terminal. Ensayos *in vitro* (Hsu *et al.* 1996) y estudios de localización subcelular (Poon *et al.* 1999) han demostrado que la pre-proteína de Coq3p era importada y procesada a su forma madura dentro de la mitocondria, en una vía dependiente del potencial de membrana. Mediante estudios de fraccionamiento submitocondrial se ha demostrado finalmente que

se trata de una proteína periférica asociada a la matriz del lado de la membrana interna mitocondrial (Poon *et al.* 1999).

La O-metiltransferasa Coq3p tiene especificidad por sustratos externos. Este reconocimiento es una característica que comparte con catecol-O-metiltransferasa (COMT), la cual tiene numerosos sustratos fisiológicos incluyendo los precursores de la biosíntesis de dopamina, ciertos esteroides y neurotransmisores (Vidgren *et al.* 1999). Pero hay que tener en cuenta que la secuencia de aminoácidos de COMT no guarda homología con la de Coq3p de levadura salvo en el motivo conservado metiltransferasa (Turunen *et al.* 2004).

5.1.4. Coq4p

Al igual que el gen COQ3, el gen COQ4 de *S.cerevisiae* fue clonado al comprobar su complementación funcional en mutantes *coq4* deficientes en CoQ portando una mutación localizada en E266K (C9-E1 o *coq4-1*) (Belogradov *et al.* 2001). La función enzimática de Coq4p, una proteína periférica asociada a la membrana mitocondrial interna en el lado de la matriz es aún desconocida (Belogradov *et al.* 2001). Se especula que esta proteína podría tener funciones de hidroxilación o carboxilación en los posibles pasos aún no bien caracterizados de la biosíntesis de CoQ. Su secuencia aminoacídica no comparte secuencias significativas de homología con otros dominios proteicos de actividad conocida.

Resulta significativo el hecho de que los niveles basales de Coq3p y Coq7p son disminuídos en mutantes nulos de *coq4*, recuperando la normalidad en mutantes *coq4-1* (Belogradov *et al.* 2001). Este resultado, junto con un reciente trabajo que demuestra que el polipéptido nativo Coq4p co-migra con Coq3p, Coq6 y Coq7 en un complejo de alto peso molecular (Marbois *et al.* 2005; Tran *et al.* 2006), indican que Coq4p posee un rol estructural en el complejo polipeptídico de biosíntesis de CoQ.

5.1.5. Coq5p

Esta enzima, denominada 2-metoxi-6-poliprenil-1,4 benzoquinona metiltransferasa, cataliza el único paso de C-metilación en la biosíntesis de CoQ, generando el intermediario 2-metoxi-5-metil-6-poliprenil-1,4-

benzoquinona. En *S.cerevisiae* se codifica por el gen *COQ5*. Fue aislado de una genoteca de ADN genómico de levadura debido a su capacidad por restaurar la respiración en mutantes de *coq5* con mutaciones puntuales *coq5-1* (Barkovich *et al.* 1997; Dibrov *et al.* 1997).

Se ha demostrado que la expresión de *COQ5* está regulada por tratamientos de glicerol y ácido oleico, observándose una mayor inducción durante el crecimiento con ácido oleico (Hagerman *et al.* 2002; Hagerman and Willis 2002). El ORF (marco abierto de lectura) de *COQ5* porta cuatro secuencias de motivos conservados en una larga familia de enzimas metiltransferasas dependientes de AdoMet (Katz *et al.* 2003). Mediante análisis *in vitro* se ha demostrado que la longitud de la cola isoprenoide del CoQ no juega un papel crucial en el reconocimiento a nivel de sustrato de la proteína Coq5p. El NADH es esencial para la actividad enzimática óptima y es mayoritariamente requerido para convertir la quinona en hidroquinona, generando un nucleófilo para la transferencia de un grupo C-metilo. Se han realizado ensayos de fraccionamiento submitocondrial que demostraron que la proteína Coq5p está periféricamente asociada con la membrana mitocondrial interna del lado de la matriz (Baba *et al.* 2004).

Los mutantes *coq5-2* y *coq5-5*, mantienen de manera significativa. los niveles normales de los polipeptidos Coq3p, Coq4p, y Coq5p, mientras que todas estas proteínas disminuían espectacularmente su expresión en *E.coli ubiE*, un homólogo de *COQ5* (Lee *et al.* 1997). Estos resultados sugieren que Coq5p es esencial para la estabilidad y la actividad de al menos dos de los otros polipéptidos coq, y aportan evidencias genéticas para la formación de un complejo de polipéptidos coq en la biosíntesis de CoQ en levaduras.

5.1.6. Coq6p

COQ6 no es un gen esencial para la viabilidad de las levaduras, pero es requerido para su crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (Gin *et al.* 2003). A nivel de proteína, se encuentra ubicada en la mitocondria, importada mediante una vía dependiente del potencial de membrana y está

periféricamente asociada con la membrana interna de lado de la matriz (Gin *et al.* 2003).

Todos los homólogos de COQ6 en *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, raton y *C.elegans* contienen tres regiones conservadas (Gin *et al.* 2003): de unión a ADP (Wierenga *et al.* 1986), de un motivo de unión a FAD/NAD(P)H (Eppink *et al.* 1997), y de secuencia consenso que se une al motivo ribitil de FAD (Eggink *et al.* 1990).

Debido a este tercer motivo conservado, se ha considerado a Coq6p una proteína monooxigenasa dependiente de flavina responsable de añadir el grupo hidroxilo al ácido 4-hidroxi-3-poliprenil benzoico y/o 6-metoxi-2-poliprenil fenol, en dos pasos de hidroxilación aún no caracterizados en la biosíntesis de CoQ.

5.1.7. Coq7p

El gen en levaduras COQ7/CAT5 fue aislado y caracterizada su función como gen codificador de una proteína necesaria en la biosíntesis de CoQ (Tzagoloff and Dieckmann 1990; Marbois and Clarke 1996). Está implicado en la represión/desrepresión de catabolitos orgánicos (Proft *et al.* 1995).en un sistema que regula la transcripción de los genes de la gluconeogénesis, metabolismo alternativo de carbohidratos, y respiración (Gancedo 1998). Por lo tanto, se ha demostrado que los defectos en la regulación de catabolitos en mutantes de *coq7*, forman parte de un efecto secundario en la deficiencia de la respiración y podría ser recuperado con la adicción de CoQ₆ (Jonassen *et al.* 1998), implicando directamente a *coq7* en la biosíntesis de Q. Además, la expresión de los homólogos de COQ7 de *C.elegans* (Ewbank *et al.* 1997), ratas (Jonassen *et al.* 1996), o humanos (Vajo *et al.* 1999) recuperaban el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables de mutantes *coq7* de levaduras, indicando su conservación funcional a nivel de especie.

Marbois y Clarke, comprobaron su función en la hidroxilación de 5-demetoxiubiquinol (DNQH₂) (Marbois and Clarke 1996). El mutante de levadura *G65D coq7* acumula DMQ6, así como el intermediario ácido 3-hexaprenil-4-hidroxibenzoico (HHB), aunque produjeran únicamente HHB (Marbois and Clarke 1996). Igual ocurría para el mutante *E194K*, y en cambio no se detectaba en cepas donde la mitad del carboxi-terminal de la proteína estaba

ausente (Padilla *et al.* 2004). Estos resultados sugieren que la proteína Coq7p se encuentra también implicada en uno o más pasos de monooxigenasa o funciona como un componente esencial del hipotetizado complejo multifuncional de todas las proteínas Coq. Su función bioquímica como hidroxilasa fue más bien apoyada por la determinación de su pertenencia a una familia de oxidasas de unión a hierro conteniendo una secuencia conservada de un dominio de ligandos de hierro, EXXH (Stenmark *et al.* 2001).

Los homólogos en *Pseudomonas aeruginosa*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *C.elegans* recuperaban la biosíntesis de Q en mutantes *E.coli ubiF* (Stenmark *et al.* 2001; Adachi *et al.* 2003), siendo UbiF, una hidroxilasa DMQ dependiente de flavina que no comparte homología con la proteína Coq7p pero que se ha demostrado que complementa funcionalmente con mutante nulos de *coq7* y *coq7E194K* (productor de DMQ6 con mejor eficiencia en este último) (Tran *et al.* 2006). La conclusión final nos lleva a que la función de *coq7* es la hidroxilación de DMQ. Es más, los niveles continuos y basales de los polipéptidos *coq3*, *coq4* y *coq6* fueron mayores en mutantes *coq7E194K* que en mutante nulos, sugiriendo que la proteína *coq7* y DMQ6 son necesarios para estabilizar otros polipéptidos Coq.

Recientemente estudios de fraccionamiento submitocondrial demostraron que la proteína *coq7* de levaduras así como su homólogo en ratones (Jiang *et al.* 2001), se encuentra periféricamente asociado a la membrana interna en el lado de la matriz. Esto sugiere que Coq7p es una proteína interfacial en la membrana mitocondrial interna (Stenmark *et al.* 2001; Berthold and Stenmark 2003).

5.1.8. Coq8p

El gen *COQ8* fue inicialmente identificado como una ABC1 (Actividad del complejo bc1), por su habilidad a suprimir parcialmente el defecto de traducción del citocromo b debido a la mutación *cbs-223* en el gen *CBS2*. Se trata de un gen nuclear en levaduras que codifica un activador de la traducción de citocromo b (Rodel 1986).

La inactivación de ABC1 resulta en un defecto en respiración y la ausencia de NADH-citocromo c reductasa (Bousquet *et al.* 1991); un fenotipo

similar al de cepas deficiente en CoQ (Tzagoloff and Dieckmann 1990). Subsecuentemente se demostró que los complejos de respiración II, III, y IV de los mutantes nulos de *abc1* eran termosensibles y que la adición de CoQ exógeno podría parcialmente compensar la deficiencia de la respiración (Brasseur *et al.* 1997). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el producto del gen *ABC1* puede funcionar como una chaperona esencial para la propia conformación y actividad de *bc1* y sus complejos vecinos (Brasseur *et al.* 1997). Sin embargo, Do y colaboradores (Do *et al.* 2001) demostraron que el gen *COQ8* requerido para la biosíntesis de Q (Poon *et al.* 1997), coincide con el gen *ABC1* y sugiriendo que la deficiencia de CoQ es exclusivamente responsable por los efectos pleiotropicos de los mutantes *abc1/coq8*.

Aunque su función bioquímica en la biosíntesis de Q es aún desconocida, la proteína Coq8/Abc1 ha sido clasificada como una kinasa al ser identificados cuatro motivos kinasa conservados en su secuencia aminoacídica (Leonard *et al.* 1998).

5.1.9. Coq9p

El gen *COQ9* está recientemente identificado y caracterizado como un nuevo gen que cuando muta confiere un fenotipo deficiente de Q en las levadura, similar al que producen el resto de genes *COQ* (Johnson *et al.* 2005).

Sin embargo la función dentro de la biosíntesis de Q es aún desconocida. La secuencia aminoacídica de la proteína Coq9p contiene un dominio característico conservado que está presente en la familia de proteínas COG5590 (Marchler-Bauer *et al.* 2005). Mientras que los homólogos *COQ9* están bien representados en genomas de eucariotas y alfa-proteobacterias, la proteína Coq9p no presenta homología con proteínas de función conocida.

Curiosamente la expresión en multicopia de *COQ8* recupera la respiración en mutantes puntuales de *coq9* (*coq9-1*; mutación sin sentido E151STOP). Aunque una pequeña cantidad del polipéptido Coq9p es detectada en mutantes *coq9-1*, sus niveles no se elevaron por la supresión de la mutación mediada por *COQ8* (Johnson *et al.* 2005; Hsieh *et al.* 2007). Consecuentemente, el mecanismo responsable para la supresión del multicopia *COQ8* de *coq9-1* es desconocida.

El peso molecular de Coq9p es alrededor de 25 kDa (Hsieh *et al.* 2007), ligeramente más pequeño que su supuesto precursor (29.9 kDa) (Johnson *et al.* 2005), coincidiendo con la retirada de una secuencia de reconocimiento mitocondrial. Sin embargo, el peso nativo de la proteína Coq9p estimada en gradientes de sedimentación en sacarosa es aproximadamente tres veces mayor, indicando bien que la proteína es un homo-oligómero o bien que se encuentra formando complejos con otras proteínas (Johnson *et al.* 2005). Se proponen a los polipéptidos Coq3p y Coq5p como posibles candidatos para la formación de este complejo, ya que ambos co-sedimentan con la proteína Coq9p.

Recientemente se ha demostrado mediante análisis de localización submitocondrial que la proteína Coq9p es una proteína de membrana periférica asociada al lado de la matriz en la membrana mitocondrial interna (Hsieh *et al.* 2007).

5.2. TEORÍA DE UN COMPLEJO MULTIFUNCIONAL DE PROTEÍNAS COQ

Todas las secuencias aminoacídicas para los polipéptidos Coq (salvo Coq7p) en *S.cerevisiae* presentan péptidos señal de localización mitocondrial, pues en su extremo N-terminal están relativamente enriquecidas con aminoácidos de carga positiva. (Hartl *et al.* 1989; Neupert 1997). Además presentan un motivo consenso de tres aminoácidos típico de péptidos señal presentes en proteínas localizadas en la matriz de la mitocondria (Hendrick *et al.* 1989). Se ha demostrado la importación y procesamiento para prácticamente todas las proteínas Coq, siendo además dependiente del potencial de membrana mitocondrial. Es sensato por tanto pensar que debe existir un transporte de CoQ en levaduras, pues este lípido se encuentra asimismo en otras membranas extramitocondriales (Santos-Ocana *et al.* 1998a).

La función de Coq1p está separada del resto de enzimas Coq. Aunque, al menos en levaduras, se localiza en la mitocondria, no se sabe si ésta forma parte del complejo. En mamíferos, en cambio, la actividad nonaprenil-4-hidroxibenzoato transferasa (Coq2p) se ha detectado también en las membranas del retículo endoplásmico y del complejo de Golgi, sugiriendo a

estos compartimentos celulares como una vía de síntesis y distribución del CoQ entre las distintas membranas (Teclebrhan *et al.* 1995; Basselin *et al.* 2005).

Se supone la existencia de un complejo multienzimático (**figura 7**) en eucariotas que necesita la participación coordinada de sus componentes (Poon *et al.* 1995). La mayoría de los estudios se han realizado en *S.cerevisiae*, donde se ha observado la acumulación de hexaprenil hidroxibenzoato en los mutantes *coq3-coq8*. Además, la ausencia de alguno de los polipéptidos Coq afecta a la actividad enzimática del resto (Belogrudov *et al.* 2001; Baba *et al.* 2004; Tran *et al.* 2006).

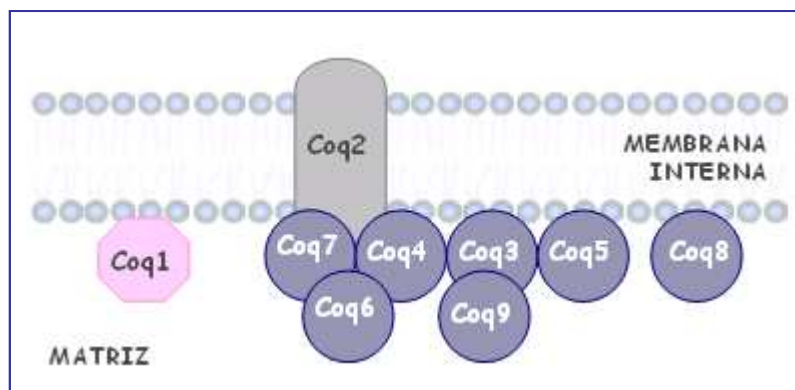


Figura 7. Representación de un hipotético complejo multienzimático en eucariotas

Se han realizado estudios de expresión de *COQ3* en todos los mutantes *coq* sin encontrar cambios de ARNm aunque, en cambio, sí se encuentran diferencias significativas en los niveles de proteína de este enzima. Esto sugiere una posible regulación postranscripcional. Además, la función de Coq3p depende de la presencia del resto de enzimas, ya que no se detectó actividad O-metiltransferasa en los mutantes *coq1*, *coq2*, *coq5*, *coq7* y *coq8*, y escasa actividad en *coq4* y *coq6*. Resulta por tanto razonable el pensar que existan mecanismos de control que aseguren la síntesis equilibrada de cada uno de los productos génicos participantes en esta ruta de síntesis integrantes de este complejo. Podría ser que alguno de los participantes de este complejo actuara como elemento limitante de la síntesis ejerciendo un papel regulador de la velocidad de la propia biosíntesis de CoQ.

6. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE Q

Son numerosos los factores que influyen en la tasa de síntesis de CoQ celular, pero la información actual que existe en eucariotas es aún muy limitada. El modelo donde más se han realizado estudios ha sido el de las levaduras. Debido a la complejidad de la vía, el número de enzimas implicadas, su función y localización, son necesarios realizar aún numerosos estudios que permitan entender la regulación de la síntesis de CoQ. A continuación se recogen distintos estudios que dan información sobre la respuesta de regulación de la vía de síntesis de CoQ ante distintas circunstancias.

6.1 ESTUDIOS EN *Escherichia Coli* Y *Sacharomyces Cerevisiae*

En *E.coli*, la composición del pool de ubiquinona se encuentra altamente influenciado por la disponibilidad de oxígeno, pues las células de *E.coli* durante la respiración presentan mayores niveles CoQ₈. Los mecanismos de regulación son aún desconocidos (Echtay *et al.*). En levaduras (*S.cerevisiae*) los niveles de CoQ están directamente correlacionados con el desarrollo mitocondrial y la disponibilidad de oxígeno (Pennock JF 1983). La biosíntesis de CoQ es muy elevada en células en crecimiento aerobio y casi no detectable en células anaerobias (Lester and Crane 1959). Es más, cuando las levaduras crecen en cultivos aerobios, la cantidad de CoQ varía dependiendo de los catabolitos de carbono (Gordon and Stewart 1969).

Ante una depresión en los niveles de glucosa, aumenta la síntesis endógena de CoQ₆, de forma similar que con la concentración de galactosa. Como es de esperar, la producción de CoQ₆ se ve aumentada en medios que contienen fuentes de carbono no fermentables, cuando la represión catabólica se encuentra al mínimo. Cuando hay una presencia muy elevada de glucosa se acumula en las células el intermediario 3-hexaprenil-4-hidroxibezoato (HHB), haciendo presuponer que uno de los pasos reguladores de la síntesis se encuentra a nivel del COQ3 pues es el gen que codifica la enzima Coq3p, encargada de la O-metilación. Además, existen análisis informáticos que

Introducción

confirman la presencia de aminoácidos susceptibles de fosforilación por una proteína A kinasa en la secuencia de Coq3p, corroborando la posible regulación de la vía a este nivel.

Curiosamente, la suplementación con AMPc (adenosín monofosfato cíclico) alivia los efectos inhibitorios de la glucosa en la biosíntesis de CoQ a nivel enzimático (Sippel *et al.* 1983). La existencia de una regulación a nivel postransduccional viene apoyada más aún por la observación de que sigue produciéndose síntesis de CoQ incluso si se añade un inhibidor de la síntesis de proteínas. Se ha propuesto la participación de una proteína kinasa A mitocondrial dependiente de AMPc para modificar alguna enzima de la síntesis de Q, que podría ser Coq3p, debido a la existencia de las secuencias susceptibles de fosforilación mencionadas anteriormente (Poon *et al.* 2000).

La proteína Coq8p pertenece a una familia de kinasas C (*Aarf2*) muy conservadas evolutivamente. No se le ha atribuido ninguna función en la vía de síntesis pero sí se conoce que su función es necesaria para la completa biosíntesis de Q. Se le han asignado posibles funciones como chaperona en el ensamblaje del complejo de síntesis de CoQ, pero no esto no está aún confirmado, como tampoco lo está su posible función como kinasa. Lo que sí se ha demostrado en estudios realizados en levaduras es que en ausencia del gen *COQ8*, la proteína Coq3p presenta un único punto isoeléctrico y no dos isoformas de punto isoeléctrico distinto en estirpes silvestres debida la fosforilación en algún residuo, ya que el tratamiento con fosfatasas comerciales elimina esta segunda isoforma (Tauche *et al.* 2008). Esto sugiere finalmente que Coq8p podría regular la vía por medio de fosforilaciones, aunque no se ha demostrado totalmente que se encargue de llevar esta función post-transduccional.

La regulación de la vía podría afectar a uno de los últimos pasos de la síntesis: La transformación de demetoxi-CoQ (DMQ) en demetil-CoQ. El DMQ es un precursor tardío y estable de CoQ pero no realiza funciones de respiración ni antioxidantes (Padilla *et al.* 2004). La acción enzimática de Coq7p y Coq3p lo transforman en CoQ. Los cambios en CoQ/DMQ(6) se acompañan de cambios en la expresión en el ARNm del gen *COQ7*, que codifica Coq7p para hidroxilar DMQ (Padilla *et al.* 2009) el penúltimo paso de la biosíntesis de CoQ. Mutantes nulos de CoQ en levadura no acumulan ningún

intermediario tardío de CoQ. Sin embargo en los mutantes *coq7*, la adición de CoQ exógeno produce la síntesis de DMQ. Efectos similares fueron obtenidos con la sobreexpresión de *ABC1/COQ8*. Estos resultados apoyan la existencia del complejo mencionado anteriormente, que permite la acumulación de DMQ(6) y sugiere que *Coq7p* es un punto de control importante para la regulación de la biosíntesis de CoQ en levaduras.

6.2. ESTUDIOS EN MAMÍFEROS

Poco se conoce de la regulación transcripcional de la biosíntesis de CoQ en mamíferos, particularmente en humanos, pero se ha observado que en los sistemas animales los niveles de CoQ responden al estrés oxidativo generado por distintas vías como el ejercicio físico, la adaptación al frío, el tratamiento con hormonas tiroideas, o a los procesos biológicos asociados con la edad.

Debido al número de patologías actualmente identificadas en humanos que están asociadas con deficiencias primarias de CoQ, es necesaria una comprensión completa de su vía de síntesis, desde el estudio funcional de todas las enzimas implicadas, hasta los mecanismos regulatorios de la vía.

6.2.1. INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE CoQ

6.2.1.1. Compuestos exógenos

En cultivos celulares, los ácidos 4-clorobenzoico y 4-aminobenzoico (análogo estructural del anillo benzoquinónico del CoQ) inhiben *Coq2p*, dando lugar a un decremento de CoQ (*Alam et al. 1975*). No existe un inhibidor de la biosíntesis de CoQ en animales, pero si existen compuestos que se traducen en un decremento de sus niveles. Por otro lado tratamientos durante 20 días con dietas que contienen tiouracilo mostraron una disminución de un 24 % en el CoQ en hígado, además de inhibir la función de la glándula tiroidea. El contenido de CoQ también disminuyó en el hígado de ratas a las que se les suministró vitamina A (*Crane et al. 1994; Sohlenius-Sternbeck et al. 2000*). Dietas de tres semanas exentas en proteínas disminuyeron hasta un 30% la cantidad de CoQ en hígado y corazón de ratones pero no tuvieron este efecto en el riñón, páncreas y cerebro (*Iuchi and Lin 1991*). No obstante, se debe

tener en cuenta que la privación completa de proteínas altera otros sistemas biosintéticos, siendo posiblemente las modificaciones de la ruta de CoQ observadas una parte de una modificación mucho más extensa del metabolismo celular.

6.2.1.2. Regulación de la vía de mevalonato

La regulación en la vía de síntesis del mevalonato se encuentra sujeta a dos ejes importantes, el eje central y el terminal. En el eje central, esta vía es regulada por la enzima HMG-CoA reductasa, que determina el pool de farnesil pirofosfato, sustrato común de la síntesis de CoQ, colesterol y dolicol, entre otros. La cantidad de este intermediario preferentemente afecta a la síntesis de colesterol (Faust *et al.* 1980) ya que la escualeno sintasa tiene una alta K_m por su sustrato (FPP) por lo que, cuando disminuye el pool de FPP, la actividad de esta enzima no se satura, traduciéndose esto como una disminución en la síntesis de colesterol.

Por otro lado la afinidad de otras enzimas como *cis*- y *trans*-preniltransferasas y farnesil-proteína transferasa es muy elevada, por lo que niveles bajos de FPP son suficientes para su saturación. (Reiss *et al.* 1992) Esta situación es de gran interés en la medicina, pues es la base para el uso de drogas comunes como las estatinas, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, cada vez más utilizada en tratamientos para la hipercolesterolemia en humanos. No obstante, estudios llevados a cabo en sangre de humanos y en distintos órganos de ratas han demostrado que los tratamientos con estatinas afectan no sólo a la síntesis del colesterol, sino también a la de otros lípidos como CoQ y dolicol. (Willis *et al.* 1990; Elmberger *et al.* 1991; Ericsson *et al.* 1992; Ghirlanda *et al.* 1993; Teclebrhan *et al.* 1993). Sin embargo la reducción de CoQ se ha observado en tratamiento con simvastatina pero no con artovastatina, sugiriendo que los distintos tipos de estatinas difieren en el efecto metabólico (Schick *et al.* 2007). Las deficiencias de CoQ pueden ser recuperadas con suplementos orales de CoQ en pacientes hipercolesterolémicos que utilizan terapias con estatinas, sin causar efectos negativos para su salud (Villalba *et al.* 2010).

6.2.1.3. Metabolitos intermediarios

No se han descrito metabolitos o intermediarios que actúen como sustancias reguladoras de esta vía metabólica, pero un posible candidato podría bien ser el farnesol o sus derivados metabólicos, pues está implicado en el crecimiento celular, síntesis de fosfatidil colina, generación de ROS, apoptosis, y degradación de HMG-CoA reductasa, entre otros (Correll *et al.* 1994; Machida and Tanaka 1999; Machida *et al.* 1999).

6.2.2. ACTIVADORES DE LA SÍNTESIS DE CoQ

6.2.2.1. Incorporación de CoQ

La incorporación de CoQ en varios órganos es limitada y no puede compensar la pérdida observada durante el envejecimiento y varias condiciones patológicas asociadas. Resulta esencial conocer los factores capaces de regular aguas arriba la biosíntesis de CoQ e incrementar la concentración de este lípido en varios órganos.

En sistemas experimentales es posible conseguir este objetivo, por ejemplo con la administración de inductores de peroxisomas en roedores (Aberg *et al.* 1996). Por ejemplo el DEHP (Di(2-ethylhexyl) phthalate), clofibrato, ácido 2-etil hexanoico, y ácido acetilsalicílico, han sido suministrados a ratas. En roedores la mayoría de las drogas usadas son ácido plefluorooctanoico 0.02%; WY-14643, 0.125%; y nafenopinina, 0.125% (Reddy and Chu 1996).

Se conocen un gran número de compuestos sintéticos y naturales que inducen los peroxisomas, como las drogas hipolipidémicas y drogas anti-inflamatorias, algunos solventes, herbicidas y plasticidas, entre otros. (DePierre *et al.* 1995; Reddy and Chu 1996). Existe una relación directa entre la β -oxidación y el aumento de CoQ, pues consecuentemente algunos de estos inductores aumentan la concentración de lípidos varias veces en el hígado, mientras que otros solo aumentan un 10-20%. La mayoría de los órganos estudiados están involucrados en esta respuesta, a excepción del cerebro. En ratas de avanzada edad (16 meses) la inducción de la β -oxidación es de 30

veces, pero no se detectan incrementos en los niveles de CoQ, indicando que otros factores están también implicados en la determinación del contenido de CoQ. (Turunen and Dallner 1998). Contrario a la incorporación selectiva que tiene lugar con el CoQ de la dieta, el incremento observado después de la administración de dichos inductores se observa en todas las organelas, resultando en una activación de la biosíntesis y manteniéndose inalterable la tasa de degradación.

6.2.2.2. Hormonas

Las hormonas son reguladoras de un gran número de funciones tisulares, así que es de esperar que la biosíntesis de CoQ se encuentre también regulada por distintas hormonas, aunque los mecanismos de control aún no sean claros. La administración de la hormona de crecimiento, tiroxina, dehidroepiandrosterona y cortisona aumentan las concentraciones de CoQ en el hígado de ratas en un 15%, 55%, 75% y 120%, respectivamente (Reddy and Chu 1996) Es muy probable que las modificaciones en los niveles de CoQ y su síntesis que se dan en algunos procesos patofisiológicos puedan relacionarse directamente con los efectos hormonales, siendo por tanto de vital interés el conocer la implicación de las hormonas en la regulación de la vía de síntesis del CoQ.

6.2.2.3. Temperatura

Se ha demostrado que ratas expuestas a temperaturas frías (4°C durante 10 días) incrementan los niveles de CoQ en el hígado (Aithal *et al.* 1968). En ratones después de 3 semanas de exposición aumentan su contenido de este lípido en un 60% en el hígado, pero permanecen inalterables los niveles en el riñón. (Bentinger *et al.* 2003), lo cual indicaría que esta respuesta puede ser específica de tejido. Estos cambios, podrían estar conectados directamente a un control hormonal.

6.2.2.4. Ejercicio

Los ejercicios de resistencia incrementan la concentración de CoQ en el músculo de rata referida al peso del animal (Gohil *et al.* 1987; Quiles *et al.*

1994). Este aumento se explica principalmente por una subida de la masa mitocondrial. En cambio, el contenido de CoQ en el músculo no aumenta en humanos tras cuatro días con un ejercicio intenso (Svensson *et al.* 1999).

6.2.2.5. Receptores nucleares.

Los receptores de hormonas nucleares son factores de transcripción con una unión al ADN dependiente de ligando que ejercen control sobre la expresión de un gran número de genes (Khorasanizadeh and Rastinejad 2001). La mayoría de los receptores involucrados en la regulación del metabolismo de lípidos son heterodímeros del receptor reinoide X (RXR), el cual posee tres isoformas: α , β , y γ (Rastinejad 2001). En ratones deficientes de RXR α específico de hepatocito, la concentración de CoQ en el hígado disminuye a la mitad que la encontrada en el control, la cantidad de lípidos es notablemente aumentada con la administración de inductores peroxisomales, y los ratones deficientes de RXR α no incrementan la concentración de CoQ bajo una exposición al frío (Bentinger *et al.* 2003). El RXR funciona como heterodímero y su forma nativa no es conocida, probablemente sea un receptor X de hígado o de farnesol. Al receptor α proliferador de peroxisomas (PPAR α) se le asocian funciones como regulador de la biosíntesis de CoQ (Turunen *et al.* 2000). En el hígado de ratones nulos en PPAR α , la cantidad de CoQ es la misma que en el control, pero la administración de inductores de peroxisomas, tales como DEHP, no incrementan la concentración de este lípido. También se encuentran reguladas las actividades enzimáticas de la trans-preniltransferasa (equivalente a Coq1p de levaduras) y nonaprenil-4-hidroxibenzoato transferasa (Coq2p) bajo la inducción de peroxisomas en el tipo silvestre en contraposición con los ratones nulos PPAR α .

La implicación de los receptores nucleares en la biosíntesis de CoQ es de valioso interés, porque su acción reguladora es específicamente dirigida al CoQ y no influye en el metabolismo del colesterol, dolicol y dolicol fosfato. Los efectos observados son el resultado de alteraciones de la biosíntesis, permaneciendo inalterable la tasa de degradación. Si se identificaran concretamente esos receptores se podrían desarrollar drogas que modularan la expresión de los genes. Un ejemplo son los inductores de peroxisomas, actualmente efectivos en roedores pero no en humanos. Existen drogas no

tóxicas como el clofibrato que incrementan la síntesis endógena de CoQ en la mayoría de los órganos, y son distribuidos en orgánulos celulares.

Que estos receptores regulen las cantidades de CoQ sugiere que son necesarios para la transcripción basal de los genes implicados en la biosíntesis de CoQ. Todos estos datos apoyan la presencia de uno o varios elementos de respuesta en los promotores de los genes de biosíntesis.

Por otro lado se han realizado estudios centrándose en los mecanismos regulatorios de la expresión de genes *COQ* como dianas en la regulación transcripcional de la vía de síntesis. Así, se ha demostrado que la camptotecina (CPT), una droga quimioterapéutica, aumenta la tasa de biosíntesis de CoQ (Brea-Calvo *et al.* 2006) cambio que se ve correspondido por el aumento de transcripción de al menos tres genes *COQ*: *COQ4*, *COQ7* y *COQ8*. La CPT es una droga citotóxica ampliamente usada en terapias de cáncer cuya principal diana es la topoisomerasa nuclear 1 (TOP1) (Hsiang *et al.* 1985; Hsiang and Liu 1988; Pommier 2006). El aumento de la síntesis de CoQ se explica con el aumento de especies reactivas de oxígeno que genera este agente en las células.

En particular con *COQ7*, se ha demostrado que NF- κ B, un factor de transcripción sensible al estado redox que regula enzimas antioxidantes como MnSOD (superóxido dismutasa), es capaz de unirse específicamente a dos sitios de unión κ B del promotor de *COQ7* en respuesta a CPT. Todos estos resultados dirigen al CoQ como una molécula antioxidante cuyos niveles se incrementan ante el estrés oxidativo generado por este agente (Brea-Calvo *et al.* 2009).

7. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN DEL COENZIMA Q

Todos los descubrimientos hasta ahora realizados facilitan el entendimiento de los procesos enzimáticos de la biosíntesis de CoQ, el papel funcional de cada enzima implicada, la distribución heterogénea del CoQ, así como la comprensión de los mecanismos de regulación de su biosíntesis. Éstos

resultan de vital interés debido a la función antioxidante de CoQ en la defensa ante el daño oxidativo generado en los procesos de envejecimiento en humanos; y porque además, deficiencias en el contenido de CoQ y distintos desórdenes en los genes de su biosíntesis son responsables del origen de varias patologías en humanos. Estos casos clínicos muestran deficiencias en el contenido de Q que son específicas de tejido. Por ejemplo, un caso clínico con miopatía mitocondrial presentaba una reducción al 10% del contenido de CoQ10 normal en el músculo, registrándose sin embargo niveles normales en fibroblastos y plasma (Ogasahara *et al.* 1989; Montero *et al.* 2007). Esta deficiencia curiosamente se recuperaba con suplementos de CoQ₁₀ exógeno, sugiriendo que este paciente tenía problemas en la vía metabólica de CoQ. Recientemente se ha descubierto que la enfermedad de Leigh está causada por mutaciones en tres genes de la biosíntesis de CoQ concretamente en *COQ2*, en *DPS1(PDSS1)*, en *DLP1(PDSS2)*, y en *COQ8* (Hirano *et al.* 2006; Lopez *et al.* 2006; Quinzii *et al.* 2006; Mollet *et al.* 2007; Quinzii *et al.* 2007; Quinzii *et al.* 2008; Saiki *et al.* 2008).

Los resultados obtenidos en roedores en respuesta a la RC muestran cambios en los niveles de CoQ. Esto debe de implicar una serie de mecanismos de regulación en la biosíntesis en respuesta a la RC que repercuten en los contenidos finales de este antioxidante lipídico modificando el perfil de expresión de los genes de su biosíntesis. Además, se ha comprobado que la respuesta no es homogénea en todos los tejidos.

Porque además de estimular el sistema antioxidante de la membrana plasmática, esta intervención no genética incrementa la longevidad disminuyendo el daño oxidativo a través de la modulación de la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos en los tejidos, es importante determinar las distintas vías de actuación de la restricción calórica.

La investigación propuesta en el presente proyecto aportará una información nueva en cuanto a si el contenido lipídico de distintas intervenciones de restricción calórica produce cambios relevantes del contenido endógeno de CoQ en un número suficiente de tejidos; y si la respuesta de expresión de los genes que codifican los enzimas de su biosíntesis vinculan al CoQ como otro diana de la RC en sus mecanismos de acción sobre las membrana lipídicas para la extensión de la longevidad.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar el efecto del componente graso de la dieta y la restricción calórica sobre el sistema del coenzima Q en tejidos mitóticos y postmitóticos de ratones jóvenes.

Objetivos Específicos

- 1. Estudiar la distribución de coenzima Q (niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀ y relación CoQ₉/CoQ₁₀) en el hígado, riñón, cerebro, músculo esquelético y corazón en un estado metabólico basal.***
- 2. Cuantificar los niveles de transcrito de genes COQ (mSPS1, mDLP1, mCOQ2, mCOQ3, mCOQ7 y mCOQ8), que codifican enzimas responsables de la etapa final de síntesis de coenzima Q, así como los niveles de las proteínas Coq2p y Coq3p, responsables del primer y último paso en la ruta específica de síntesis de CoQ.***
- 3. Establecer el efecto de la restricción calórica a corto plazo sobre la distribución de coenzima Q y sobre los niveles de transcrito de genes y proteínas en los órganos indicados anteriormente.***
- 4. Estudiar la influencia del grado de instauración del componente graso de tres dietas (grasa animal altamente saturada, aceite de soja rico en ácido linoleico o aceite de pescado rico en ácidos grasos poliinsaturados n-3) sobre el contenido de coenzima Q, la expresión de genes COQ y los niveles de Coq2p y Coq3p.***
- 5. Estudiar la posible interacción entre la restricción calórica y el componente graso de la dieta sobre los parámetros señalados anteriormente.***

Material y Métodos

1. ANIMALES

Se utilizaron ratones C57BL/6 macho, obtenidos de los Laboratorios Charles River (MA, USA) con una edad de 3 meses. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad a una temperatura de 22 °C. El acceso al agua fue continuo durante todos los experimentos. Los ratones se alojaron en jaulas de manera individual para permitir una mayor exactitud en cuanto a las determinaciones de la cantidad de ingesta.

Todos los animales fueron cuidados de acuerdo con la normativa actual recogida en la “*Guide for Care and Use of Laboratory Animals*” y el “*Animal Welfare Act.*”. Los protocolos han sido revisados y aprobados por los correspondientes Comités Éticos de Experimentación Animal de la Universidad de California-Davis (UC-Davis, Estados Unidos), y la Universidad Pablo de Olavide (UPO).

2. INTERVENCIÓN DIETÉTICA

A los 4 meses de edad, los ratones fueron asignados de manera aleatoria a los distintos grupos dietéticos y fueron alimentados con una dieta purificada AIN-93M (Research Diets, NJ, USA). La ingesta *ad libitum* diaria se determinó a lo largo de un periodo de 3 semanas en un grupo de 30 ratones. Esta medición de ingesta se usa para calcular la cantidad de comida suministrada a los grupos control y RC durante la fase experimental. Así, los grupos control fueron alimentados con una cantidad de dieta correspondiente al 95% de la ingesta *ad libitum* determinada anteriormente. Esta restricción de un 5% es un procedimiento estándar para prevenir una ganancia excesiva de peso y el desarrollo de obesidad en estos animales. Los animales de los correspondientes grupos de RC se alimentaron con una cantidad de dieta correspondiente al 60% de la ingesta AL, conteniendo todos los componentes vitamínicos y minerales suficientes para asegurar que la ingesta absoluta de éstos sea la misma para todos los grupos experimentales.

DIETAS AIN-93M			
INGREDIENTES	TERNERA (g)	SOJA (g)	PESCADO (g)
Caseína	200,00	200,00	200,00
Maicena	397,48	397,48	397,48
Dextrosa	132,00	132,00	132,00
Sucrosa	100,00	100,00	100,00
Celulosa	50,00	50,00	50,00
Aceite de soja	0	70,00	0
Manteca	70,00	0	0
Aceite de pescado	0	10,00	60,00
t-butilhidroxiquinona	0,014	0,014	0,014
Mezcla mineral	35,00	35,00	35,00
Mezcla vitamínica	10,00	10,00	10,00
L-cisteína	3,00	3,00	3,00
Colina bitartrato	2,50	2,50	2,50

Tabla 1. Contenido en gramos de las tres dietas experimentales

Los tres grupos control recibieron una dieta AIN-93M (**Tabla 1**), cuya única variante entre ellos era la fuente lipídica principal, siendo bien aceite de soja, aceite de pescado o grasa animal, mientras que los restantes 3 grupos fueron sometidos a una RC del 40% de las respectivas dietas AL.

Las medidas de ingesta y comprobaciones de salud se llevaron a cabo diariamente en todas las fases del estudio. Todos los animales se pesaron semanalmente.

3. TOMA DE MUESTRAS

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical después de un mes de intervención dietética y previo ayuno nocturno. Las muestras de órganos se recogieron, numeraron y almacenaron a -80 °C en una solución

acuosa RNAlater (Sigma) para asegurar la calidad y cantidad de ARN celular hasta comenzar con los experimentos diseñados.

En cada dieta se sacrificaron 36 roedores, 18 alimentados en condiciones AL y 18 en RC. De cada animal se aislaron muestras de hígado, riñón, cerebro, músculo (gastrocnemio de la pata trasera) y corazón. Para que el estudio fuera lo más uniforme posible, se seleccionaron las mismas zonas de cada tejido en todos los roedores.

4. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS QUINÓNICOS

La extracción de coenzima Q (CoQ) se realizó sobre la base del protocolo descrito por Menke (Menke *et al.* 2000). Los niveles de CoQ total presentes en cultivos celulares y órganos, se determinaron mediante cromatografía HPLC con detección electroquímica y ultravioleta.

Todas las muestras fueron homogenizadas en 100 μ l de solución de Hank con ayuda de un motor eléctrico acoplado a un pistón cónico (Kontes). Se separaron 10 μ l para la cuantificación de proteína mediante la técnica de Bradford (ver más adelante) y a los 90 μ l restantes se añadió SDS 10 % hasta completar un volumen de 100 μ l. La mezcla resultante se agitó con vórtex durante 1 minuto y se añadieron dos volúmenes de 95 % etanol- 5% isopropanol para la rotura de las membranas celulares. Se agitaron de nuevo durante un minuto, se añadieron 5 volúmenes de hexano (grado HPLC, Merck) y se centrifugaron durante 5 minutos a 10000 x g a 4 °C. El resultado fue la obtención de dos fases, una inferior correspondiente a la fase acuosa y una superior correspondiente a la fase de hexano. De la fase superior, se recogieron 200 μ l que se secaron en speed-vac durante 20 minutos.

5. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COENZIMA Q EN HPLC

Se utilizaron dos métodos de cuantificación; en el primero los niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀ se cuantificaron mediante cromatografía líquida de fase reversa en un equipo de HPLC (Beckman, System Gold) en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la UCO. El residuo seco fue resuspendido en 30 µl de etanol (grado HPLC, Panreac) para posteriormente inyectar la muestra (20 µl) con la ayuda de una jeringa Hamilton. La separación se llevó a cabo en una columna de fase reversa C18 (25 x 0,45 cm, 5 µm de tamaño de partícula, Beckman) a un flujo de 1 ml/min. La fase móvil contenía una mezcla 1:1 de metanol y 1-propanol; y 2 g/l de perclorato de litio como conductor electroquímico. La monitorización fue seguida en un detector electroquímico Coulochem II (ESA, Chemsford, MA) acoplado a una célula analítica (Modelo 5010) cuyos electrodos registraban un potencial de -500 mV y + 300 mV. La señal de coenzima Q fue detectada en el segundo electrodo y las cantidades se calcularon mediante integración de los áreas obtenidos para los dos estados reducido y oxidado de CoQ₉ y CoQ₁₀; y su comparación con una recta patrón creada a partir de cantidades conocidas de estándares externos comerciales de CoQ₉ y CoQ₁₀ con el fin de disminuir el error experimental debido a oscilaciones observadas en la sensibilidad del detector.

Las concentraciones reales de las soluciones patrón de CoQ₉ y CoQ₁₀ comercial se determinaron midiendo su absorbancia a 275 nm, y aplicando un coeficiente de extinción molar (13,2 mM⁻¹ cm⁻¹).

En el segundo caso, la cuantificación se realizó en el Servicio de Fisiopatología Celular y Bioenergética de la Universidad Pablo de Olavide mediante un sistema de cromatografía compuesto por bombas de HPLC del modelo 126 de (Beckman Coulter), una columna de fase reversa kromasil C-18 termostaticada a 40 °C con un horno de columna, un detector ultravioleta en serie de tipo Diode Array modelo 166 (Beckman Coulter) y un detector electroquímico (ESA Coulochem III) compuesto de una célula guarda (modelo

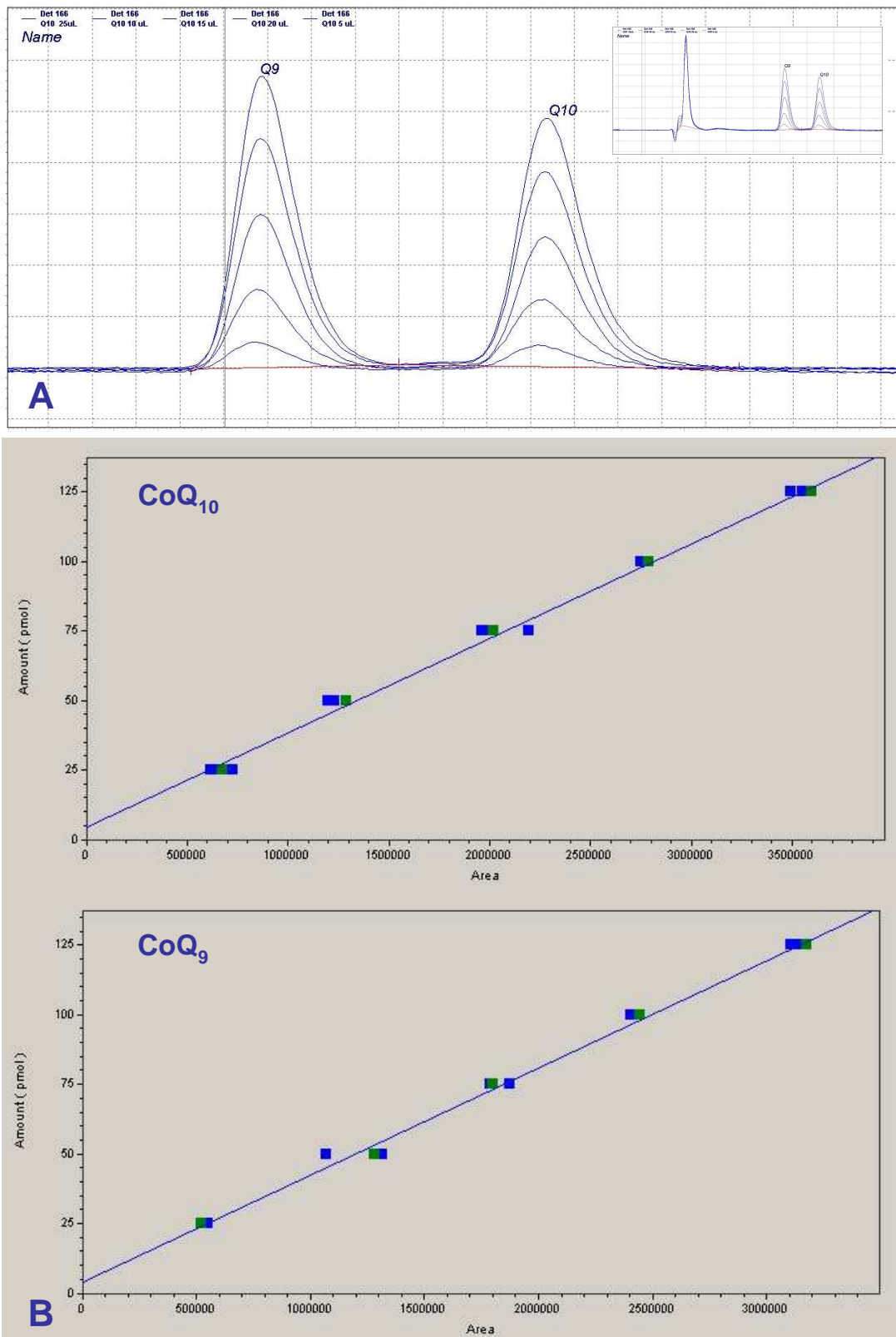


Figura 8. A. Superposición de cromatogramas correspondientes a 25-50-75-100-125 pmoles de CoQ₉ y CoQ₁₀ de estándares externos. B. Rectas patrón de CoQ₉ y CoQ₁₀ obtenidas con 4 réplicas de cada estándar a distinta concentración

5020) situada antes del inyector automático configurado a +500 mV en serie tras el inyector automático, para oxidar la mezcla muestra-fase móvil.

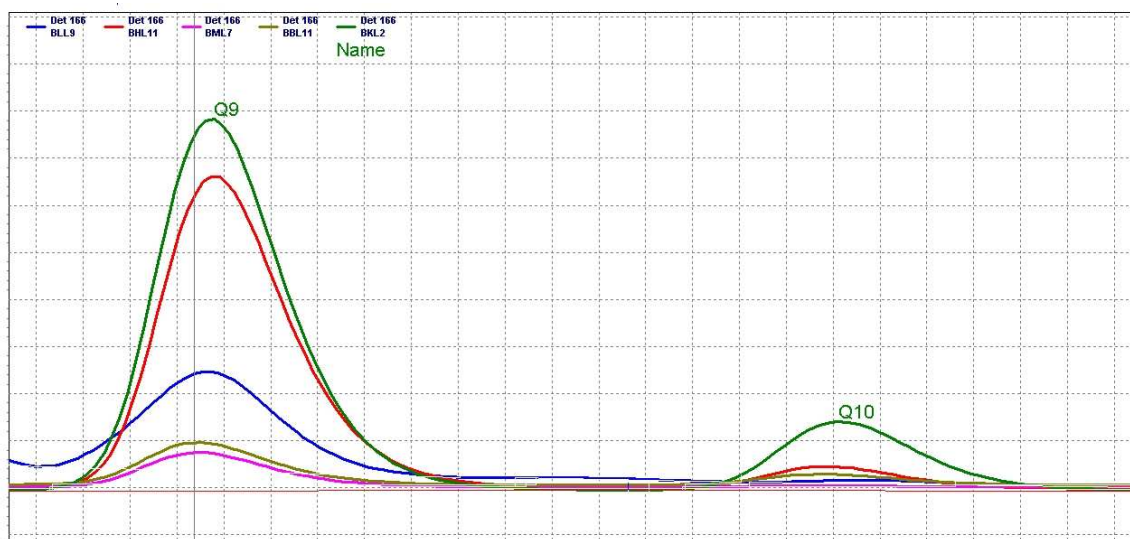


Figura 9. Superposición de cromatogramas correspondientes a una muestra de cada tejido analizado. (azul) hígado , (verde) riñón, (verde oliva) cerebro, (rosa) músculo y (rojo) corazón

Las muestras se resuspendieron en 60 μ l de etanol y se cuantificaron por duplicado tomando 20 μ l en cada inyección. La fase estaba compuesta por una mezcla 1:1 de metanol y 1-propanol conteniendo acetato amónico 2 mM sin gradiente puesto que la aparición de coenzima Q₉ y coenzima Q₁₀ se observaban con un desfase de 2 minutos; a los tiempos 7 y 9 minutos respectivamente. La célula analítica 5010 se configuró a E1= -500 mV y E2= +500 mV. El sistema se controla mediante el software cromatográfico 32 Karat 5.0 de Beckman coulter. El CoQ₉ y CoQ₁₀ comercial (oxidados) se usaron como estándares externos al igual que en el primer método (**Figura 8**).

6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cantidad de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford 1975). Por duplicado medimos cada muestra en cubetas de espectrofotómetro con una longitud de paso de luz de 1 cm donde se añaden 50 μ l de NaOH 1 M, una alícuota de la muestra (hasta 20 μ l) y 1 ml de reactivo de Bradford. La mezcla se mantiene durante 10 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz para que se pueda producir la reacción. La

medida se llevó a cabo en un espectrofotómetro Beckman DU-640 UV-visible a una longitud de onda de 595 nm. Previamente se realizó una recta patrón con concentración conocida de la proteína γ -globulina (0-20 ug) para poder estimar la concentración proteica de toda la batería de muestras.

7. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL

7.1. SELECCIÓN DE CEBADORES

Los cebadores (**Tabla 2**) fueron diseñados con el Software Primer3 (versión 0.4.0) a partir de las secuencias codificantes de cada gen de estudio publicadas en NCBI.

Los parámetros de selección establecidos requerían que cada pareja de cebadores no difiriera de más de 0.5 °C en la temperatura de alineamiento, se excluyeron aquellos que pudieran formar dímeros de cebador y que el producto amplificado se encontrara entre un peso no superior a 210 pb ni inferior a 80 pb.

A continuación las secuencias amplificadas se alinearon con el programa BLAST (NCBI) para revisar la homología potencial respecto a otras secuencias distintas de nuestros genes de interés.

CEBADORES	Sentido (5'-3')	Anti-sentido (5'-3')	PCRp (pb)	Nº acceso Genbank
<i>mHPRT</i>	CAGTCAACGGGGGACATAAA	AGAGGTCCTTTTCACCAGCAA	183	NM_013556
<i>mSPS1</i>	CATCAAAGGACACCAGCAATGT	GCACCACAATAATCGGTCTAAAGG	208	NM_019501
<i>mDLP1</i>	ATGCTGACCTCCAGCCTTTT	GTCACACCTTTGCCAGCTTT	196	NM_027772
<i>mCOQ2</i>	GCCCACCAGGACAAGAAAGAC	AGCCACAGCAGCGTAGTAGG	171	NM_027978
<i>mCOQ3</i>	GTGAGCCACCTGAAAATGTT	CCCACGTATGAGTGCCTTTT	163	NM_172687
<i>mCOQ7</i>	TGATGGAAGAGGACCCTGAGAAG	GCCTGTATCGTGGTGTCAAGC	89	NM_009940
<i>mCOQ8</i>	AGCAAGCCACACAAGCAGATG	CCAGACCTACAGCCAGACCTC	106	NM_023341

Tabla 2. Características de cebadores usados para las determinaciones. Los cebadores utilizados para amplificar el gen constitutivo mHPRT fueron validados por Luque (Luque *et al.* 2009)

7.2. VALIDACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS CEBADORES

7.2.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se realizaron PCRs convencionales que amplificaran el ADNc sintetizado mediante transcripción reversa (RT, First Strand Synthesis kit. Fermentas, Canadá) usando una mezcla de hexámeros aleatorios a partir del ARN total aislado de cada muestra. Las condiciones de amplificación consistían de un paso de pre-incubación a 94° 10 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto, alineamiento a 61 °C, 1 minuto, y extensión a 72 °C, 1 minuto.

7.2.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

El producto de PCR de cada gen fue confirmado en geles de agarosa al 1 % de forma que una única banda fuera amplificada, coincidiera con el peso del producto de PCR esperado y que la amplificación no formara dímeros.

7.3. OBTENCIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR

7.3.1. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Una vez validada la eficiencia de los cebadores, se purificaron los productos de PCR de todos los genes siguiendo el protocolo de AccuPrep Gel Purification Kit (Bioneer) con el fin de generar curvas estándar para el análisis cuantitativo en RT-PCR a tiempo real. Se secciona la banda correspondiente con cada producto de PCR y se mezcla con 5 volúmenes de una solución de unión al gel de agarosa y se incuba durante 10 minutos a 60 °C hasta que se funde el gel. A continuación se añade 1 volumen de isopropanol absoluto y se mezcla sin vortex. Las muestras se hacen pasar a través de columnas con filtros de cristal incorporados que absorben el ADN dejando pasar las sales y el gel licuado. Finalmente se hacen dos lavados con la solución de lavado (WB) y el producto de PCR se recupera en 30 µl de solución de elución (EL).

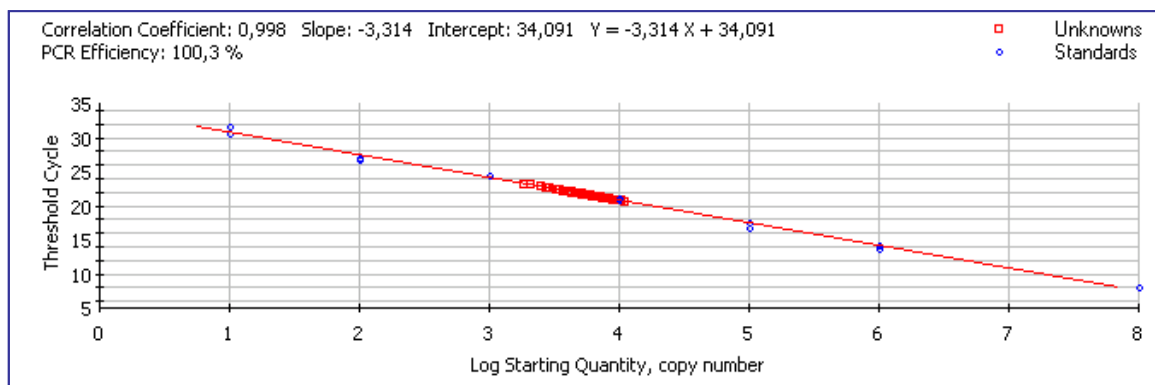


Figura 10. Representación de una curva estándar de un gen conteniendo 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^8 copias del ADNc/ μ l y el número de copias (expresado en logaritmo) obtenido a partir de un microlitro de ADNc de cada muestras analizada para ese gen

7.3.2. CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

La concentración de productos de PCR purificados fue determinada mediante el kit de cuantificación de DNA Picogreen (Molecular Probes, USA) y su detección en Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek).

Los productos fueron diluídos en tampón E (**anexo, núm. 1**) para la generación de curvas estándar conteniendo 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^8 copias del ADNc/ μ l. Éstas fueron amplificadas junto con la batería de muestras para estimar el número de copias/gen a tiempo real.

7.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

7.4.1. AISLAMIENTO DE ARN

El ARN total del hígado, riñón y cerebro se extrajo mediante Absolutely-ARN-kit (Stratagene); mientras que el ARN total de corazón y tejido muscular esquelético se extrajo utilizando el Kit Tripure Isolation Reagent (Roche).

La concentración y pureza del ARN se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm y el ratio 260nm/280nm respectivamente, considerándose valores óptimos de pureza los comprendidos entre valores de 1,7 y 2 unidades.

7.4.2. TRATAMIENTO CON DNASA I

Para eliminar los posibles restos de ADN genómico que pudiera contener, el ARN total obtenido con el kit Tripure Isolation Reagent fue tratado durante 30 minutos con DNaseI-RNase-Free (BioLabs). El protocolo del Absolutely-ARN-kit ya incluía el tratamiento con DNasa.

7.4.3. SÍNTESIS DE ADN_c

En un volumen de 20 µl se realizó la transcripción inversa de 2500 ng de ARN total usando los reactivos proporcionados por el kit cDNA First-Strand Synthesis (Fermentas). Alícuotas de 1 µl fueron amplificadas por qRT-QPC a tiempo real usando los cebadores especificados en la **tabla 2**. La amplificación de cada muestra se analizó por duplicado.

7.5. RT-PCR A TIEMPO REAL

Para la qRT-PCR a tiempo real se utilizó un termociclador de fluorescencia iCycler Optical Module (BioRad). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo 12,5 µl del reactivo IQ tm SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 9,5 µl de agua destilada, 1 µl de cada cebador específicos de cada gen (10 µM de la solución stock) y 1 µl de ADN copia.

7.5.1. CONDICIONES DE PCR

El programa utilizado en el termociclador se indica a continuación:

Ciclo 1:(x1)	Pre-incubación	2:00 min	94 °C
Ciclo 2:(x40)	Desnaturalización	00:15 min	94 °C
	Anillamiento	00:15 min	61 °C
	Extensión	00:15 min	72 °C
Ciclo 3: (x95)		00:05 min a + 0,5 °C/ciclo	
Ciclo 4: (x1)		Indefinido a 4 °C	

En el ciclo 3 los productos finales de PCR fueron sujetos a un gradiente de disociación dependiente de temperatura para verificar que un solo producto génico era amplificado. Como control para genómico y/o contaminación de ADN se utilizaron muestras de ARN que no fueron retrotranscritas.

Un microlitro de cada estándar fue amplificado junto con el ADNc de la batería de muestras para estimar el número de copias/gen a tiempo real.

La batería de cebadores con eficiencias entre el 90% y 110% fueron aceptados, considerándose un 100% de eficiencia de amplificación cuando todas las hebras copias están siendo copiadas en cada ciclo de amplificación.

7.6. CONTROL INTERNO

Para disminuir el error experimental generado por las variaciones en la cantidad de muestra, el ARN de cada tejido usado en la reacción de RT y la eficiencia de la reacción de RT, fue necesario realizar un estudio previo de selección de los genes internos que aportaran la menor variabilidad de expresión ante las distintas condiciones experimentales. Para ello se midieron los niveles de expresión (número de copias) de *mGAPDH* (gliceroaldehído 3-fosfato deshidrogenasa), *mHPRT* (hipoxantina ribosiltransferasa) y *ARNr 18S* (ARNr de la subunidad pequeña de los ribosomas eucarióticos) en las muestras de animales alimentados con la dieta basada en aceite de soja en las dos condiciones experimentales: AL y RC. Para determinar si estos genes eran apropiados para ser usados como controles internos, su estabilidad se determinó mediante el programa GeNorm 3.3 Visual basic application (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) previamente validado y desarrollado por Vandesompele y colaboradores (Vandesompele *et al.* 2002). Este programa calcula el promedio de variación por pares de un gen determinado con los otros genes control, permitiendo excluir los controles menos estables y calculando un nuevo valor M de los genes válidos. ($M < 1.5$ indica que un gen es estable o válido para usarse como control interno). La media aritmética del número de copias para los genes más estables es entonces usada como factor de normalización (NF).

En nuestro estudio, el cálculo de M, para los tres genes ensayados revelaba que la expresión de *mGAPDH* y *ARNr 18S* era menos estable ($M > 1.5$)

que la de *mHPRT* a lo largo de todas las condiciones, dietas y tejidos a estudio. Por lo tanto, el número de copias para este último gen dentro de cada muestra fue usado como factor de normalización de *mSPS1*, *mDLP1*, *mCOQ2*, *mCOQ3*, *mCOQ7* y *mCOQ8*.

8. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

La detección de los polipéptidos coq2p, coq3p, coq7p y coq8p en hígado, riñón, cerebro, corazón y tejido muscular se llevó a cabo mediante una electroforesis desnaturizante en SDS (SDS-PAGE), electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa seguido de inmunodetección y revelado con peroxidasa como se describe a continuación.

8.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PROTEICAS

La preparación de las muestras comenzó con la homogenización de tejidos mediante rotura física con ayuda de un motor eléctrico acoplado a un pistón cónico (Kontes) en 100 μ l de RIPA buffer (**anexo I núm. 2**) conteniendo 100 mM de PMSF, 100 mM de DTT y CLAP (2 μ l/ml) para preservar las proteínas. A continuación se tomó una alícuota para su determinación mediante la técnica Bradford.

En cada intervención dietética y tejido se seleccionaron cuatro muestras arbitrariamente y se constituyó un pool con concentraciones iguales de proteína. La cantidad de muestra final cargada en los geles de acrilamida se correspondía con 100 μ g de proteína total.

Las muestras diluidas se mezclaron con tampón de carga 5x (**anexo I núm. 3**), CLAP (20 μ g/ml) y 100 mM de PMSF, en proporción 18:1:1 respectivamente y se calentaron durante 15 minutos a 40 °C para desnaturizar las proteínas y evitar su posible agregación al tratarse de proteínas de membrana.

8.2. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron cargadas en geles de electroforesis discontinuos de un espesor de 1'5 mm. La parte superior del gel (**anexo I núm. 4**) contenía un 4% de poliacrilamida para la concentración de la muestra, mientras que el porcentaje de acrilamida de la parte inferior variaba entre 10 y 12% dependiendo del tamaño de la proteína que se quisiera detectar (**anexo I núm. 5**). Los geles se montaron en un sistema suministrado por Bio-Rad.

La separación de proteínas en la electroforesis se realizó a 200 V en un sistema Mini Protean III (BioRad) con un tampón de electrodos descrito en el **anexo I núm. 6**. La electroforesis continuó hasta la llegada del frente marcado por el azul bromofenol al final del gel.

8.3. ELECTROTRANSFERENCIA (Western-Blot)

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BiotraceTM NT, Pall Corporation) mediante el sistema Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad) aplicando un voltaje constante de 25 V durante 45 minutos. Para la transferencia, se colocaron el gel y la membrana entre dos papeles Whatman humedecidos con tampón de transferencia (**anexo I núm. 7**).

8.4. TINCIÓN CON ROJO PONCEAU

Para la visualización de la proteína total en cada una de las carreras, la membrana se tiñó con Rojo Ponceau's al 0,1 % (**anexo I núm. 8**). Transcurridos 5 minutos el exceso de colorante fue retirado lavando con solución de desteñido (**anexo I núm. 9**).

El perfil de bandas de proteínas generado en el conjunto de muestras se escaneó para poder cuantificar después de la inmunodetección la cantidad de proteína de interés. (**Ver análisis de imagen 10.7**).

Inmunotinción

La membrana se bloqueó durante 4 horas (2 x 2 h) a temperatura ambiente con tampón TTBSL (**anexo I núm. 10**). A continuación se incubó con el anticuerpo primario en TTBSL con una titulación variable (**Tabla 3**)

(dependiendo de la proteína que quisiéramos detectar) durante 16h a 4 °C. Ambos pasos se llevaron a cabo en agitación continua.

Anticuerpo	Animal donde se genera	Titulación	Casa comercial
Monoclonal anti-COQ2	Pollo	1:2000	Agrisera
Monoclonal anti-COQ3	Pollo	1:1000	Agrisera
Monoclonal anti-COQ7	Pollo	1:1000	Agrisera
Monoclonal anti-COQ8	Pollo	1:1000	Agrisera
Policlonal anti-pollo IgY ⁽¹⁾	Ratón	1:5000	Sigma

(1)Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa

Tabla 3. Descripción de los anticuerpos primarios, y anticuerpo secundario usados en inmunodetección

Después se lavó la membrana con TTBS (3 x 5 min) (**anexo I núm. 11**) y se inició la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgY de pollo desarrollado en ratón y conjugado con peroxidasa a la titulación de 1:5000 en TTBSL, durante 1h en agitación y a temperatura ambiente.

Finalmente se repitieron tres lavados de 5 minutos con TTBS y uno de quince minutos con TBS (**anexo I núm. 12**) para retirar los restos de anticuerpo secundario no adheridos.

8.5. REVELADO CON ECL

Una vez inmunoteñidas las membranas, se incubaron con ECL + plus (Amersham Pharmacia Biotech) durante 5 minutos. A continuación se eliminaron los restos de tampón y las membranas se introdujeron en un cassette (HypercassetteTM, Amersham LIFE SCIENCE) de revelado exponiéndose a una película fotográfica Kodak X-OMAT en oscuridad durante distintos tiempos para optimizar la señal de marcaje.

8.6. ANÁLISIS DE IMAGEN

Las membranas de nitrocelulosa teñidas con el colorante Rojo Ponceau's y las placas radiográficas tras el revelado por quimioluminiscencia,

fueron convertidas a formato digital con un densitómetro GS-800 (BioRad). La densidad de reacción obtenida en cada caso, fue analizada con el programa Quantity One 4.4.1 (BioRad).

El producto obtenido permitió visualizar y cuantificar la densidad de reacción obtenida para los distintos polipéptidos que fue referida a la densidad de reacción obtenida para el Ponceau's.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el paquete estadístico para ciencias sociales SPSS 15.0 (Chicago, Illinois) y STATISTICA 8.0 para Windows. Los gráficos se obtuvieron con el programa GraphPad Prism 5.0 y Microsoft Excel.

Para estudiar las diferencias de expresión génica (*mSPS1*, *mDLP1*, *mCOQ2*, *mCOQ3*, *mCOQ7* y *mCOQ8*) así como en el contenido de coenzima Q (CoQ₉ y CoQ₁₀) en cada órgano y tejido muscular se llevó a cabo un análisis de ANOVA de una vía. Las diferencias entre control y RC se estudiaron usando la prueba T para muestras independientes.

Además de la comparación entre control y RC, el estudio incluyó las comparaciones entre los ratones que habían consumido las 3 dietas con diferentes composiciones grasas (ANOVA de dos vías). Se analizaron los efectos del contenido graso de la dieta (aceite de ternera, soja o pescado) y el tratamiento (RC y AL) en cada dieta. El modelo contuvo términos para "calorías", "grasa" y la interacción "calorías*grasa". En caso de que el test ANOVA no fuera apropiado, se utilizó un test no-paramétrico como el test de Duncan o ANOVA no paramétrico.

En casos específicos se utilizó un análisis de correlación para estudiar la posible relación entre el ratio de coenzima Q₉/Q₁₀ y el ratio de los genes *mSPS1*/*mDLP1* que codifican las subunidades que componen la actividad coq1p (transprenil transferasa).

Resultados

1. CARACTERÍSTICAS BASALES DEL CONTENIDO DE COENZIMA Q Y EXPRESIÓN DE GENES COQ.

En este apartado se cuantificaron los niveles de las dos isoformas de CoQ (CoQ₉ y CoQ₁₀), el ARNm de los genes COQ: COQ1 (*mSPS1* y *mDLP1*), COQ2, COQ3, COQ7 Y COQ8, así como los niveles de sus respectivas proteínas codificadas en los tejidos mitóticos y postmitóticos en ratones alimentados con una dieta *ad libitum*. Nuestro primer objetivo fue conocer cómo se distribuye el CoQ en los distintos órganos del ratón en condiciones normales, es decir, sin ser sometidos a restricción calórica, y cuantificar las enzimas de la etapa final de síntesis de CoQ, tanto a nivel a nivel proteico como de transcrito, pues como era de esperar (ver más adelante), la distribución de CoQ muestra cambios significativos entre tejidos. Hemos considerado adecuado mostrar en primer lugar los cambios producidos en la dieta más saturada (enriquecida con aceite de ternera), porque en los sucesivos apartados se comparará con las dietas enriquecidas en aceites de soja y de pescado, que difieren de la primera en el incremento del grado de insaturación de sus ácidos grasos.

El criterio de nomenclatura establecido para señalar los cambios de contenido de CoQ y de los genes COQ entre tejidos se lee de izquierda a derecha:

Hígado “**A**”: cambios frente riñón, cerebro, músculo y corazón.

Riñón “**B**”: cambios frente cerebro, músculo y corazón.

Cerebro “**C**”: cambios frente músculo y corazón.

Músculo “**D**”: cambios frente a corazón.

1.1. DISTRIBUCIÓN TISULAR DEL COENZIMA Q

1.1.1. NIVELES DE CoQ₉ Y CoQ₁₀

En la **figura 11** se muestran los valores de CoQ₉ y CoQ₁₀ obtenidos a partir de los extractos lipídicos (fase de hexano) obtenidos de los distintos tejidos, mediante su posterior separación, detección y cuantificación por HPLC, según está descrito en el apartado de **Material y Métodos**.

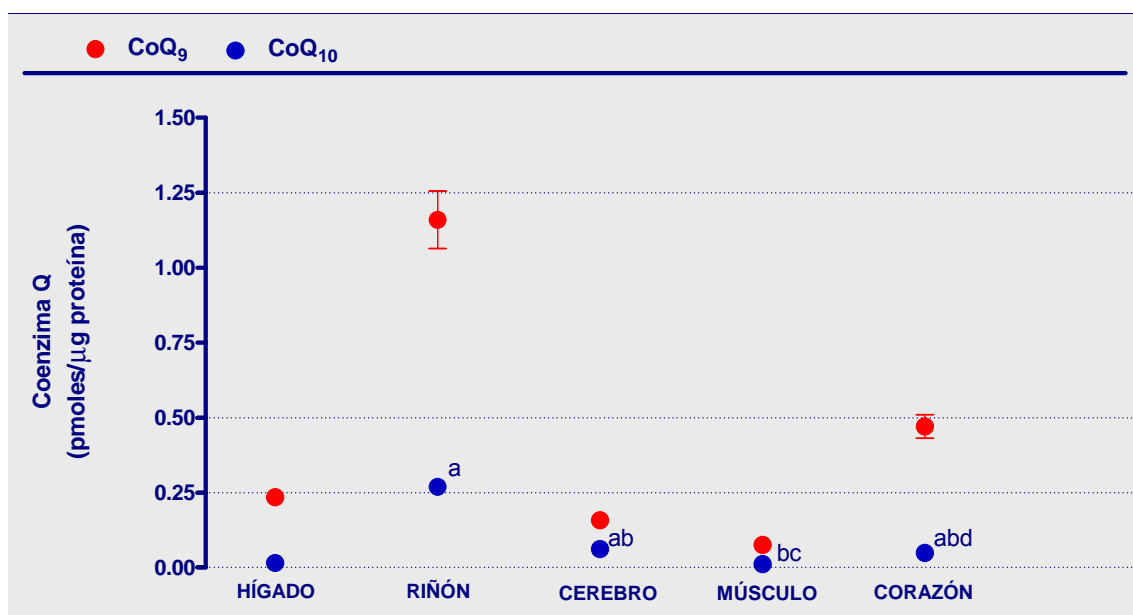


Figura 11. Contenido de CoQ₉ y CoQ₁₀ en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta de ternera en condiciones *ad libitum*. Los valores son dados como media \pm error estándar. ANOVA de un factor para CoQ₉ y CoQ₁₀. Diferencias significativas entre todos los valores de CoQ₉ (P<0,001) y diferencias significativas ^{abcd} (P<0,001) respecto a hígado (a), riñón (b), cerebro (c) y músculo (d).

Como podemos observar en la **figura 11**, la distribución de CoQ, tanto en lo que respecta a su cantidad total como en cuanto a la presencia relativa de las dos formas homólogas, es dependiente de tejido. Aunque el contenido de CoQ₉ es significativamente diferente entre todos los tejidos (P<0,001), destaca el riñón con unos niveles medios de 1,159 pmoles/mg proteína, muy superiores al resto de tejidos; siguiéndole el corazón con 0,470 pmoles/mg proteína. Respecto a la distribución de CoQ₁₀, vuelven a destacar los niveles encontrados en el riñón (0,269 pmoles/mg de proteína) frente a resto de tejidos, que contienen significativamente menos CoQ₁₀; superando en este caso incluso los niveles de CoQ₉ del hígado, cerebro y músculo. Por el contrario, la concentración de CoQ₉ y CoQ₁₀ en el músculo es la más pequeña en comparación al resto de tejidos (0,075 y 0,011 pmoles/mg de proteína respectivamente).

1.1.2. RELACIÓN CoQ₉/CoQ₁₀

Una vez cuantificado el contenido de CoQ, se calculó la relación CoQ₉/CoQ₁₀ con el objetivo de investigar si la proporción entre las dos formas del CoQ variaba en función del tejido (**figura 12**).

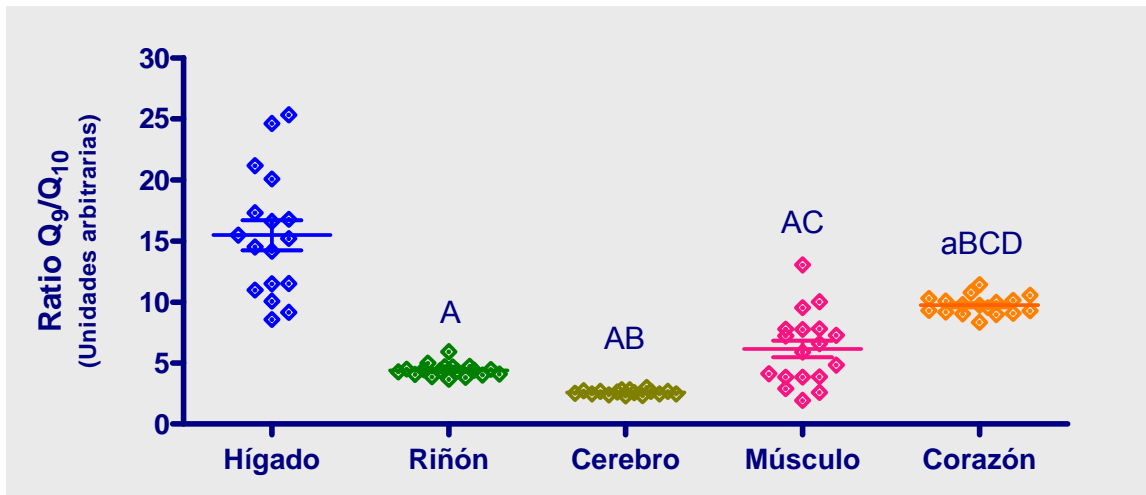


Figura 12. Relación CoQ₉/CoQ₁₀ en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta de ternera en condiciones *ad libitum*. Los valores son dados como media \pm error estándar. ANOVA de un factor. Diferencias significativas ^a(P<0,01) y ^{ABCD}(P<0,001) respecto a hígado (a), riñón (b), cerebro (c) y músculo (d).

Observamos que el hígado y el músculo, dos de los tejidos que mostraban los niveles más bajos de CoQ₉ y CoQ₁₀ (figura 11), son los que poseen los ratios mayores junto con el corazón. Sin embargo el riñón, órgano que contiene mayor concentración de los dos coenzimas, presenta la relación más pequeña, junto con el cerebro. Resulta también llamativo el hecho de que la relación CoQ₉/CoQ₁₀ se mantiene en un margen muy estrecho en riñón, cerebro y corazón para los distintos individuos analizados, mientras que la variabilidad interindividual es mucho mayor en el músculo esquelético y particularmente en el hígado.

1.2. EXPRESIÓN DE GENES RESPONSABLES DE LA SÍNTESIS DE CoQ Y VALIDACIÓN A NIVEL DE PROTEÍNA

Después de estudiar la distribución de CoQ caracterizamos el perfil de expresión de los genes responsables de la última etapa biosintética, para analizar de qué forma sus niveles de expresión podrían explicar las diferencias cuantitativas de CoQ en los distintos tejidos. También se cuantificaron mediante *western blot* los niveles de proteína de Coq2p, Coq3p, Coq7p y Coq8p en todos los tejidos. En los sucesivos capítulos de resultados, mostraremos las imágenes correspondientes a las proteínas coq2p y coq3p. Respecto a las proteínas coq7p y coq8p no consideramos adecuado interpretar los resultados obtenidos en proteína en base a los datos de expresión de

Resultados

mCOQ7 y *mCOQ8* debido a que el perfil de bandas no era constante entre tejidos, posiblemente por la inespecificidad del anticuerpo del que disponemos. En el caso de *coq8p*, se encontraron distintas bandas que si bien coincidían con isoformas (www.uniprot.org/uniprot/Q8NI60) de distinto peso molecular cuya función aún es desconocida, no se observaban más que en el hígado y riñón.

El criterio de nomenclatura utilizado en el estudio para diferenciar los genes de sus correspondientes proteínas es el siguiente:

- Genes: nombre en mayúscula y cursiva (i.e. *mCOQ2* en ratón o *COQ2* sin especificar especie)
- Proteínas: nombre en minúscula y la letra “p” (proteína) al final (i.e. *coq2p*)
- En el caso de la enzima transpenil transferasa de ratón usamos la misma denominación que en levaduras: *Coq1p*. A los genes que codifican el heterotetrámero en ratón las denominamos *mSPS1* y *mDLP1* (*mCOQ1*).

1.2.1. NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y DE PROTEÍNA

En las **figuras 13-18** se muestran los perfiles génicos de expresión de *mCOQ1* (*mSPS1* y *mDLP1*), *mCOQ2*, *mCOQ3*, *mCOQ7* y *mCOQ8*) en los cinco tejidos estudiados. En este apartado los resultados se representan normalizando los valores a una curva estándar con 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^8 copias de ADNc/ μ l sintetizado a partir del transcrito de cada gen, debido que la expresión del gen *mHPRT* en músculo y corazón mostraba un descenso en su expresión. La validación a nivel de proteína se realizó a partir de 100 μ g de proteína de homogenados de cada tejido, con al menos 4 individuos seleccionados aleatoriamente.

1.2.1.1. *mCOQ1*

La enzima *Coq1p* forma un heterotetrámero codificado por dos genes denominados *mSPS1* (**figura 13**) y *mDLP1* (**figura 14**) en roedores. Como se observa en ambas figuras, el riñón y el corazón presentan una mayor expresión

de los dos genes, seguido del cerebro, hígado y el tejido muscular en último lugar.

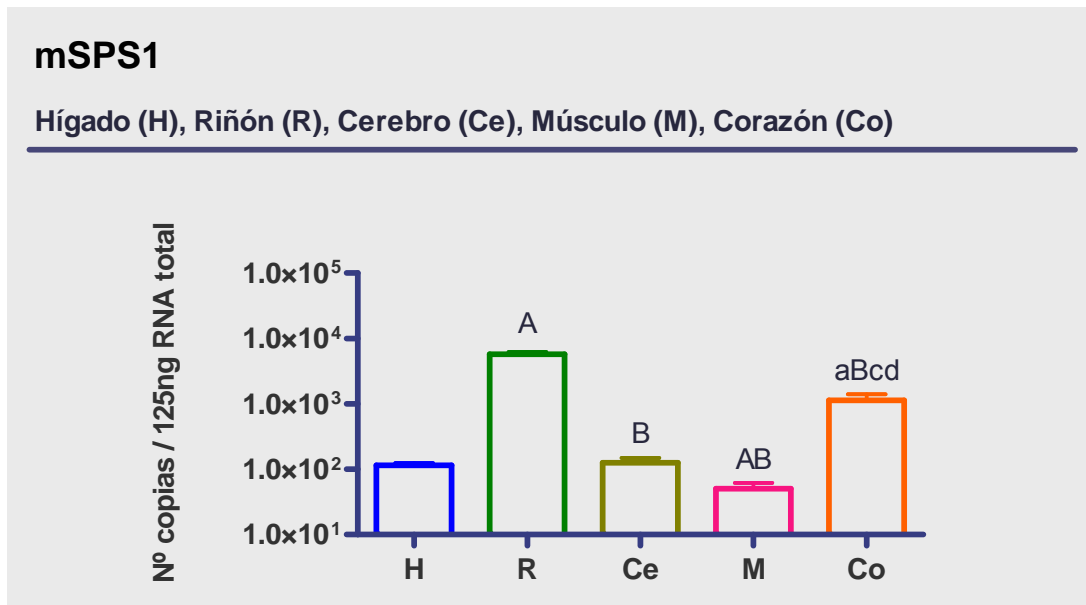


Figura 13. Número de copias totales de *mSPS1* a partir de 125 ng de ARNm total en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta *ad libitum*. Los valores son dados como media \pm error estándar de 18 roedores. ANOVA de un factor. Diferencias significativas ^{acd}($P < 0,05$) y ^{AB}($P \leq 0,001$) respecto a hígado (a), riñón (b), cerebro (c) y músculo (d).

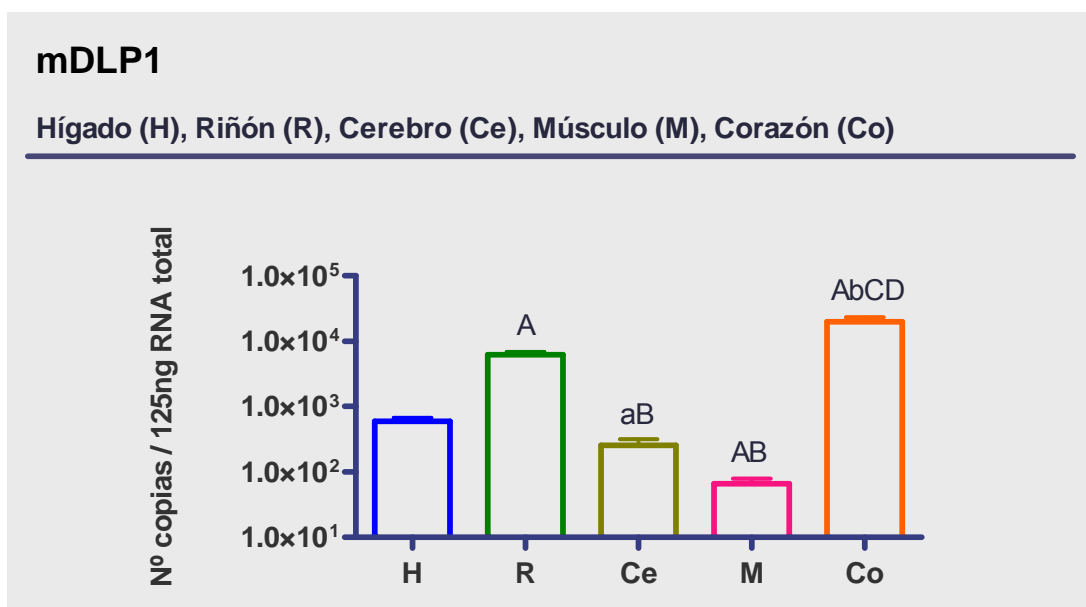


Figura 14. Número de copias totales de *mDLP1* a partir de 125 ng de RNAm en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta *ad libitum*. Los valores son dados como media \pm error estándar de 18 roedores. ANOVA de un factor. Diferencias significativas ^{ab}($P < 0,05$) y ^{ABCD}($P \leq 0,001$) respecto a hígado (a), riñón (b), cerebro (c) y músculo (d).

Resultados

A priori, parece existir una relación entre el contenido de CoQ y la expresión de *mCOQ1* pues órganos con mayor contenido en CoQ como el riñón y el corazón (**figura 11**) presentan la expresión más elevada de los dos homodímeros *mSPS1* Y *mDLP1*. A la inversa, el bajo contenido en CoQ₉ y CoQ₁₀ del tejido muscular coincide también con la mínima expresión de ambos genes *COQ1*.

1.2.1.2. *mCOQ2*

Los resultados obtenidos en la cuantificación de ARNm del gen *mCOQ2* y de su proteína Coq2p se muestran en la **figura 15**.

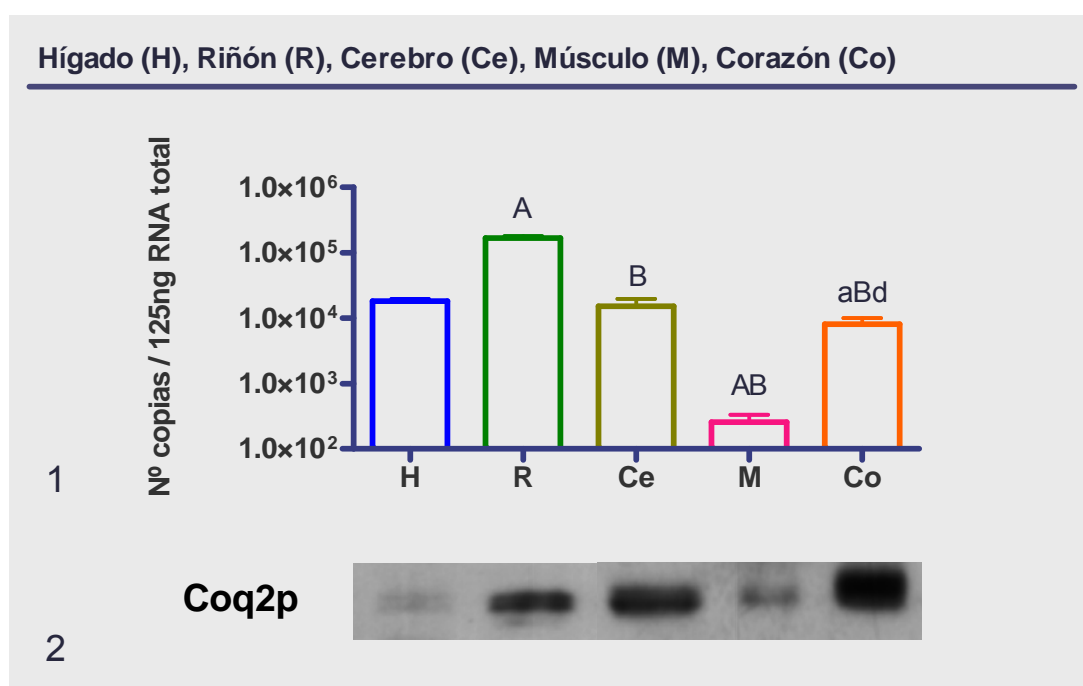


Figura 15. 1. Número de copias totales de *mCOQ2* a partir de 125 ng de RNAm en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta *ad libitum*. Los valores son dados como media \pm error estándar de 18 roedores. ANOVA de un factor. Diferencias significativas ^{ad}(P<0,01) y ^{ABD}(P≤0,001) respecto a hígado (a), riñón (b) y músculo (d). 2. Imagen correspondiente a la inmunodetección de Coq2p.

Al comparar los niveles de expresión del gen *mCOQ2* con la inmunodetección de la proteína Coq2p, observamos que en riñón, cerebro y corazón, una elevada expresión génica se correspondía con cantidades elevadas de la proteína. En tejido muscular también se produce una coincidencia entre los niveles de expresión génica y de proteína, que son en ambos casos significativamente inferiores al resto de tejidos. En cambio, en el

hígado, no se halló correlación, pues un incremento en la expresión del gen se manifestaba con un descenso de la cantidad de proteína detectada, sugiriendo que existe un nivel de regulación post-transcripcional o post-traducciona que es específico de tejido.

1.2.1.3. *mCOQ3*

Los resultados obtenidos en la cuantificación de ARNm del gen *mCOQ3* y de su proteína Coq3p se muestran en la **figura 16**.

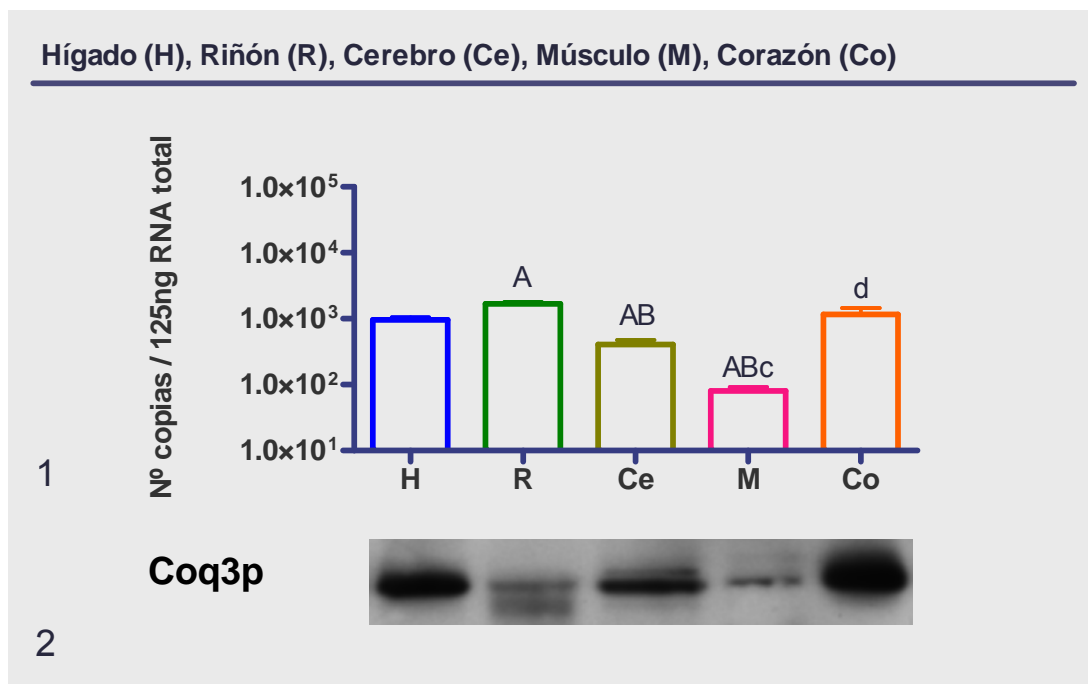


Figura 16. 1. Número de copias totales del gen *mCOQ3* partir de 125 ng de ARNm en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta *ad libitum*. Los valores son dados como media \pm error estándar. ANOVA de un factor. Diferencias significativas ^{cd}(P<0,01) y ^{AB}(P \leq 0,001) respecto a hígado (a), riñón (b), cerebro (c) y músculo (d). 2. Imagen correspondiente a la inmunodetección de Coq3p.

En el análisis de *mCOQ3*/Coq3p, los cambios de expresión se correlacionan con los cambios de proteína. En el caso del riñón, se aprecian varias bandas debajo de la banda específica, que nos hacen sospechar que existen modificaciones a nivel de ARNm como *splicing* alternativo, o alguna modificación de la proteína.

1.2.1.4. *mCOQ7*

Los resultados obtenidos en la cuantificación de ARNm del gen *mCOQ7* se muestran en la **figura 17**.

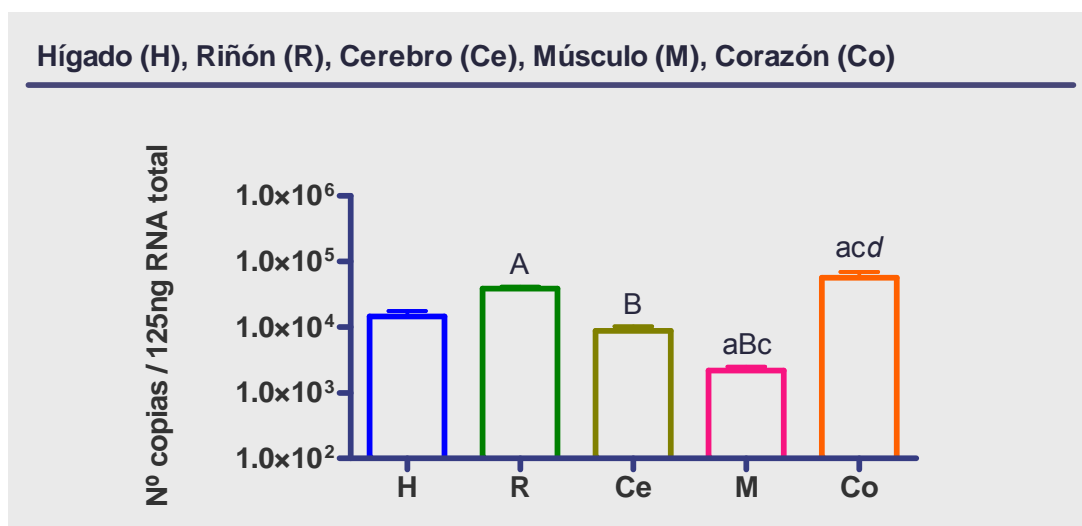


Figura 17. Número de copias totales del gen *mCOQ7* a partir de 125 ng de ARNm total en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta *ad libitum*. Los valores son dados como media \pm error estándar de 18 roedores. ANOVA de un factor. Diferencias significativas ^d(P<0,05), ^{cd}(P<0,01) y ^{AB}(P \leq 0,001) respecto a hígado (a), riñón (b), cerebro (c) y músculo (d).

La expresión de ARNm de *mCOQ7* no muestra cambios entre el hígado y el cerebro; y entre el riñón y corazón. El músculo es el tejido que menos expresión génica manifiesta mostrando cambios significativos con los demás órganos. De nuevo la expresión más abundante del gen coincide con los órganos con mayor contenido de CoQ. De manera inversa el tejido muscular, con menor contenido de ubiquinona se corresponde con la expresión más baja de *mCOQ7*.

1.2.1.5. *mCOQ8*

Los resultados obtenidos en la cuantificación de ARNm del gen *mCOQ8* se muestran en la **figura 18**.

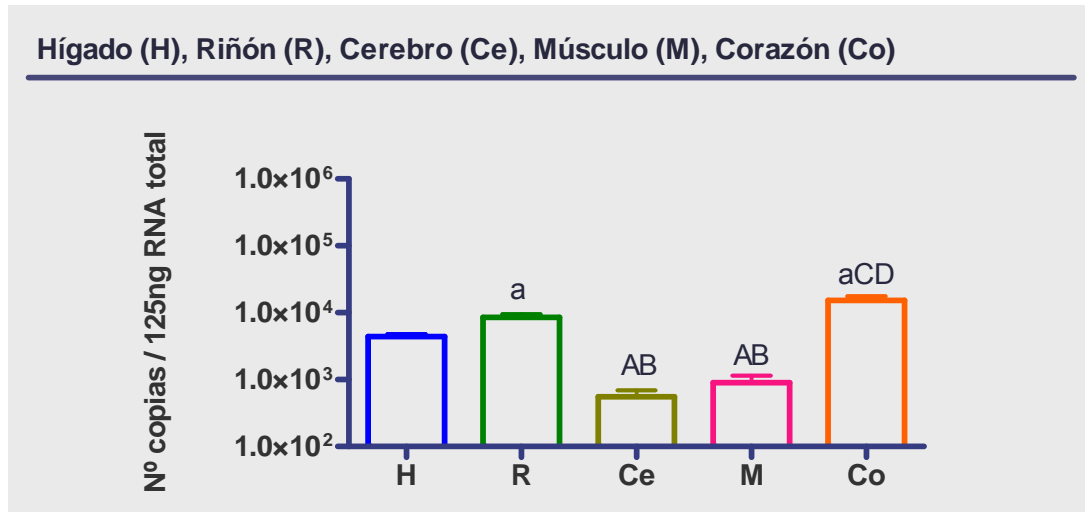


Figura 18. Número de copias totales del gen *mCOQ8* partir de 125 ng de ARNm total extraído del hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta *ad libitum*. Los valores son dados como media \pm error estándar. ANOVA de un factor. Diferencias significativas ^{cd}($P < 0,01$) y ^{AB}($P \leq 0,001$) respecto a hígado (a), riñón (b) y músculo (d).

Los resultados de expresión de *mCOQ8* no hallan diferencias entre el riñón y corazón, siendo los tejidos con los niveles de expresión más elevados. El cerebro y músculo muestran los niveles más bajos de transcrito, en comparación con el resto de tejidos. El hígado, mantiene unos niveles de expresión elevados pero aún significativamente inferiores a los hallados en riñón y corazón.

2. EFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA SOBRE EL SISTEMA DEL CoQ

A continuación se determinaron los efectos de la restricción calórica sobre la distribución tisular de CoQ₉ y CoQ₁₀; y sobre la expresión de los genes relacionados con la etapa final de su biosíntesis. Este estudio se llevó a cabo sobre ratones alimentados con una dieta enriquecida con grasa de ternera en restricción calórica (RC) del 40% durante un mes teniendo como control animales alimentados *ad libitum* (AL) con la misma dieta. La población de estudio estuvo compuesta por 36 animales: 18 ratones AL y 18 ratones RC.

El criterio de nomenclatura establecido para señalar los cambios de producidos por la RC en contenido de CoQ y de los genes COQ en cada tejido se indica con asteriscos (*) en las poblaciones de RC respecto de su correspondiente AL.

2.1. DISTRIBUCIÓN TISULAR DEL COENZIMA Q EN ANIMALES SOMETIDOS A RESTRICCIÓN CALÓRICA

2.1.1. NIVELES DE COENZIMA Q

En la **figura 19** se muestran los cambios provocados por la RC en el contenido de CoQ₉ y CoQ₁₀ extraídos en fase de hexano, y posteriormente separados y cuantificados mediante cromatografía de fase reversa (HPLC), según se describe en Material y Métodos. Los resultados ponen de manifiesto que la restricción calórica provocó una respuesta en los órganos con el contenido de CoQ más extremo (riñón, músculo y corazón). En cambio, los órganos con valores medios (hígado y cerebro) no mostraron ninguna modificación con la restricción de calorías.

En el riñón, la RC disminuyó significativamente los niveles de CoQ₁₀, aumentando los de CoQ₉. En el tejido muscular, se observó un descenso significativo en las dos formas de CoQ en ratones con dietas hipocalóricas.

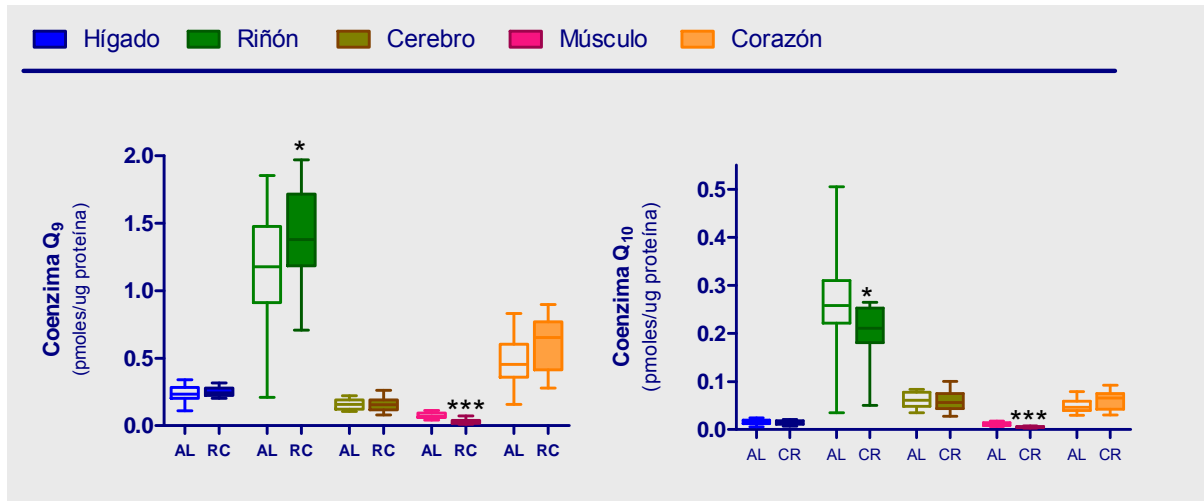


Figura 19. Cambios en el CoQ₉ y CoQ₁₀ en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones en restricción calórica (RC) del 40%, alimentados con una dieta conteniendo grasa de ternera. Los valores son dados como media \pm error estándar. Prueba T para muestras independientes. Diferencias significativas *($P < 0,05$) y ***($P < 0,001$) halladas en los tejidos de roedores en RC (N=18) respecto de su control *ad libitum* (AL, N=18).

2.1.2. RELACIÓN CoQ₉/CoQ₁₀

La relación de los valores obtenidos para las dos isoformas del CoQ se muestra en la figura 20.

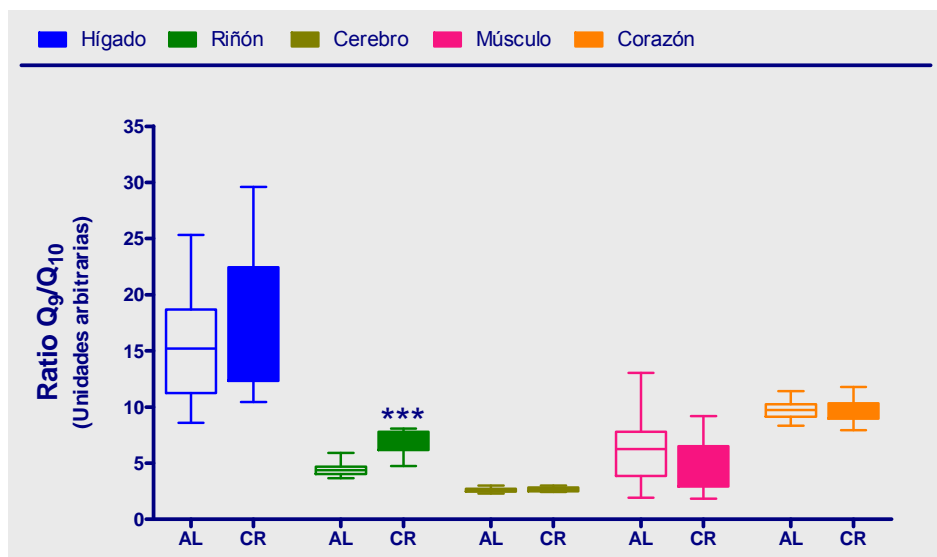


Figura 20. Cambios en la relación CoQ₉/CoQ₁₀ en el hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones alimentados con una dieta de ternera en restricción calórica (RC) del 40%. Los valores son dados como media \pm error estándar. Prueba T para muestras independientes. Diferencias significativas ***($P < 0,001$) halladas en los tejidos de roedores en RC (N=18) respecto de su control AL (N=18).

La restricción calórica incrementó de manera muy significativa la relación CoQ₉/CoQ₁₀ en el riñón, como consecuencia del descenso en los niveles de CoQ₁₀ y el aumento en CoQ₉ indicados anteriormente. El descenso en los niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀ encontrado en el músculo esquelético se produjo manteniendo constante la relación CoQ₉/CoQ₁₀.

2.2. CAMBIOS INDUCIDOS POR LA RESTRICCIÓN CALÓRICA EN LA EXPRESIÓN DE GENES Y PROTEÍNAS COQ

Una vez estudiado el efecto que tiene la RC sobre el contenido de CoQ y sobre la relación CoQ₉/CoQ₁₀, se realizó un estudio de expresión de los genes COQ en cada tejido de los ratones *ad libitum* y RC. Los resultados se analizaron usando la prueba T para muestras independientes. Nuestro objetivo fue obtener información sobre qué genes son susceptibles de modificación en presencia de una dieta hipocalórica, que pudieran explicar los cambios observados en esta condición en los niveles de CoQ.

En todos los órganos que mostraron cambios en el contenido de CoQ, en la relación CoQ₉/CoQ₁₀ y/o que mostraron cambios de expresión en alguno de los genes estudiados con la RC, se determinaron también mediante inmunodetección los niveles de proteínas Coq en las dos intervenciones dietéticas. Siguiendo el criterio de cuantificación en proteómica para el análisis de geles bidimensionales (Stessl *et al.* 2009) y ser más restrictivos con los cambios de proteína obtenidos en los *western blot* se prestó más atención a aquellos cambios con valores por encima del doble o por debajo de la mitad de la condición tomada como referencia.

2.2.1. *mCOQ1*

Los cambios de expresión para los dos genes que codifican la proteína Coq1p se muestran a continuación:

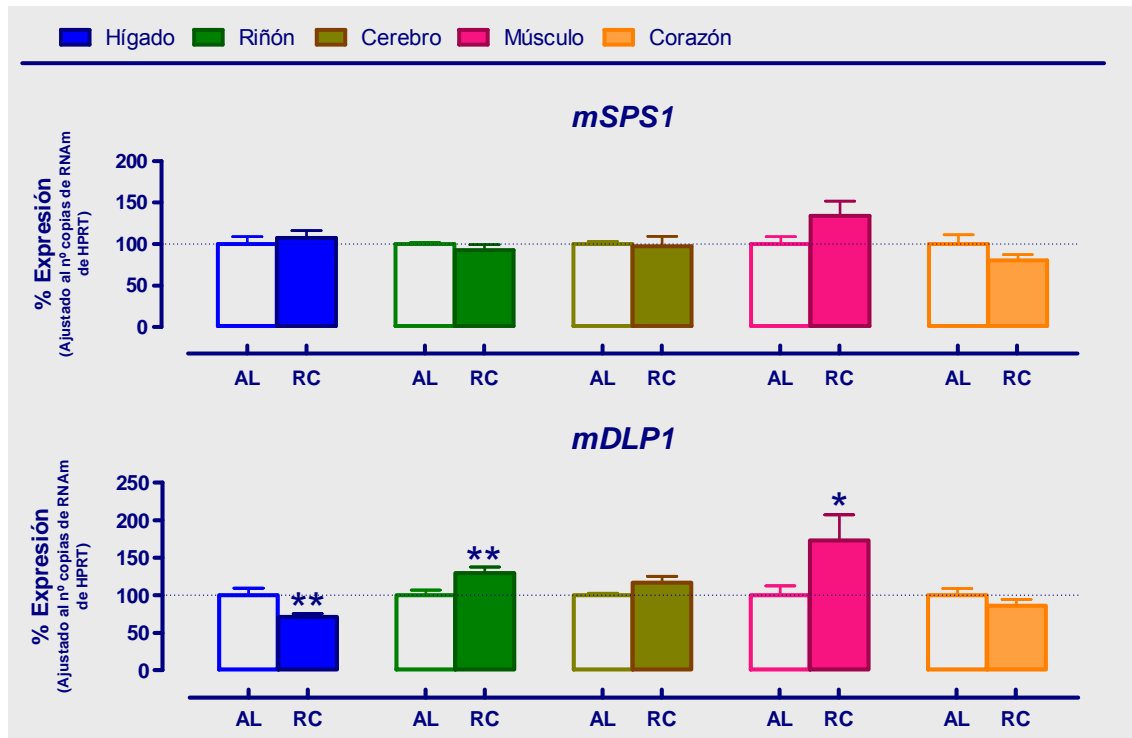


Figura 21. Cambios de expresión de los genes *COQ1* (*mSPS1* y *mDLP1*) en respuesta a la RC del 40%. Los valores son dados en % de expresión como media \pm error estándar calculados a partir del número de copias del gen en 125 ng de ARNm totales y ajustados al número de copias de ARNm del gen interno HPRT en cada individuo. Prueba T para muestras independientes. Diferencias significativas * ($P < 0,05$) y ** ($P < 0,01$) halladas en los tejidos de roedores en RC (N=18) respecto de su control *ad libitum* (AL, N=18).

No se hallaron diferencias al analizar la expresión del gen *mSPS1* en ninguno de los tejidos. Sin embargo la restricción calórica modificó la expresión de *mDLP1*, incrementando en el riñón y en el tejido muscular y disminuyendo la expresión en el hígado.

2.2.2. *mCOQ2*

Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 22**.

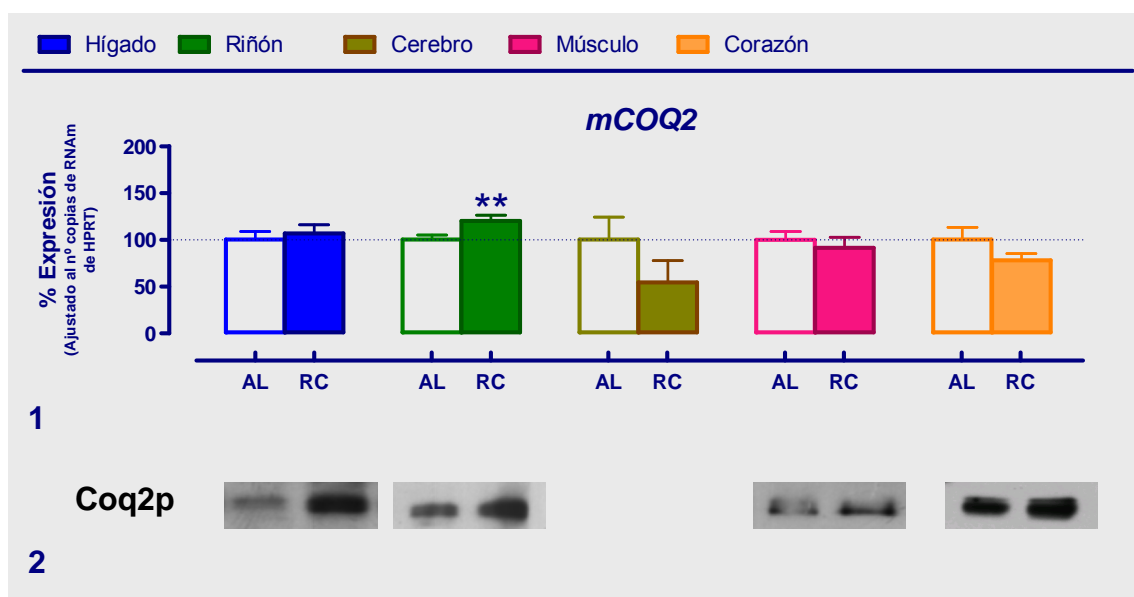


Figura 22. 1. Cambios de expresión del gen *COQ2* en respuesta a una RC del 40%. Los valores son dados en % de expresión como media \pm error estándar calculados a partir del número de copias del gen en 125 ng de ARNm totales y ajustados al número de copias de ARNm del gen interno HPRT en cada individuo. Prueba T para muestras independientes. Diferencias significativas ******($P<0,01$) halladas en los tejidos de roedores en RC (N=18) respecto de su control *ad libitum* (AL, N=18). 2. Imagen correspondiente a la inmunodetección de Coq2p.

Los resultados muestran un incremento significativo ($P<0,01$) en la expresión de *mCOQ2* en el riñón coincidiendo con una detección mayor en los niveles de proteína (3,41 veces) sobre su correspondiente AL. Sin embargo en el hígado no se hallaron cambios de expresión en restricción calórica pero sí se detectó un aumento en los niveles de proteína equivalentes a 4,11 veces superior a su AL (la representación de los niveles de proteína se muestra el apartado **3.2.3.1.**). Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos reguladores a nivel postranscripcional en respuesta a la RC, que son dependientes de tejido.

2.2.3. *mCOQ3*

El efecto de la RC para la síntesis de coq3p se muestra en la **figura 23**.

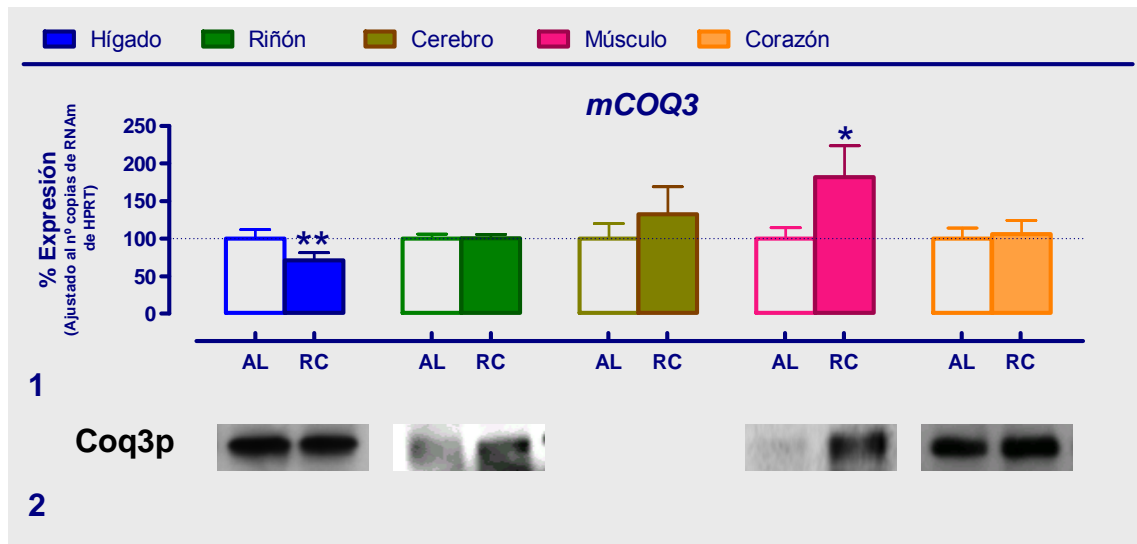


Figura 23. 1. Cambios de expresión del gen *COQ3* en respuesta a una RC del 40%. Los valores son dados en % de expresión como media \pm error estándar calculados a partir del número de copias del gen en 125 ng de ARNm totales y ajustados al número de copias de ARNm del gen interno *HPRT* en cada individuo. Prueba T para muestras independientes. Diferencias significativas $^*(P<0,05)$ halladas en los tejidos de roedores en RC (N=18) respecto de su control *ad libitum* (AL, N=18). **2.** Imagen correspondiente a la inmunodetección de *Coq3p*.

Los resultados de expresión mostraron cambios en el hígado y músculo, aunque únicamente el músculo manifestó un cambio a nivel de proteína. En el caso del hígado los resultados de expresión indican que bajo una dieta hipocalórica disminuye la expresión de *mCOQ3* sin embargo en los niveles de proteína no se hallaron cambios tras la dieta. El riñón no cambia su expresión ante la RC, sin embargo los niveles de proteína se elevan 3,1 veces más que lo cuantificado en condiciones AL (la representación de los niveles de proteína se muestra el apartado **3.2.3.2.**). En el músculo esquelético, tanto el ARNm de *mCOQ3* ($P<0,05$) como los niveles de *Coq3p* (3,5 veces frente a su AL) incrementaron significativamente con la RC. En el resto de órganos no se hallaron diferencias.

2.2.4. *mCOQ7*

Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 24**.

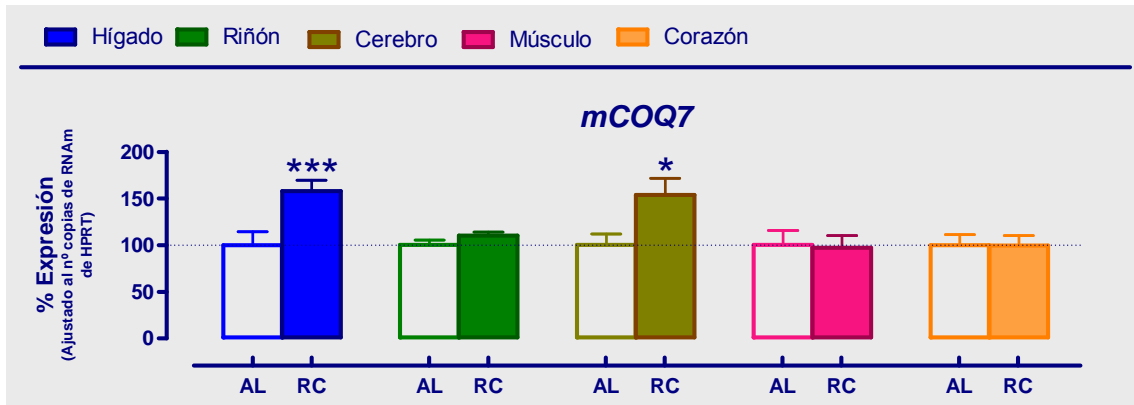


Figura 24. Cambios de expresión del gen *COQ7* en respuesta a una RC del 40%. Los valores son dados en % de expresión como media \pm error estándar calculados a partir del número de copias del gen en 125 ng de ARNm totales y ajustados al número de copias de ARNm del gen interno HPRT en cada individuo. Prueba T para muestras independientes. Diferencias significativas *($P < 0,05$) y ***($P < 0,001$) halladas en los tejidos de roedores en RC (N=18) respecto de su control *ad libitum* (AL, N=18).

La expresión de los transcritos de *mCOQ7* reveló cambios en el hígado y cerebro, aumentando significativamente ($P < 0,001$ y $P < 0,05$ respectivamente) con una dieta hipocalórica. En el resto de tejidos no se hallaron cambios de expresión por la RC.

2.2.5. *mCOQ8*

En la **figura 25** se muestra el efecto de la RC sobre la expresión de *mCOQ8*.

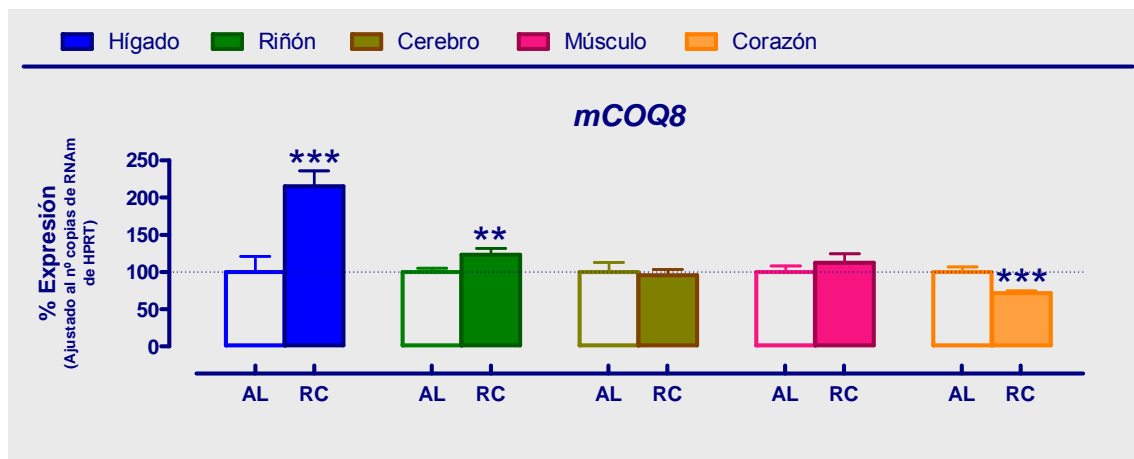


Figura 25. Cambios de expresión del gen *mCOQ8* en respuesta a una RC del 40%. Los valores son dados en % de expresión como media \pm error estándar calculados a partir del número de copias del gen en 125 ng de ARNm totales y ajustados al número de copias de ARNm del gen interno HPRT en cada individuo. Prueba T para muestras independientes. Diferencias significativas ****($P<0,01$) y *******($P<0,001$) halladas en los tejidos de roedores en RC (N=18) respecto de su control *ad libitum* (AL, N=18).**

La restricción calórica tuvo un efecto general muy marcado en la expresión de *mCOQ8* a corto plazo. EL hígado y riñón aumentaron su expresión con una significación de $P<0,001$ y $P<0,01$ respectivamente. Y en el corazón la expresión disminuía ($P<0,001$) respecto de la dieta *ad libitum*.

El músculo esquelético, es el tejido que más se afecta con la RC, disminuyendo su contenido de CoQ, sin embargo, no presentó cambios en la expresión de este gen. Este dato podría resultar interesante pues se ha propuesto que Coq8p podría tener una función kinasa sobre otros enzimas responsables de la biosíntesis de CoQ, resultando así en una regulación de su actividad.

3. EFECTO DEL COMPONENTE LIPÍDICO DE LA DIETA SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LA RC

En este apartado introducimos una variable categórica adicional: el componente lipídico de la dieta. Ampliamos el estudio de restricción calórica a dos poblaciones más de roedores (N total=108) cuyas intervenciones dietéticas difieren en el grado de insaturación de los ácidos grasos que las componen. La dieta de aceite de soja es rica en ácido linoleico (poliinsaturado n-6) y la dieta de aceite de pescado está enriquecida en ácidos grasos poliinsaturados n-3.

El análisis estadístico estudia el efecto que tiene la restricción calórica en tres intervenciones dietéticas establecidas sobre el contenido de coenzima Q (CoQ₉ y CoQ₁₀) en cada tejido, así como los cambios de expresión de los genes COQ. Queremos investigar cómo el tipo de grasa de la dieta puede intervenir en los cambios inducidos por la RC en los ratones y su relación a corto plazo con el envejecimiento saludable a través de la vía de síntesis del coenzima Q.

Este estudio recoge información sobre el efecto de la dieta en ratones jóvenes, alimentados durante un mes con las tres intervenciones dietéticas descritas en **Material y Métodos**. El Proyecto Principal "*Alterations in membrane composition and function with calorie restriction*" tiene como objetivo estudiar los cambios a lo largo del envejecimiento, de forma que este estudio se completa con roedores sometidos a las mismas dietas y restricción calórica durante 8 y 20 meses.

La nomenclatura de significación en las figuras mantiene el mismo criterio que en los apartados anteriores:

- Cambios debidos al aporte de calorías mediante asteriscos (*) en la categoría de RC respecto de su correspondiente AL.
- Cambios debidos al componente graso de la dieta mediante letras:
Aceite de ternera "A": cambios frente a aceite de soja y pescado.
Aceite de soja "B": cambios frente a aceite de pescado.

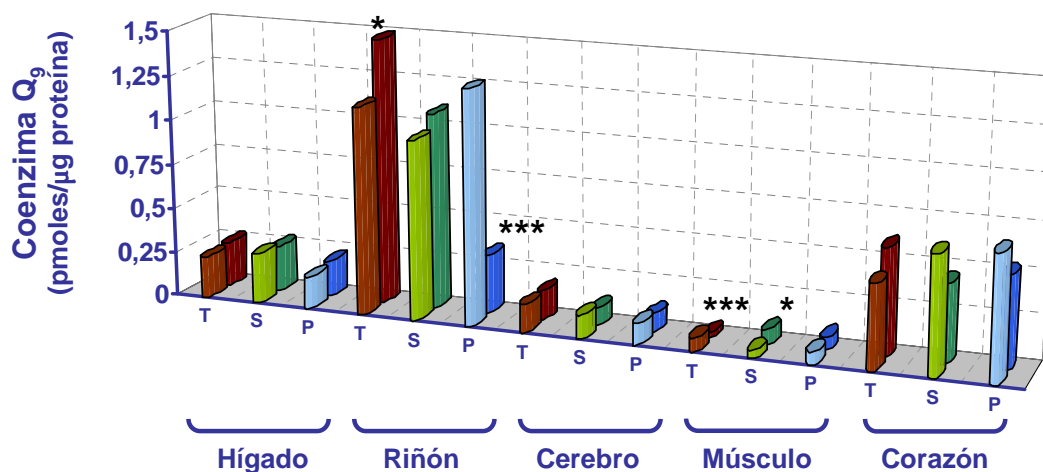
3.1. DISTRIBUCIÓN DE COENZIMA Q

En el apartado 1.1.1. Niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀ de resultados se demostró que la distribución de ubiquinona es específica de tejido (**figura 11**). A continuación analizamos en cada tejido el efecto que produce el componente graso de la dieta (ternera, soja y pescado) sobre los efectos de la RC en el contenido de coenzima Q.

3.1.1. COENZIMA Q₉

En la **figura 26** se muestran los cambios provocados por la RC en el contenido de CoQ₉ del hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de los roedores alimentados con los tres tipos de dietas. El CoQ total fue extraído en fase de hexano, y posteriormente separados y cuantificados mediante cromatografía de fase reversa (HPLC), según se describe en Material y Métodos.

● AL Ternera ● AL Soja ● AL Pescado
● RC Ternera ● RC Soja ● RC Pescado



<i>P</i> grasa	0,004	0,000	0,000	0,032	0,488
<i>P</i> calorías	0,795	0,015	0,128	0,511	0,065
<i>P</i> interacción	0,611	0,000	0,425	0,000	0,013

Figura 26. Contenido de CoQ₉ en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones alimentados con tres dietas de ternera (N=36), soja (N=36) y pescado (N=36) en RC al 40% y sus correspondientes dietas AL. Los valores son dados como media de cada categoría. ANOVA de dos vías para la dieta (grasa de ternera (T), aceite de soja (S) y aceite de pescado(P)), aporte calórico (AL y RC) y la interacción dieta*calorías. Diferencias significativas *(P<0,05), **(P<0,01) y ***(P<0,001) en RC respecto de su AL.

Hígado:

Con respecto al contenido de CoQ₉, no se encontraron cambios inducidos en hígado por la RC (P=0,795), ni tampoco de la interacción de ésta con el componente lipídico (P=0,611). Sin embargo sí existe un efecto provocado por el componente lipídico (P=0,004). En el análisis de Post Hoc (**anexo II**) este efecto se explica con un contenido mayor de CoQ₉ (0,539 pmoles/μg de proteína) en la dieta soja en comparación de la dieta de pescado (P=0,02 y 0,384 pmoles/μg de proteína) o ternera (0,485 pmoles/μg de proteína) en condiciones AL. Entre las poblaciones RC no se hallaron cambios significativos.

Riñón:

Se halló un efecto significativo del componente lipídico de la dieta y de la interacción de ésta con la restricción de calorías sobre los niveles de CoQ₉ en riñón, de tal forma que los roedores sometidos a una dieta hipocalórica aumentan su contenido de CoQ₉ cuando son alimentados con grasa de ternera (P=0,026) y disminuyen sus niveles cuando son alimentados con aceite de pescado (P=0,000), hecho que no ocurre con el consumo de una dieta enriquecida con aceite de soja. En el análisis Post Hoc que analiza los cambios caso a caso, observamos que al comparar las dietas AL existe una diferencia significativa (P=0,04) entre soja (1,00 pmoles/μg de proteína) y pescado (1,31 pmoles/μg de proteína). Las dietas de RC se ven afectadas por el componente lipídico que llevan añadido. La grasa de la dieta también afecta entre las dietas de RC. Es curioso porque aquí se produce una bajada significativa (P<0,01 y P<0,001) y progresiva del contenido de CoQ₉ en base a la saturación de la dieta. De dieta más saturada de ternera (1,47 pmoles/μg de proteína), a una intermedia de soja (1,09 pmoles/μg de proteína) y finalmente la dieta de pescado más poliinsaturada (0,32 pmoles/μg de proteína)

Cerebro:

La misma situación observada en hígado se da en cerebro. El contenido de CoQ₉ se modifica en función del tipo de aceite de la dieta. Pero el estudio Post Hoc muestra que los cambios de la dieta ocurren entre RC y no entre AL, siendo más abundante en la dieta de ternera (0,15 pmoles/μg de

proteína) frente a soja y pescado (0,10 y 0,10 pmoles/ μ g de proteína respectivamente).

Músculo esquelético:

Los cambios observados por la RC en músculo se ven fuertemente influidos por su interacción con el tipo de aceite que está presente en la dieta, de forma que en ternera el contenido de CoQ₉ disminuye (P=0,000) en respuesta a una restricción del aporte calórico y sin embargo en soja el contenido de CoQ₉ se ve incrementado en la dieta hipocalórica (P=0,012). Este efecto no ocurre en la dieta de aceite de pescado. El análisis Post Hoc, encuentra diferencias entre las dietas RC, de forma que la dieta saturada tiene un contenido de CoQ₉ más bajo (0,02 pmoles/ μ g de proteína) que en las dietas de soja y pescado (0,07 y 0,07 pmoles/ μ g de proteína respectivamente) significativo con un P=0,000 respecto a ambas dietas.

Corazón:

En el corazón no se obtienen cambios en el contenido de CoQ₉ en función del tipo de aceite y aporte calórico, sin embargo sí ocurre una interacción significativa entre dieta*calorías (P=0,013). Estos resultados se explican porque el estudio Post Hoc muestra una interacción entre la RC de soja y el AL de pescado con un P=0,04).

3.1.2. COENZIMA Q₁₀

En la **figura 27** se muestran los valores de CoQ₁₀ obtenidos a partir de los extractos lipídicos (fase de hexano) de los distintos tejidos en las tres intervenciones dietéticas en AL y RC, y su posterior separación, detección y cuantificación por HPLC, según está descrito en el apartado de Material y Métodos.

Hígado:

El contenido de CoQ₁₀ en el hígado disminuye significativamente (P=0,002) con en la dieta de RC de aceite de pescado. Los datos muestran una interacción significativa (P=0,027) entre el tipo de aceite y el aporte

Resultados

calórico de la dieta que con el estudio de Post Hoc se explica porque la dieta RC de pescado experimenta una bajada significativa ($P=0,000$) en el contenido de CoQ₁₀ respecto a todas las demás categorías.

● AL Ternera ● AL Soja ● AL Pescado
 ● RC Ternera ● RC Soja ● RC Pescado

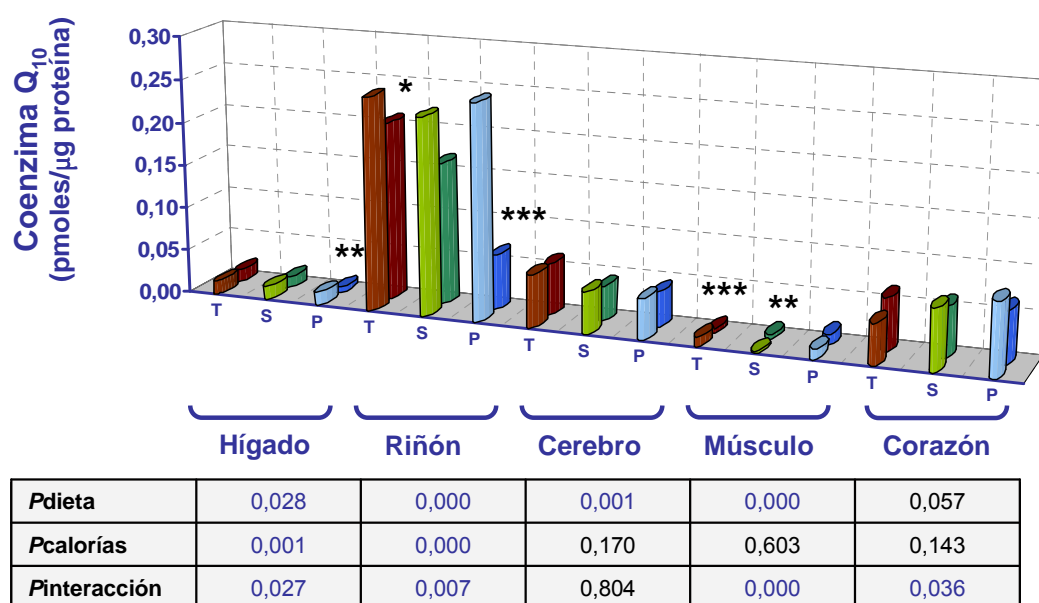


Figura 27. Contenido de CoQ₉ en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones alimentados con tres dietas de ternera (N=36), soja (N=36) y pescado (N=36) en RC al 40% y sus correspondientes dietas AL. Los valores son dados como media de cada categoría. ANOVA de dos vías para la dieta (aceite de ternera (T), aceite de soja (S) y aceite de pescado(P)), aporte calórico (AL y RC) y la interacción dieta*calorías. Diferencias significativas *($P<0,05$), **($P<0,01$) y ***($P<0,001$) en RC respecto de su AL.

Riñón:

El grado de saturación en RC tiene el mismo efecto que el observado para CoQ₉. Existe una bajada progresiva en el contenido de CoQ₁₀ desde una dieta más saturada de ternera a la más poliinsaturada de pescado, con un $P=0,009$ entre soja (0,16 pmoles/μg de proteína) y pescado (0,06 pmoles/μg de proteína) y con un $P=0,000$ entre ternera (0,20 pmoles/μg de proteína) y pescado. Entre las dietas *ad libitum* no se hallaron cambios significativos.

A su vez, el aporte calórico muestra diferencias significativas en la dieta de ternera y pescado disminuyendo en RC el contenido de CoQ₁₀ ($P=0,05$ y $P=0,000$ respectivamente). La interacción ($P=0,007$) que existe entre el

contenido graso de cada intervención y el aporte calórico se debe a que la RC de pescado presenta cambios significativos con el resto de dietas.

Cerebro:

El cerebro no presenta cambios significativos en el contenido de CoQ₁₀ en respuesta a la RC. Sin embargo, si analizamos la respuesta que tiene este órgano al contenido graso de la dieta sí encontramos diferencias (P=0,001) debido a que entre la dieta AL de ternera (0,061 pmoles/μg de proteína) y la dieta AL de pescado (0,047 pmoles/μg de proteína) existe un cambio significativo en el contenido de CoQ₁₀.

Músculo esquelético:

Se halló un efecto significativo del componente lipídico de la dieta (P=0,000) y de la interacción de ésta con la restricción de calorías (P=0,000) sobre los niveles de CoQ₁₀ en músculo, de tal forma que los roedores sometidos a una dieta hipocalórica disminuyen su contenido de CoQ₁₀ cuando son alimentados con aceite de ternera (P=0,000) y aumentan sus niveles cuando son alimentados con dietas conteniendo aceite de soja (P=0,004), hecho que no ocurre con el consumo de una dieta enriquecida con aceite de pescado. El análisis Post Hoc, muestra cambios significativos entre dietas AL: la dieta de soja (0,002 pmoles/μg de proteína) presenta unos niveles inferiores a los de las otras dos dietas (0,011 pmoles/μg de proteína en ambas).

En RC también se producen cambios debido al tipo de grasa, de forma que la dieta de pescado (0,012 pmoles/μg de proteína) tiene unos niveles significativamente superiores (P=0,000) a los de las dietas de ternera y soja (0,005 pmoles/μg de proteína en ambas).

Corazón:

En el corazón no se obtienen cambios en el contenido de CoQ₁₀ en función del tipo de grasa y aporte calórico; sin embargo sí ocurre una interacción significativa entre las dos variables (P=0,036). El análisis Post Hoc muestra que en AL existen cambios significativos entre la dieta de ternera (0,048 pmoles/μg de proteína) y la dieta de pescado (0,074 pmoles/μg de proteína) que aumenta con un valor P=0,01 respecto a la primera.

3.1.3. RATIO CoQ₉/CoQ₁₀

La relación CoQ₉/CoQ₁₀ en todas las intervenciones dietéticas se representa en la **figura 28**.

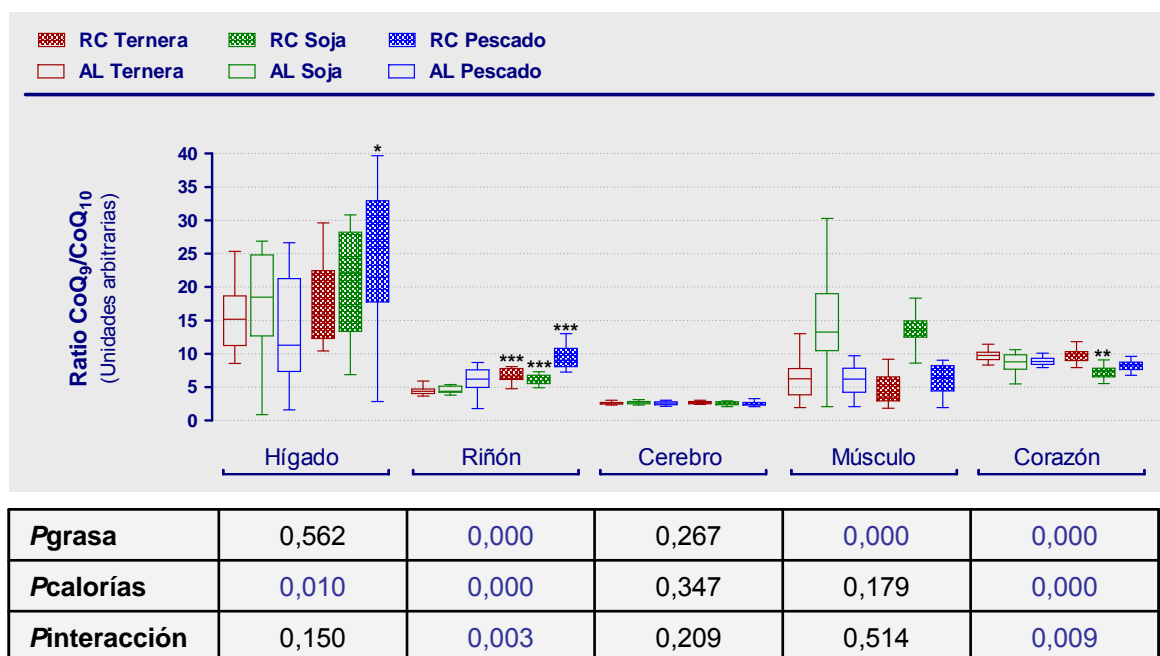


Figura 28. Relación CoQ₉/CoQ₁₀ en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones alimentados con tres dietas de ternera (N=36), soja (N=36) y pescado (N=36) en RC al 40% y sus correspondientes dietas AL. Los valores son dados como media ± error estándar de cada categoría. ANOVA de dos vías para la dieta (grasa de ternera (T), aceite de soja (S) y aceite de pescado (P)), aporte calórico (AL y RC) y la interacción dieta*calorías. Diferencias significativas *(P<0,05), **(P<0,01) y ***(P<0,001) en RC respecto de su AL.

Hígado:

El análisis de ANOVA muestra cambios en el aporte calórico de la dieta. En el estudio Post Hoc, se confirma que estos cambios se deben exclusivamente al incremento del ratio en la dieta de pescado con un valor P=0,01.

Riñón:

En el riñón, los cambios son muy marcados. Existe un fuerte efecto en los dos niveles: la grasa (P=0,000) y las calorías (P=0,000), resultando en una interacción que se hace también significativa (P=0,003). El análisis Post Hoc, nos informa que las diferencias entre AL y RC en las tres dietas tienen un valor

$P < 0,001$. Este cambio se traduce en un aumento del ratio en RC respecto de sus correspondientes AL. Si comparamos las tres condiciones AL, también existen cambios debidos al componente lipídico. Las dietas de ternera y soja tienen un ratio inferior a la dieta de pescado ($P=0,000$ y $P=0,001$ respectivamente). La comparación entre las tres dietas de RC muestra el mismo efecto.

Cerebro:

El cerebro no muestra ningún cambio a la RC y aceite de la dieta. La “no” respuesta tan uniforme en cerebro, sugiere la existencia de una fuerte regulación en este tejido a estímulos que, en contraste, sí pueden provocar una fuerte alteración en otros. Estos resultados serán debatidos en la discusión. Además, como se aprecia en la **figura 28**, en este tejido existe una homogeneidad muy alta entre muestras que también refuerzan la estabilidad de los niveles de CoQ en cerebro.

Músculo esquelético:

En el músculo, los cambios son significativos en respuesta al componente lipídico ($P=0,000$). No se hallaron cambios producidos por la RC, ni tampoco existe interacción entre las dos variables. La comparación entre las dietas AL y entre las dietas RC muestran un incremento del ratio de la dieta de soja con valores $P < 0,001$ respecto de las dietas de ternera y pescado.

Corazón:

El estudio de ANOVA, indica que existen cambios significativos debidos a la grasa y aporte calórico y la interacción entre ambos. En el análisis Post Hoc, observamos que la RC afecta solamente al ratio de la dieta de soja, disminuyendo en RC con un $P=0,000$. Respecto al componente lipídico, se encontraron cambios al comparar las tres dietas AL. La dieta de soja presenta un ratio significativamente más pequeño que el obtenido en la dieta de ternera ($P=0,01$). No se hallaron cambios respecto de la dieta de pescado.

Si comparamos los ratios de RC, los cambios son muy marcados entre las tres dietas: el ratio con aceite de ternera es significativamente superior al de

soja y pescado ($P=0,000$ en ambas); y además entre soja y pescado también existe un cambio ($P=0,004$), siendo más pequeño el ratio en la dieta de soja.

3.2. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE BIOSÍNTESIS DE COQ Y NIVELES DE PROTEÍNA

En el apartado anterior se puede comprobar que los roedores son un modelo de mamíferos que responde de manera muy compleja pero significativa a las distintas intervenciones dietéticas (tanto al componente lipídico como al aporte calórico) modificando el contenido de coenzima Q.

En este apartado, tratamos de representar de la manera más explícita posible la respuesta que tiene la ruta de biosíntesis de coenzima Q ante las mismas intervenciones, que nos permita obtener información sobre su regulación.

Debido a que se representan conjuntamente los cambios de expresión y proteína en múltiples situaciones (por tejido, aporte calórico y componente lipídico) hemos mostrado las imágenes del revelado con ECL, pero como se describe en Materiales y Métodos, la cuantificación de las imágenes se realiza a partir de la intensidad de bandas obtenida con la tinción de Rojo Ponceau.

3.2.1. COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE EXPRESIÓN EN LAS DIETAS *AD LIBITUM* Y PERFIL DE PROTEÍNA

Antes de mostrar el efecto de RC sobre la expresión de genes COQ y su interacción con el componente lipídico de la dieta en AL y RC, realizamos un estudio comparativo (ANOVA de una vía) del número de copias de ADNc total de cada gen de estudio obtenidas a partir de 125 ng de ARN total en cada uno de las muestras de cada tejido en las tres dietas en condiciones control (*Ad libitum*) y normalizado con el número de copias totales de ADNc obtenido en el gen mHPRT en cada muestra. Diferencias en la expresión de genes y de sus proteínas codificadas en las tres dietas AL pueden ampliar el conocimiento sobre cómo el componente lipídico, independientemente del aporte calórico, influye en la síntesis de CoQ y su implicación metabólica en condiciones basales.

3.2.1.1. *mCOQ1*

A continuación se muestran en las **figuras 29.1 y 29.2**, la cuantificación absoluta de las copias de ADNc obtenidas a partir de los transcritos de *mSPS1* y *mDLP1*, cuyos productos proteicos conforman en mamíferos el heterotetrámero Coq1p.

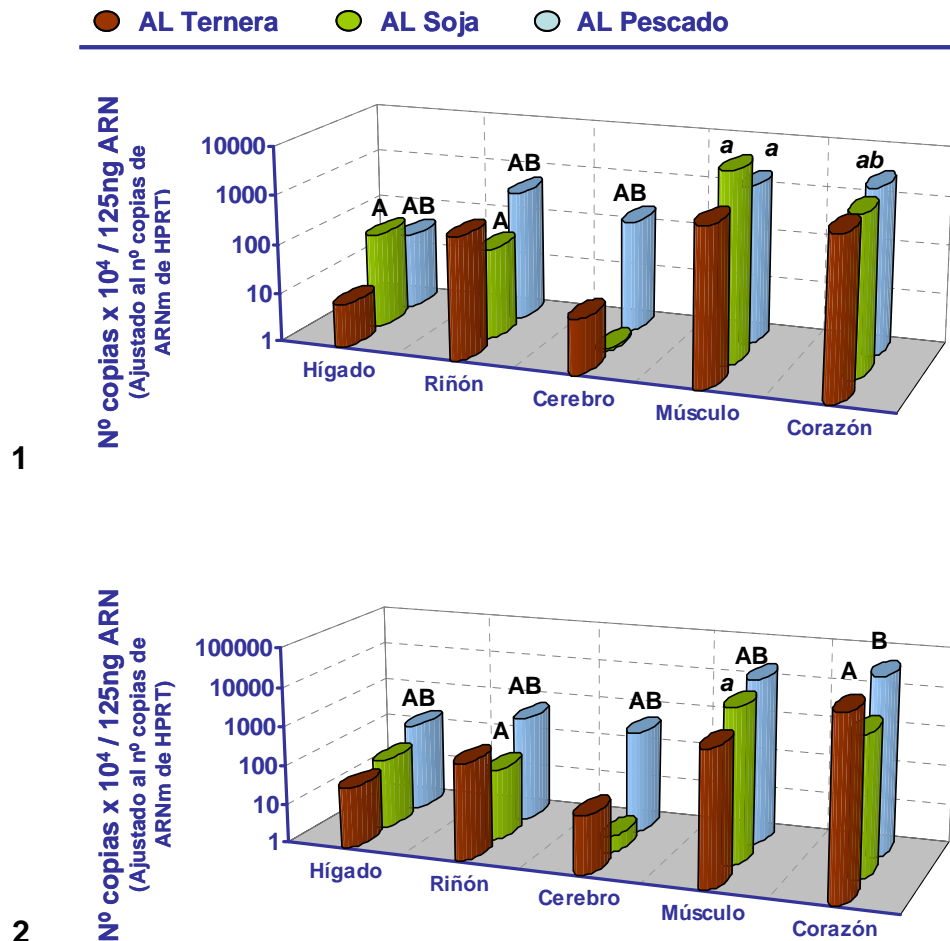


Figura 29 (1 y 2). Número de copias totales de *mCOQ1* (*mSPS1* y *mDLP1*) a partir de 125 ng de ARNm total en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta *ad libitum* de grasa de ternera, aceite de soja y de pescado. Los valores son dados como media de 18 roedores. ANOVA de un factor. Diferencias significativas ^{ab}($P \leq 0,05$), ^{ab}($P \leq 0,01$) y ^{AB}($P \leq 0,001$) respecto a la dieta de ternera (a) y de soja (b).

El estudio de expresión de *mSPS1* en hígado y músculo detectan unos niveles mayores de transcrito en la dieta de soja, haciéndose significativo frente a la dieta de ternera en ambos tejidos (**A**, $P=0,000$ y **a**, $P=0,010$ respectivamente) y a la dieta de pescado en hígado (**B**, $P=0,000$). El corazón, muestra una diferencia en la expresión de la dieta de pescado, aumentando los

Resultados

niveles de *mSPS1* respecto de las dietas de ternera y soja (**a**, $P=0,003$ y **b**, $P=0,004$ respectivamente).

Si comparamos los resultados de *mSPS1* y *mDLP1* en cada tejido, observamos que los cambios de riñón y cerebro son los mismos. La dieta de pescado presenta los niveles de *mSPS1* y *mDLP1* más elevados en comparación con la dieta de ternera y soja. Además en el riñón, se encuentran diferencias entre la dieta de soja, con unos niveles de *mSPS1* inferiores a los de la dieta de ternera.

El grado de insaturación de los aceites de la dieta parece tener un efecto en los niveles de ARNm de *mDLP1* en hígado y músculo. De forma que la expresión va aumentando de una dieta más saturada (grasa de ternera) a una dieta más poliinsaturada (aceite de pescado). El nivel de significación de la dieta de pescado frente a soja y ternera es de $P=0,000$ (**AB**) en hígado y músculo, y de ternera frente a soja es de $P=0,003$ (**a**) en músculo.

En el corazón, el aceite de soja disminuye los niveles de ARNm de *mDLP1* respecto a la expresión observada en ternera y pescado (**A** y **B**, $P=0,000$). En líneas generales, la dieta de aceite de pescado, es la que presenta los niveles más altos de expresión de *mDLP1* en condiciones basales, a lo largo de los cinco tejidos estudiados.

3.2.1.2. *mCOQ2*

Los cambios de expresión de *mCOQ2* se muestran en la **figura 30**, así como los niveles de proteína en las distintas dietas.

Los resultados de expresión obtenidos muestran diferencias entre dietas y como ya se demostró en el capítulo 1 de resultados con la dieta de ternera, también existen diferencias entre tejidos. El perfil de expresión no se correlaciona con los niveles de proteína en todas las situaciones; lo que sí se observa es que en las tres dietas, los niveles de expresión de *mCOQ2* en riñón y corazón (órganos con mayor contenido en CoQ) son los más elevados, presentando asimismo los niveles más elevados de proteína en relación al resto de tejidos. El hígado, presenta los niveles de proteína más bajos, lo cual está de acuerdo con unos niveles de CoQ inferiores respecto al riñón y corazón. Esa bajada consistente detectada en las tres dietas podría explicar, el descenso significativo en el contenido de CoQ₉ y CoQ₁₀ en comparación con el

contenido tan elevado en riñón y corazón. Por otro lado, el grado de insaturación de las grasas de la dieta, de nuevo tiene un efecto en el hígado como ocurría en *mDLP1* (figura 29.2) efecto que también se observa en la expresión de *mCOQ2* de riñón.

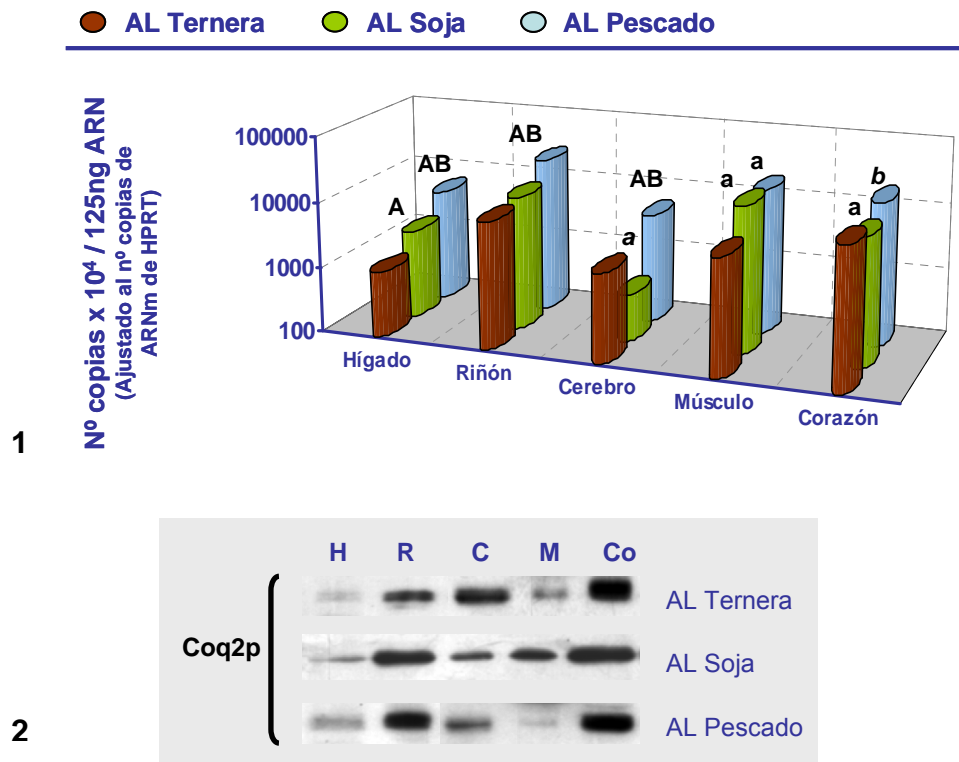


Figura 30. 1. Número de copias totales de *mCOQ2* a partir de 125 ng de ARNm total en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta *ad libitum* de aceite de ternera, soja y pescado. Los valores son dados como media de 18 roedores. ANOVA de un factor en cada tejido. Diferencias significativas ^{ab}(P≤0,05), ^{ab}(P≤0,01) y ^{AB}(P≤0,001) respecto a la dieta de ternera (a) y de soja (b). 2. Imagen correspondiente a la inmunodetección de Coq2p.

En cerebro, los niveles de expresión en los animales alimentados con la dieta de soja se ven disminuidos en comparación con las otras dos dietas (a, P=0,004 y B, P=0,000,). La expresión en este tejido es la más baja en comparación con el resto, hecho que no se manifiesta en los niveles de proteína de las tres dietas, que se muestran superiores a los detectados por ejemplo en músculo (uno de los tejidos de mayor expresión génica). En particular, en el tejido muscular los resultados de expresión muestran diferencias en la dieta de ternera disminuyendo significativamente en comparación con las dietas de soja (P=0,023) y pescado (P=0,036).

3.2.1.3. *mCOQ3*

Los cambios de expresión de *COQ3* se muestran en la **figura 31**, así como los niveles de proteína en las distintas dietas.

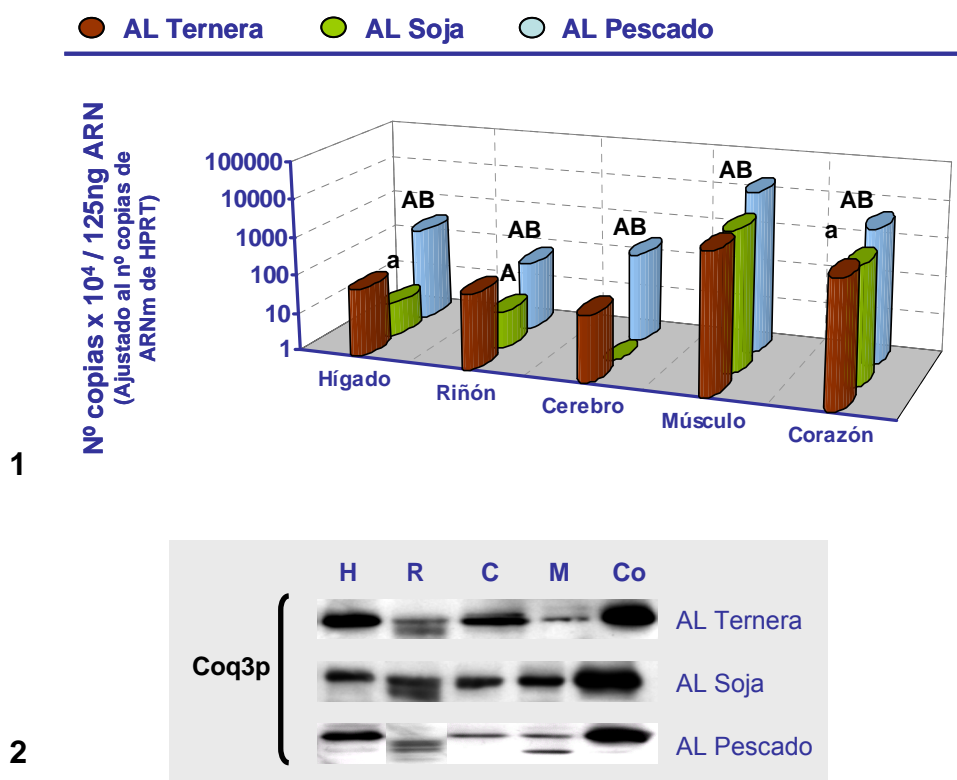


Figura 31. 1. Número de copias totales de *mCOQ3* a partir de 125 ng de ARNm total en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta *ad libitum* de aceite de ternera, soja y pescado. Los valores son dados como media de 18 roedores. ANOVA de un factor en cada tejido. Diferencias significativas ^{ab}(P≤0,05), ^{ab}(P≤0,01) y ^{AB}(P≤0,001) respecto a la dieta de ternera (a) y de soja (b). 2. Imagen correspondiente a la inmunodetección de *coq3p*.

En el estudio de *mCOQ3*, la dieta compuesta con aceite de pescado responde aumentando significativamente la expresión en hígado, cerebro, músculo y corazón respecto de la dieta de soja (**A**, P<0,001). Si comparamos con la dieta de soja, el efecto es el mismo, es decir, es mayor la expresión de *mCOQ3* en la dieta de pescado pero además este cambio también se hace significativo en riñón (**B**, P<0,001).

La dieta de soja es la que presenta la expresión más baja a nivel de tejido, mostrando (además de con la dieta de pescado) diferencias significativas con la dieta de ternera al menos en tres tejidos: hígado (a, P=0,020), riñón (**A**, P=0,000) y corazón (a, P=0,036). El grado de insaturación

del aceite de la dieta, no parece tener efecto progresivo o regresivo sobre los niveles de expresión en ninguno de los tejidos.

A nivel de proteína, se observa que igual que en Coq2p, el corazón es el que presenta unos niveles más elevados del polipéptido, independientemente del tipo de aceite utilizado en la dieta. Le siguen los niveles detectados en hígado. En el riñón de animales alimentados con cualquiera de las tres dietas AL se observan bandas por debajo de la banda específica, que como ya se mostró en el capítulo 1 para la dieta de ternera, podrían indicar la existencia de modificaciones en el ARNm o en la proteína que es específica de tejido. En el músculo procedente de animales alimentados con la dieta de pescado, sólo se detecta una banda a parte de la específica. Estos resultados serán interpretados en la discusión.

3.2.1.4. *mCOQ7*

Los cambios de expresión de *mCOQ7* se muestran en la **figura 32**, así como los niveles de proteína en las distintas dietas.

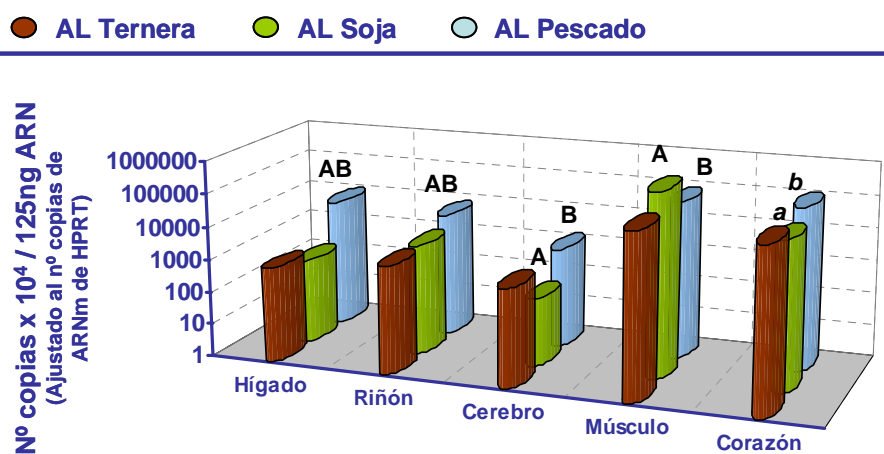


Figura 32. Número de copias totales de *mCOQ7* a partir de 125 ng de ARNm total en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta *ad libitum* de aceite de ternera, soja y pescado. Los valores son dados como media de 18 roedores. ANOVA de un factor en cada tejido. Diferencias significativas ^{ab}(P≤0,05), ^{ab}(P≤0,01) y ^{AB}(P≤0,001) respecto a la dieta de ternera (a) y de soja (b).

La grasa de la dieta afecta a la expresión de *mCOQ7* en todos los tejidos. En el hígado y riñón, el aceite de pescado hace que los niveles de ARNm de *mCOQ7* superen a los de la dieta de ternera y pescado (AB, P<0,001). En cerebro y corazón, los niveles de transcrito en la dieta de soja son inferiores a los de las dietas de ternera (A y B, P<0,001) y pescado (a y b,

Resultados

P<0,01). En el músculo, contrariamente el aceite de soja muestra mayores niveles de ARNm de *mCOQ7* respecto de las otras dos dietas (**A** y **B**, P<0,001).

3.2.1.5. *mCOQ8*

Los cambios de expresión de *COQ8* se muestran en la **figura 33**, así como los niveles de proteína en las distintas dietas.

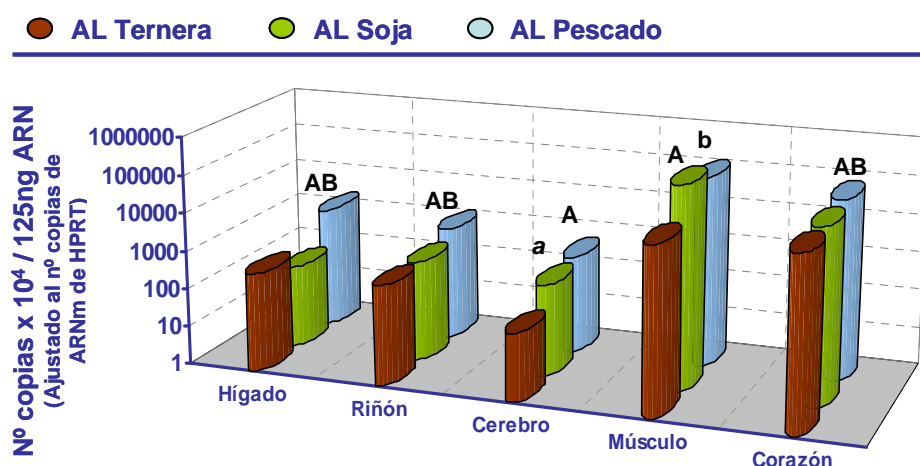


Figura 33. Número de copias totales de *mCOQ8* a partir de 125 ng de ARNm total en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón de ratones (N=18) alimentados con la dieta *ad libitum* de aceite de ternera, soja y pescado. Los valores son dados como media de 18 roedores. ANOVA de un factor en cada tejido. Diferencias significativas ^{ab}(P≤0,05), ^{ab}(P≤0,01) y ^{AB}(P≤0,001) respecto a la dieta de ternera (a) y de soja (b).

Los resultados obtenidos en el estudio de expresión de *mCOQ8* en respuesta al componente graso muestran cambios entre la dieta de pescado frente a las dieta de ternera, aumentando los niveles de transcrito en todos los tejidos (**A**, P<0,001) salvo en el músculo (P=0,095). Si comparamos la dieta de pescado frente a la de soja, los resultados se repiten en el hígado, riñón, y corazón (**B**, P<0,001), sin hallarse cambios en el cerebro (P=0,109) y un efecto contrario en el músculo (**b**, P=0,018). Este efecto en el músculo podría relacionarse con que los niveles de CoQ (CoQ₉ y CoQ₁₀) detectados en la dieta de soja sean los más bajos encontrados en condiciones AL (**figura 26** y **27**) respecto a los registrados en ternera y pescado, ya que a nivel de proteína se observa una banda muy marcada respecto a las otras dos dietas. Estos resultados serán analizados en la discusión.

3.2.2. EFECTO DE LA RC Y COMPONENTE LIPÍDICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES COQ.

A continuación se muestran en las **figuras 34-39** los cambios de expresión de *mCOQ1* (*mSPS1* y *mDLP1*), *mCOQ2*, *mCOQ3*, *mCOQ7* y *mCOQ8* en los distintos tejidos bajo una restricción de calorías, y en las tablas se recogen los cambios significativos obtenidos mediante ANOVA de dos vías para la dieta, calorías y su interacción grasa*calorías. Todas las comparaciones se realizan frente a su correspondiente *Ad libitum*. Se muestra solamente la expresión de RC con su error estándar para cada grasa (referido a la correspondiente dieta AL con la misma grasa) en valores porcentuales considerando 100% a cada AL correspondiente. En todas las figuras se representa una barra de AL (100%) a la izquierda para simplificar la imagen.

3.2.2.1. *mCOQ1*

3.2.2.1.1. *mSPS1*

La **figura 34** muestra los resultados para *mSPS1*.

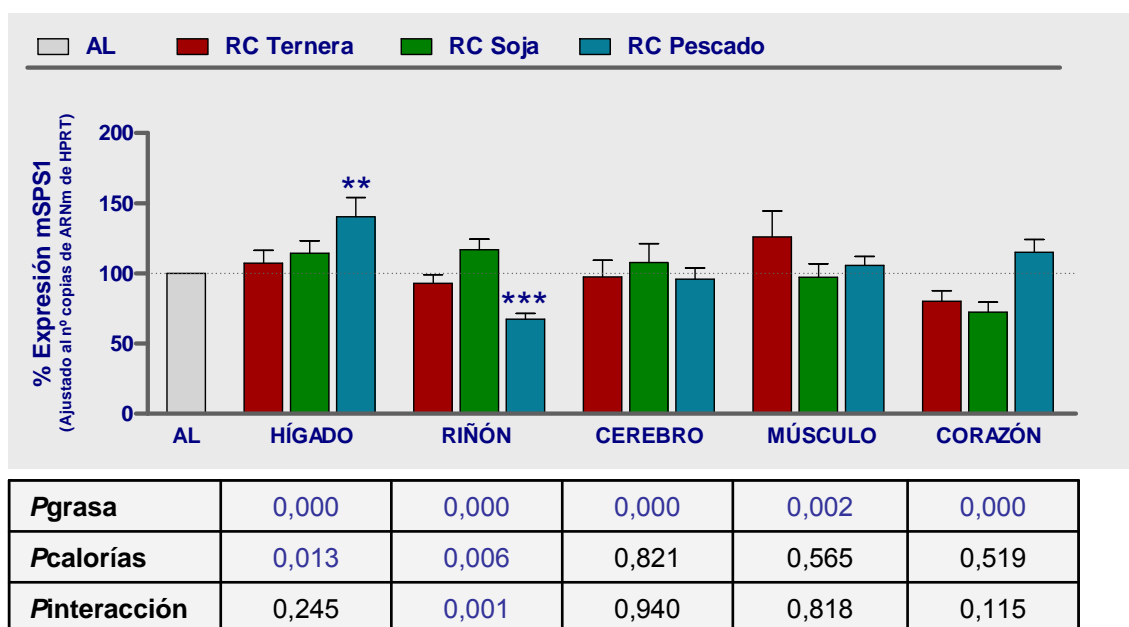


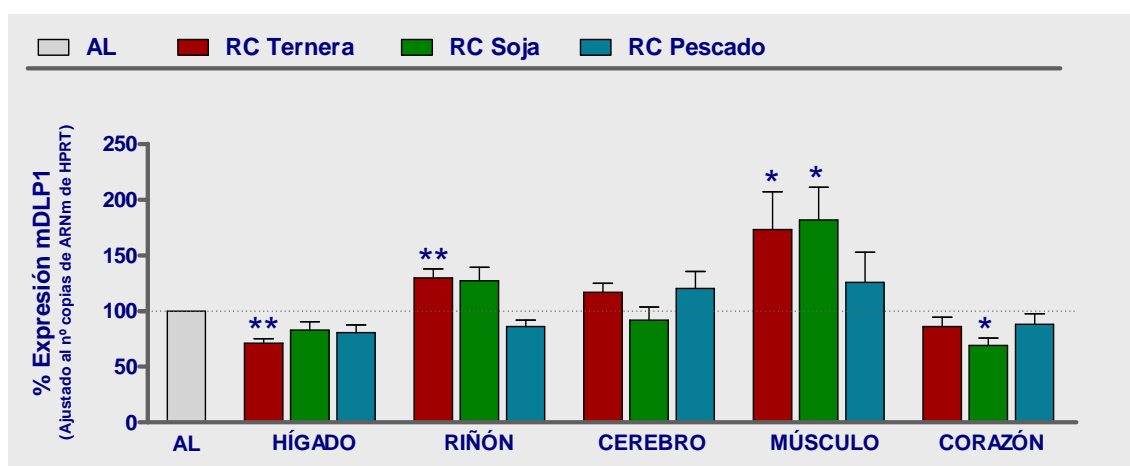
Figura 34. Cambios de expresión del gen *mSPS1* en respuesta a la RC del 40% en dietas conteniendo grasa de ternera (N=36), aceite de soja (N=36) o aceite de pescado (N=36). Los valores son dados en % de expresión como media \pm error estándar calculados a partir del número de copias del gen en 125 ng de ARNm total y ajustados al número de copias de ARNm del gen interno HPRT en cada individuo. ANOVA de dos vías para la grasa, calorías y la interacción grasa*calorías. Diferencias significativas *(P<0,05), ***(P<0,001) halladas en los tejidos de roedores en RC (N=18) respecto de su control *ad libitum* (AL, N=18).

Resultados

La expresión del gen *mSPS1* muestra modificaciones en respuesta al componente lipídico en cada uno de los tejidos estudiados. En el caso del hígado, la RC tiene un efecto en la dieta de pescado, incrementando los niveles de expresión respecto de su AL ($P=0,02$) y que no son debidas a la interacción ($P=245$) con el efecto del tipo de aceite. En el riñón, la RC disminuye los niveles de expresión respecto de su AL en la dieta de pescado, sin embargo existe interacción con el consumo de aceite de pescado ($P=0,001$). El cerebro, músculo y corazón no modifican su expresión ante una dieta hipocalórica.

3.2.2.1.2. *mDLP1*

El estudio de expresión de *mDLP1* se representa en la **figura 35**.



Pgrasa	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Pcalorías	0,020	0,459	0,483	0,225	0,123
Pinteracción	0,373	0,001	0,582	0,906	0,749

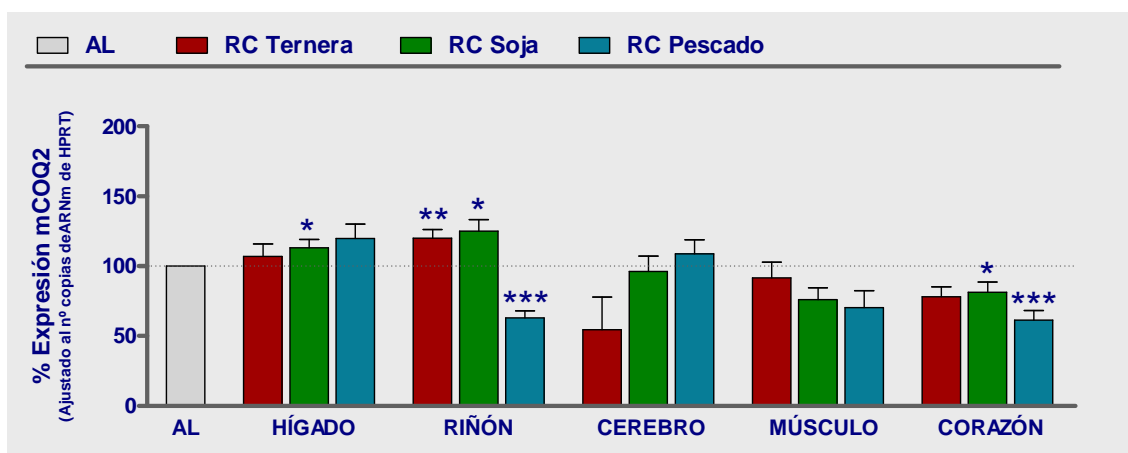
Figura 35. Cambios de expresión del gen *mDLP1* en respuesta a la RC del 40% en dietas conteniendo grasa de ternera (N=36), aceite de soja (N=36) o aceite de pescado (N=36). Los valores son dados en % de expresión como media \pm error estándar calculados a partir del número de copias del gen en 125 ng de ARNm totales y ajustados al número de copias de ARNm del gen interno HPRT en cada individuo. ANOVA de dos vías para la grasa, calorías y la interacción grasa*calorías. Diferencias significativas *($P<0,05$), **($P<0,01$) Y ***($P<0,001$) halladas en los tejidos de roedores en RC (N=18) respecto de su control *ad libitum* (AL, N=18).

El componente graso de la dieta altera la expresión de *mDLP1* en todos los tejidos. En la dieta de ternera, la RC disminuye los niveles de ARNm de *mDLP1* en hígado sin mostrar interacción con el contenido graso. Sí se observa una interacción dieta*calorías en el riñón ($P=0,001$), que se explica con un aumento de expresión en RC ($P=0,02$). En el músculo, la RC aumenta los

niveles de expresión de *mDLP1* en la dieta de ternera y soja y los disminuye en el corazón de los ratones alimentados con la dieta de soja.

3.2.2.2. *mCOQ2*

En la **figura 36** se observan los resultados para *mCOQ2*.



<i>P</i> grasa	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>P</i> calorías	0,031	0,469	0,962	0,439	0,191
<i>P</i> interacción	0,194	0,000	0,700	0,714	0,051

Figura 36. Cambios de expresión en el gen *mCOQ2* en respuesta a la RC del 40% en dietas conteniendo grasa de ternera (N=36), aceite de soja (N=36) o aceite de pescado (N=36). Los valores son dados en % de expresión como media \pm error estándar calculados a partir del número de copias del gen en 125 ng de ARNm totales y ajustados al número de copias de ARNm del gen interno HPRT en cada individuo. ANOVA de dos vías para la grasa, calorías y la interacción grasa*calorías. Diferencias significativas *($P < 0,05$), **($P < 0,01$) Y ***($P < 0,001$) halladas en los tejidos de roedores en RC (N=18) respecto de su control *ad libitum* (AL, N=18).

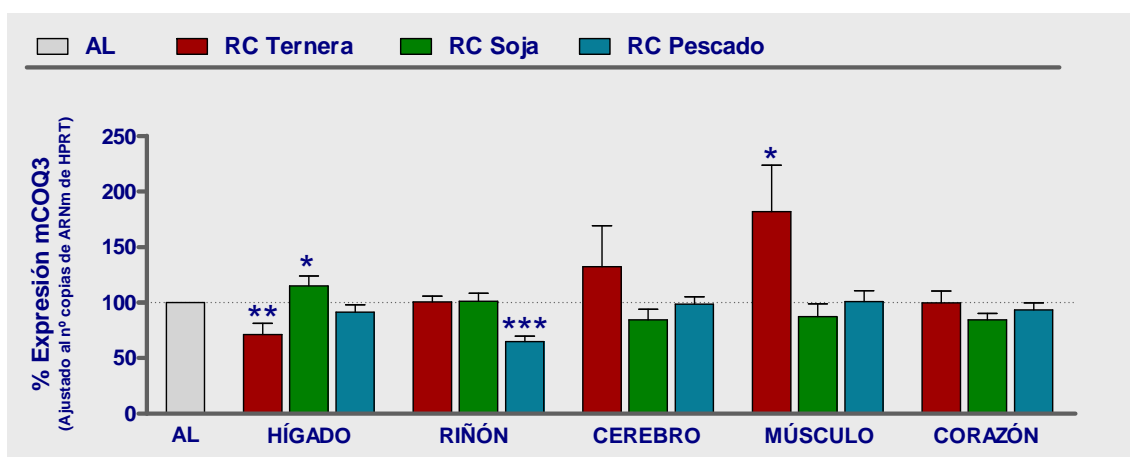
El estudio del componente graso de la dieta produce cambios significativos en cada uno de los tejidos ($P=0,000$), y su interacción en riñón explica los cambios producidos por la RC, aumentando los niveles de transcrito en la dieta de ternera y soja y disminuyendo en la de pescado. El estudio en el hígado explica que el incremento de expresión en la dieta de soja debido a la RC no interacciona con el efecto del aceite de la dieta ($P=0,194$), hecho que se viene repitiendo en el hígado en *mSPS1* y *mDLP1*. En el corazón la RC disminuye los transcritos de *mCOQ2* de las dietas de soja y pescado ($P=0,002$ y $P=0,001$ respectivamente).

Resultados

El cerebro y músculo no responden a la RC en cuanto a la expresión de este gen, y no existe interacción con el efecto observado por el tipo de aceite de la dieta.

3.2.2.3. *mCOQ3*

Los cambios de expresión de *mCOQ3* se representan en la **figura 37**.



<i>P</i> grasa	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>P</i> calorías	0,221	0,066	0,766	0,924	0,421
<i>P</i> interacción	0,583	0,020	0,860	0,022	0,725

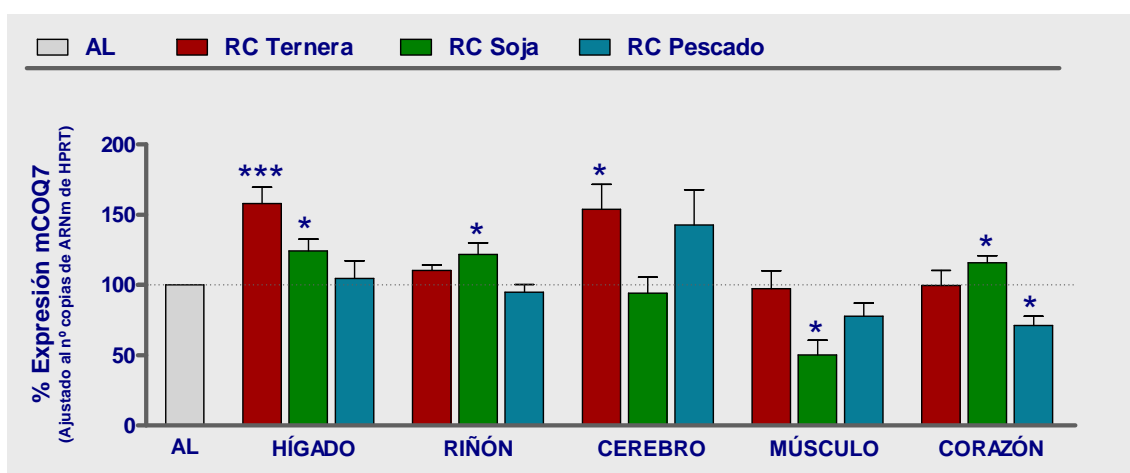
Figura 37. Cambios de expresión en el gen *mCOQ3* en respuesta a la RC del 40% en dietas conteniendo grasa de ternera (N=36), aceite de soja (N=36) o aceite de pescado (N=36). Los valores son dados en % de expresión como media \pm error estándar calculados a partir del número de copias del gen en 125 ng de ARNm totales y ajustados al número de copias de ARNm del gen interno HPRT en cada individuo. ANOVA de dos vías para la grasa, calorías y la interacción grasa*calorías. Diferencias significativas *($P < 0,05$), **($P < 0,01$) Y ***($P < 0,001$) halladas en los tejidos de roedores en RC (N=18) respecto de su control *ad libitum* (AL, N=18).

El aceite de la dieta, al igual que en todos los genes anteriormente estudiados, produce una modificación en los niveles de ARNm de *mCOQ3* en todos los tejidos estudiados ($P=0,000$). En hígado, la expresión de *mCOQ3* disminuye en RC de ternera y aumenta en la dieta de soja.

La interacción del componente de la dieta con el aporte de calorías explica el efecto de la RC en el riñón de la dieta de pescado ($P=0,001$) y en músculo de la dieta de ternera ($P=0,05$). El cerebro y corazón no presentan cambios inducidos por la RC, ni interacción con el componente graso ($P=0,860$ y $P=0,725$ respectivamente).

3.2.2.4. *mCOQ7*

El estudio de expresión de *mCOQ7* se representa en la **figura 38**.



<i>P</i> grasa	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>P</i> calorías	0,492	0,243	0,054	0,648	0,325
<i>P</i> interacción	0,938	0,767	0,395	0,888	0,152

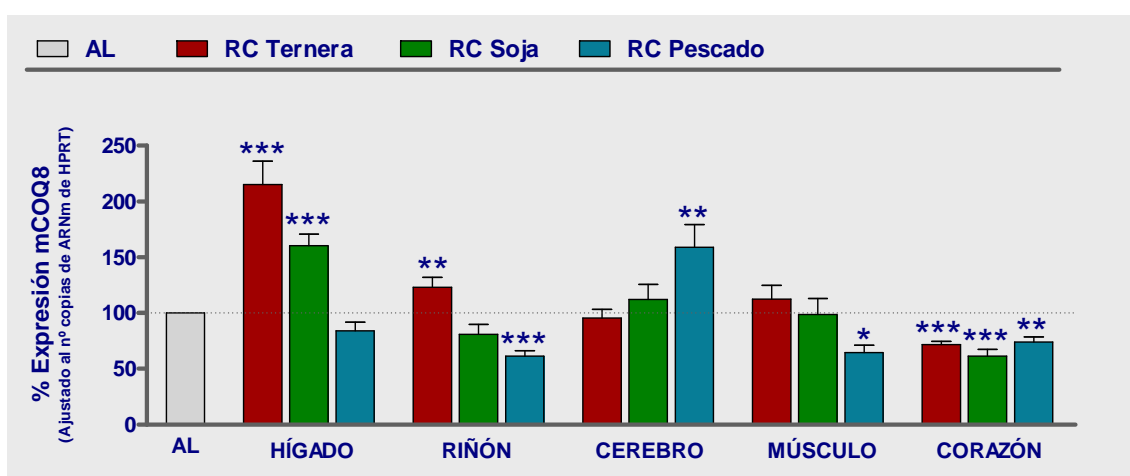
Figura 38. Cambios de expresión en el gen *mCOQ7* en respuesta a la RC del 40% en dietas conteniendo grasa de ternera (N=36), aceite de soja (N=36) o aceite de pescado (N=36). Los valores son dados en % de expresión como media \pm error estándar calculados a partir del número de copias del gen en 125 ng de ARNm totales y ajustados al número de copias de ARNm del gen interno HPRT en cada individuo. ANOVA de dos vías para la grasa, calorías y la interacción grasa*calorías. Diferencias significativas *($P < 0,05$), **($P < 0,01$) Y ***($P < 0,001$) halladas en los tejidos de roedores en RC (N=18) respecto de su control *ad libitum* (AL, N=18).

Los niveles de expresión de ARNm de *mCOQ7* cambian en respuesta al tipo de dieta utilizada, pero este efecto no influye en la respuesta de cada tejido a la RC. La dieta de ternera en RC aumenta la expresión en hígado ($P < 0,001$) y cerebro ($P < 0,05$). En la dieta de soja, la RC aumenta la expresión en hígado, riñón y corazón ($P < 0,05$) pero disminuye los transcritos de *mCOQ7* en músculo. Por otro lado, la RC en la dieta de pescado solo tiene un efecto, disminuyendo la expresión en el corazón.

3.2.2.5. *mCOQ8*

La **figura 39** muestra los resultados para *mCOQ8*.

La expresión de *mCOQ8* varía en función del tipo de aceite utilizado en cada dieta ($P=0,000$), al igual que ocurre con todos los genes que se han estudiado antes. En el hígado de los roedores que se alimentan con dietas de restricción calórica de ternera y soja, se observa un incremento muy significativo ($P=0,001$ y $P=0,000$ respectivamente) de sus correspondientes AL. Este efecto se ve afectado por la interacción de la dieta (P interacción= $0,001$).



<i>P</i> dieta	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>P</i> calorías	0,221	0,113	0,216	0,301	0,000
<i>P</i> interacción	0,001	0,026	0,094	0,720	0,360

Figura 39. Cambios de expresión en el gen *mCOQ8* en respuesta a la RC del 40% en dietas conteniendo aceite de ternera ($N=36$), de soja ($N=36$) y de pescado ($N=36$). Los valores son dados en % de expresión como media \pm error estándar calculados a partir del número de copias del gen en 125 ng de ARNm totales y ajustados al número de copias de ARNm del gen interno HPRT en cada individuo. ANOVA de dos vías para la grasa, calorías y la interacción grasa*calorías. Diferencias significativas * ($P<0,05$), ** ($P<0,01$) Y *** ($P<0,001$) halladas en los tejidos de roedores en RC ($N=18$) respecto de su control *ad libitum* (AL, $N=18$).

En el riñón, la RC aumenta los niveles de transcrito en la dieta de ternera y los baja en la dieta de pescado. Los resultados obtenidos muestran interacción entre dieta*calorías con un $P=0,026$. En la dieta de pescado, la RC aumenta la expresión en el cerebro ($P<0,01$) y la disminuye en músculo.

Finalmente, el corazón muestra un efecto consistente de la RC ($P=0,000$) en las tres dietas que es independiente (P interacción= $0,360$) del efecto también significativo de la dieta ($P=0,000$).

3.2.3. EFECTO DE LA RC Y COMPONENTE LIPÍDICO SOBRE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS COQ

El estudio de proteína se realizó sobre todos los tejidos que habían presentado respuesta a la RC sobre el contenido de CoQ₉, CoQ₁₀, ratio CoQ₉/CoQ₁₀ y/o cambios de expresión de los genes COQ.

Siguiendo el criterio de cuantificación en proteómica para el análisis de geles bidimensionales (Stessl *et al.* 2009) con el fin de ser más restrictivos con los cambios de proteína obtenidos en los *western blot*, se prestó más atención a aquellos cambios con valores por encima del doble o por debajo de la mitad de la condición tomada como referencia.

3.2.3.1. Coq2p

A continuación en la **figura 40** se representan las imágenes correspondientes a la inmunodetección de Coq2p en las tres dietas y el efecto de la RC sobre cada uno de los tejidos que mostraron cambios a nivel de Q o de expresión.

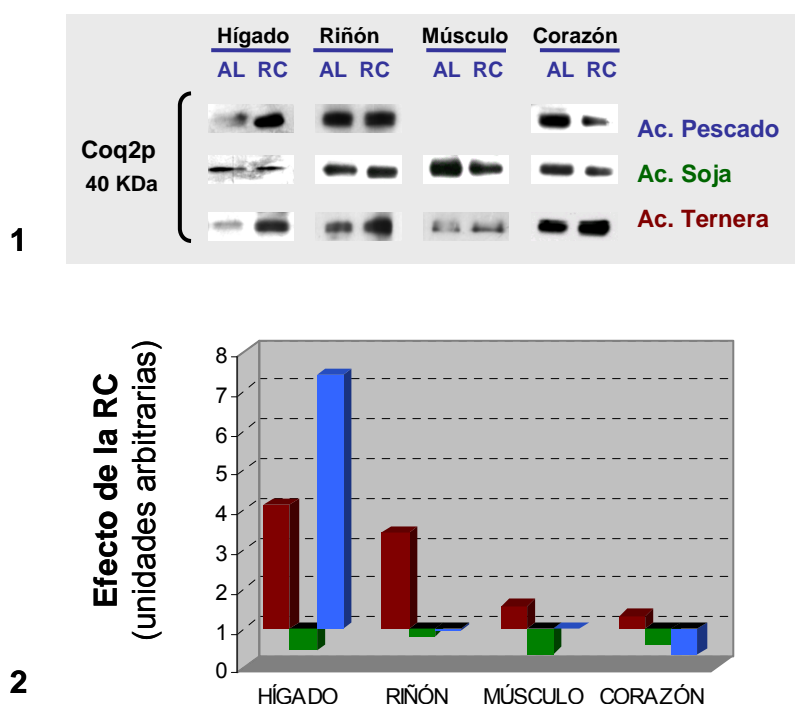


Figura 40. Efecto de la RC sobre los niveles de Coq2p en la dieta de ternera, soja y pescado en el hígado, riñón, músculo y corazón. 1. Imagen correspondiente al Western Blot de Coq2p. 2. Cuantificación de los resultados de Western Blot. Cada barra indica el cambio de Coq2p en RC respecto a su correspondiente dieta AL normalizada al valor 1.

Resultados

De acuerdo con nuestros resultados, en la dieta de ternera destacan unos niveles de Coq2p más elevados en el hígado y riñón cuando se proporciona una restricción de calorías (4,11 y 3,41 veces mayor respectivamente) que cuando los animales se alimentan con sus correspondientes dietas AL.

La dieta de pescado contiene los niveles más elevados de Coq2p (7,40 veces) que su correspondiente AL en hígado.

3.2.3.2. Coq3p

En la **figura 41** se representan las imágenes correspondientes a la inmunodetección de coq3p en las tres dietas y el efecto de la RC sobre cada uno de los tejidos que mostraron cambios a nivel de CoQ o de expresión de genes COQ.

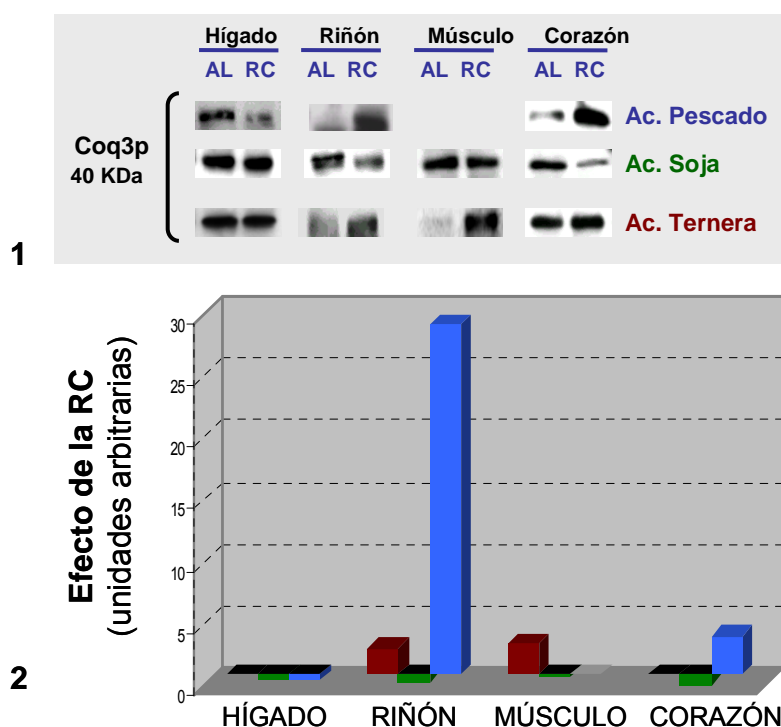


Figura 41. Efecto de la RC sobre los niveles de Coq3p en la dieta de ternera, soja y pescado en el hígado, riñón, músculo y corazón. 1. Imagen correspondiente al Western Blot de Coq2p. 2. Cuantificación de los resultados del Western Blot. Cada barra indica el cambio observado en los niveles de Coq2p en RC respecto a su correspondiente dieta AL normalizada al valor 1.

El estudio de Coq3p muestra un fuerte cambio en el riñón de animales alimentados con la dieta de pescado ante la RC, aumentando hasta 29,15 veces frente a su correspondiente AL. Los resultados también muestran un

incremento en músculo de la dieta de pescado de 4,10 veces frente a su AL. La dieta de ternera, por otro lado responde con un aumento de proteína en el riñón y cerebro de 3,1 y 3,5 a sus correspondientes AL.

3.3. EFECTO DE LA RC EN LA RELACIÓN $mSPS1/mDLP1$ Y LA RELACIÓN Q_9/Q_{10} EN LAS TRES INTERVENCIONES DIETÉTICAS

El objetivo de este análisis fue comprobar la posible correlación entre el ratio $COQ1$ ($mSPS1/mDLP1$) y el ratio CoQ (CoQ_9/CoQ_{10}). La bibliografía hasta ahora recogida en diferentes estudios, han permitido establecer la función de Coq1p como la enzima que determina la longitud de la cola isoprenoide del coenzima Q. Sabiendo que en ratones la síntesis está favorecida para la cadena de 9 isoprenos, pero que también se sintetiza la isoforma de 10 isoprenos (predominante en humanos), resultaba interesante estudiar la posible correlación entre el ratio de la expresión de los genes que conforman Coq1p en roedores ($mSPS1$, $mDLP1$) con el ratio de CoQ_9/CoQ_{10} en cada tejido, y su posible modificación después de una dieta hipocalórica o con aceites de distinta saturación a corto plazo.

El análisis estadístico calcula el coeficiente de Pearson y el valor P en una matriz de correlación que relacionaba los valores del ratio $COQ1$ con el ratio CoQ de cada tejido en cada intervención dietética por separado.

A pesar de que en algunos tejidos hemos encontrado que la restricción calórica producía alteraciones tanto en el ratio $COQ1$ como en el ratio CoQ, de manera consistente para las tres dietas estudiadas (con los tres tipos de contenido graso), el análisis de correlación de los valores individuales para cada uno de estos factores nos indicó la ausencia de correlación entre ambos ratios (ver gráficos indicados más adelante). Hemos representado en las figuras siguientes el efecto que, de manera independiente, ejerce la grasa de la dieta y el aporte de calorías sobre los dos ratios en los distintos tejidos de los ratones en cada intervención.

3.3.1. HÍGADO

En la **figura 42** se muestra el efecto de la RC sobre los ratios CoQ y *mCOQ1* en el hígado de los ratones alimentados con los distintos tipos de grasa de la dieta.

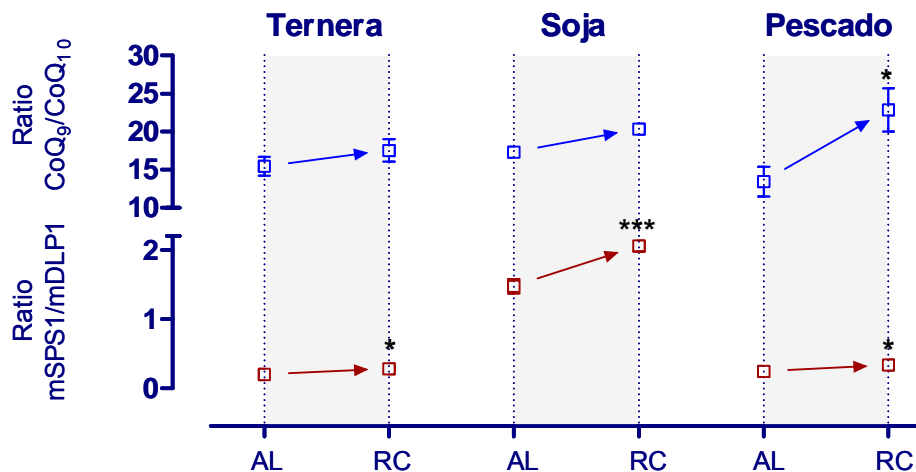


Figura 42. Representación del efecto de la RC en la relación CoQ₉/CoQ₁₀ y relación mSPS1/mDLP1 en el hígado de ratones alimentados con dietas conteniendo grasa de ternera (N=36), aceite de soja (N=36) o aceite de pescado (N=36). Prueba T para muestras independientes. Diferencias significativas *(P<0,05), **(P<0,01) y ***(P<0,001) de RC respecto de su correspondiente AL en cada ratio.

Como podemos observar en esta figura, la RC incrementó significativamente el ratio COQ1 en las tres intervenciones dietéticas, aunque únicamente incrementó la relación CoQ₉/CoQ₁₀ de manera significativa en la dieta de pescado.

El incremento del ratio COQ1 se explica por una bajada de la expresión de *mDLP1* (**figura 35**) en las tres dietas en RC, haciéndose significativo dicho cambio en la dieta de ternera, y un aumento de expresión de *mSPS1* que es estadísticamente significativo en la dieta de pescado (**figura 34**). El ratio entre las dos isoformas del CoQ aumenta en la dieta de pescado debido a una bajada significativa en el contenido de CoQ₁₀ en hígado en RC (**figura 36**).

3.3.2. RIÑÓN

En la **figura 43** se muestra el efecto de la RC sobre los ratios CoQ y COQ1 en el riñón de los ratones alimentados con las distintas fuentes grasas.

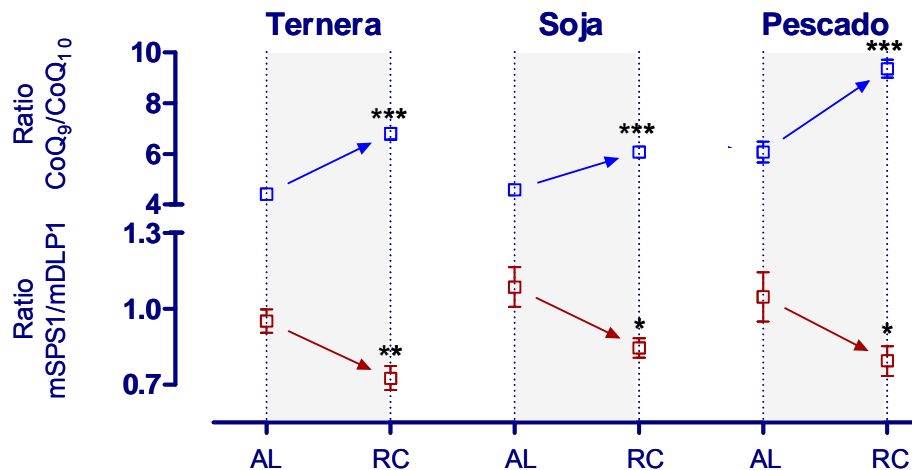


Figura 43. Representación del efecto de la RC en la relación CoQ₉/CoQ₁₀ y relación mSPS1/mDLP1 (unidades arbitrarias) en el riñón de ratones alimentados con dietas conteniendo grasa de ternera (N=36), aceite de soja (N=36) o aceite de pescado (N=36). Prueba T para muestras independientes. Diferencias significativas *(P<0,05), **(P<0,01) y ***(P<0,001) de RC respecto de su correspondiente AL.

Aunque el efecto de la RC es consistente en las tres dietas, los datos de correlación no resultaron significativos entre ratios.

El incremento de la relación CoQ₉/CoQ₁₀ que se observa en el riñón de los ratones alimentados con grasa de ternera y soja se debe a un incremento en los niveles de CoQ₉ (**figura 26**) y a una disminución también significativa estadísticamente en los niveles de CoQ₁₀ (**figura 27**). En la dieta de pescado, sin embargo ambos isoformas disminuyen significativamente en el riñón de RC (**figura 26** y **27**) aunque dicho descenso se da de manera más acusada en CoQ₁₀.

Como podemos observar, el ratio COQ1 disminuye significativamente en las tres intervenciones, aunque por motivos distintos (ver **figuras 34** y **35**). En la dieta de ternera y soja, la alteración se debe a un aumento de expresión de *mDLP1*, mientras que en la dieta de pescado se debe a un descenso en la expresión de *mSPS1*.

3.3.3. CEREBRO

En la **figura 44** se muestra el efecto de la RC sobre los ratios CoQ y COQ1 en el cerebro de los ratones alimentados con las distintas fuentes grasas.

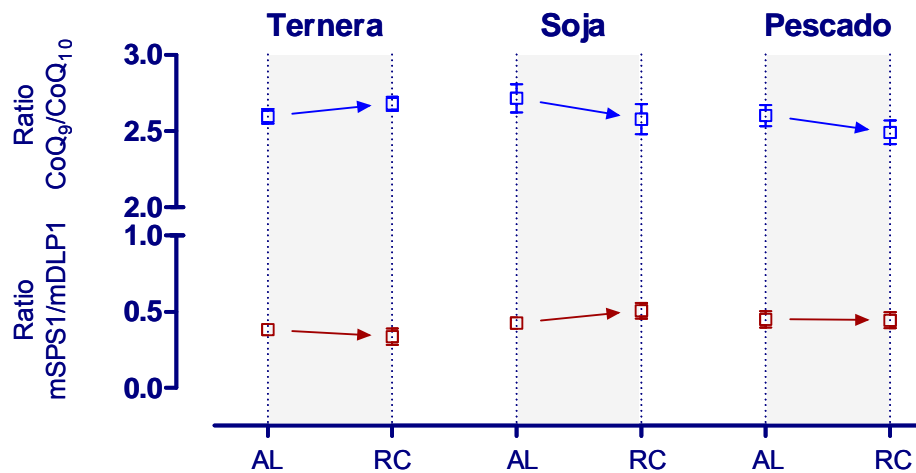


Figura 44. Representación del efecto de la RC en la relación CoQ₉/CoQ₁₀ y relación mSPS1/mDLP1 (unidades arbitrarias) en el cerebro de ratones alimentados con dietas conteniendo aceite de ternera (N=36), o aceite de soja (N=36) o aceite de pescado (N=36). Prueba T para muestras independientes. Diferencias significativas *(P<0,05), **(P<0,01) y ***(P<0,001) de RC respecto de su correspondiente AL.

En el cerebro no se hallaron cambios en respuesta a la RC en ninguna de las intervenciones dietéticas. Si observamos las **figuras 26-27** y **34-35** que representan los valores de las isoformas CoQ y genes *mCOQ1*, tampoco mostraron estos parámetros cambios significativos en ninguna de las dietas objeto de estudio en respuesta a la RC. Este resultado sugiere una regulación específica en cerebro ante distintas alteraciones metabólicas que pudieran estar relacionadas con la función del CoQ en este tejido. Estos datos serán discutidos en el siguiente apartado.

3.3.4. MÚSCULO

En la **figura 45** se muestra el efecto de la RC sobre los ratios CoQ y COQ1 en el músculo de los ratones alimentados con los distintos tipos de componente graso de la dieta.

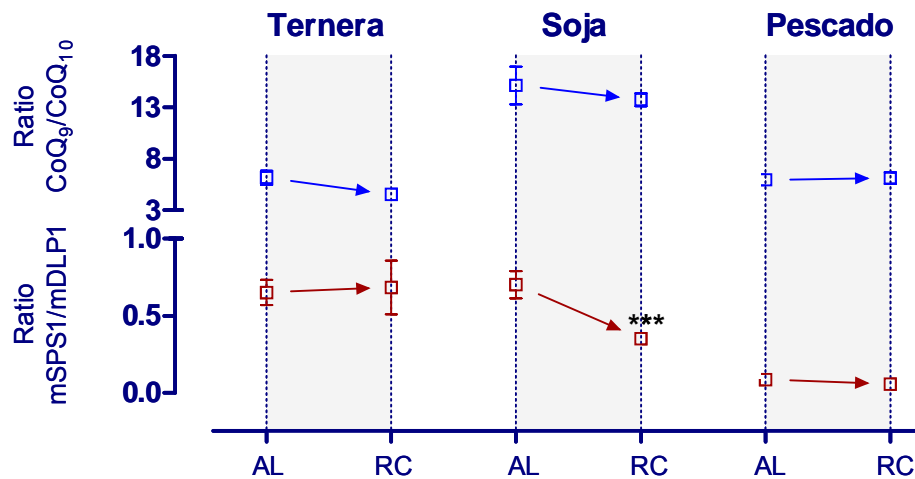


Figura 45. Representación del efecto de la RC en la relación CoQ₉/CoQ₁₀ y relación mSPS1/mDLP1 (unidades arbitrarias) en el músculo de ratones alimentados con dietas conteniendo grasa de ternera (N=36), aceite de soja (N=36) o aceite de pescado (N=36). Prueba T para muestras independientes. Diferencias significativas *(P<0,05), **(P<0,01) y *** (P<0,001) de RC respecto de su correspondiente AL.

En este tejido el efecto de la RC solamente se hace estadísticamente significativo en el ratio COQ1 de la dieta de soja. La bajada del ratio se debe a un incremento significativo en la expresión de *mDLP1* en RC (**figura 35**).

3.3.5. CORAZÓN

En la **figura 46** se muestra el efecto de la RC sobre los ratios CoQ y COQ1 en el corazón de los ratones alimentados con los distintos aceites.

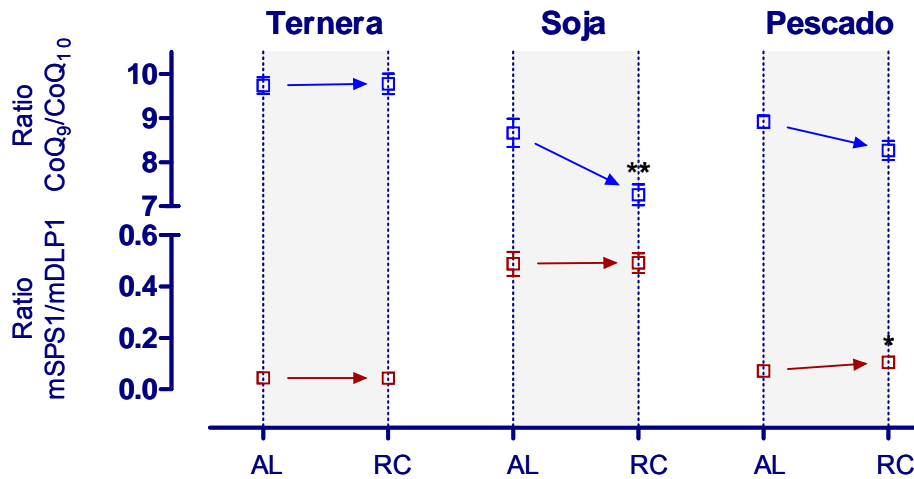


Figura 46. Representación del efecto de la RC en la relación CoQ₉/CoQ₁₀ y relación mSPS1/mDLP1 (unidades arbitrarias) en el corazón de ratones alimentados con dietas conteniendo grasa de ternera (N=36), aceite de soja (N=36) o aceite de pescado (N=36). Prueba T para muestras independientes. Diferencias significativas *(P<0,05), **(P<0,01) y ***(P<0,001) de RC respecto de su correspondiente AL.

El corazón responde de manera distinta a la RC según el componente graso. El ratio entre las dos isoformas del CoQ no se ve afectado en las dietas de ternera y pescado, aunque en la dieta de soja se observó un descenso significativo en la relación CoQ₉/CoQ₁₀. Por otra parte, se observó también un incremento del ratio *mCOQ1* estadísticamente significativo en la dieta compuesta con aceite de pescado.

Discusión

En los primeros estudios realizados sobre el CoQ se observó que la concentración de este lípido en la membrana mitocondrial interna excedía a los niveles registrados en el resto de componentes de la cadena de transporte de electrones, llegando a superar en 19 veces los niveles de citocromo c (Green and Wharton 1963). Actualmente es bien conocido su potente poder antioxidante frente a la peroxidación de lípidos y la formación de radical superóxido, además de su papel en la regulación de los complejos I, II y III, como componente de la cadena de transporte de electrones para la generación de ATP en el metabolismo energético.

El CoQ se encuentra presente en todas las membranas y se sintetiza en todos los tejidos en unos niveles suficientes para responder a los requerimientos celulares en condiciones basales. En respuesta a una elevada producción o acumulación de especies reactivas de oxígeno, el organismo incrementa los niveles antioxidantes, incluyendo el aumento de la tasa biosintética de CoQ (Beyer *et al.* 1985). La síntesis de este lípido se encuentra probablemente regulada por numerosos factores y a distintos niveles, pues sus diversas funciones están directamente implicadas en la homeostasis redox de la célula.

Las investigaciones más recientes (Anderson and Weindruch 2010) dedicadas a entender los mecanismos por los cuales la restricción calórica extiende la longevidad y mejora la calidad de vida, proponen que la vía de acción de esta intervención no genética en el organismo es a través de moléculas efectoras que reprograman el metabolismo energético en respuesta a una disponibilidad reducida de energía. Además, estudios en varias especies, revelan que los cambios en el metabolismo energético inducidos por la restricción calórica son dependientes de tejido (Heilbronn and Ravussin 2003; Park and Prolla 2005; Anderson and Weindruch 2010).

En nuestro estudio demostramos que en ratones adultos jóvenes la restricción calórica a corto plazo modula, siempre dependiendo del tejido, la ruta de síntesis y contenido de CoQ endógeno y además, este efecto observado está condicionado al grado de insaturación del componente graso de la dieta.

Ya que todos los tejidos del organismo son capaces de modificar la composición de la membrana por efecto de la grasa alimentaria, decidimos

estudiar el efecto de las dietas sobre el CoQ endógeno en órganos mitóticos (hígado, riñón) y postmitóticos (cerebro, tejido muscular y corazón). Estos últimos se diferencian de los mitóticos porque son tejidos terminalmente diferenciados sin capacidad regenerativa en respuesta a cualquier lesión o muerte celular. El daño oxidativo generado en los tejidos postmitóticos produce lesiones celulares de mayor relevancia e incluso irreversibles como ocurre en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o Parkinson, o en enfermedades asociadas a deficiencias de CoQ producidas por defectos en las enzimas responsables de su biosíntesis. Además de la deficiencia primaria, se han encontrado una serie de desórdenes mitocondriales que muestran también una deficiencia secundaria de CoQ (DiMauro *et al.* 2007). Todos estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de realizar un análisis exhaustivo de la biosíntesis de CoQ y su integración en la homeostasis de la mitocondria.

1. ESPECIFICIDAD TISULAR DE LA BIOSÍNTESIS Y CONTENIDO DE COENZIMA Q

Nuestro primer objetivo fue establecer los niveles basales del CoQ en ratones (N=18) alimentados con una dieta *ad libitum* cuyo contenido graso fue grasa de ternera (sin reducción calórica). Se trató en este caso de que dicho contenido graso no estuviera constituido por una elevada proporción de ácidos poliinsaturados (n-6 o n-3) predominantes en las dietas enriquecidas con aceite de soja y pescado, que son más susceptibles a la peroxidación lipídica. La concentración de CoQ₉ y CoQ₁₀, calculada en nuestro trabajo sobre la base del contenido proteico total de cada homogenado, ordena los tejidos de mayor a menor contenido de CoQ como se indica a continuación:

CoQ₉: **Riñón>corazón>hígado>cerebro>músculo**
CoQ₁₀: **Riñón>cerebro>corazón>hígado>músculo**
CoQ_{total}: **Riñón>corazón>hígado>cerebro>músculo**

Para verificar nuestros resultados los comparamos con los datos publicados en un estudio muy similar realizado por otros autores ([Lass et al. 1999a](#)) en ratones longevos C57BL/6JNia, hallándose pequeñas diferencias. Nosotros encontramos los niveles de CoQ₉ de hígado superiores a los de cerebro y, en lo que respecta al contenido de CoQ₁₀, en nuestro estudio el cerebro se situó como el segundo tejido con mayor concentración después del riñón. Estos datos coinciden con los publicados por Turunen y colaboradores ([Turunen et al. 2004](#)) sobre la distribución tisular del CoQ en la rata, donde el CoQ₁₀ en cerebro y bazo constituía hasta un 30-40 % respecto del CoQ total, siendo un 10-20 % en el resto de tejidos. De manera contraria, en el trabajo realizado por Lass y colaboradores ([Lass et al. 1999a](#)), el contenido de CoQ₁₀ en riñón y corazón superaba al cuantificado en cerebro.

El contenido de CoQ₁₀ en los roedores alimentados con la dieta cuyo contenido graso fue aceite de soja sí coincidía con lo publicado por Lass et al. ([Lass et al. 1999a](#)). Estas pequeñas discrepancias parecen estar más bien relacionadas con la intervención dietética que reciben los animales, el tipo de cepa de los ratones utilizados en cada laboratorio, la edad del animal, así como el procedimiento de extracción y cuantificación de CoQ utilizado por cada laboratorio. En resumen, nuestros resultados (coincidiendo con los publicados) sitúan al riñón como el órgano con el contenido de CoQ más elevado, siguiéndole el corazón; y al músculo como el tejido con menor contenido en CoQ.

La distribución de CoQ se puede calcular también en base al peso fresco del tejido. Según los datos publicados por Beyer y colaboradores ([Beyer et al. 1985](#)), comparando en las mismas ratas el contenido de CoQ total referido a la cantidad de proteína y al peso fresco de tejido, el homogenado de músculo mostraba de nuevo los valores más pequeños de CoQ total (CoQ₉ + CoQ₁₀). En cambio en el hígado la concentración de CoQ total (CoQ₉ + CoQ₁₀) referida al peso fresco del tejido alcanzaba los niveles encontrados en corazón y riñón de animales jóvenes y longevos.

Teniendo en cuenta que nuestro objetivo es determinar principalmente el efecto de la dieta en cada tejido, y no la estimación precisa de contenido de Q en cada órgano y compartimento celular, la elección de una u otra referencia

Discusión

para calcular la concentración de CoQ no influye sobre los resultados obtenidos tras la realización de nuestros tratamientos.

Los niveles de coenzima Q están determinados por el balance entre la biosíntesis endógena de Q y el aporte de CoQ ingerido en la dieta; con la utilización de CoQ para hacer frente al estrés oxidativo generado y la degradación en el metabolismo celular para la obtención de energía en forma de ATP. En un estudio reciente, el Grupo de R. Sohal ([Sohal *et al.* 2006](#)) demostró que cada órgano tenía una capacidad diferente para acceder al CoQ incorporado por la dieta, siendo el hígado y el músculo esquelético (además del plasma) los tejidos que presentaban una mayor accesibilidad. En el extremo opuesto se encontraba el cerebro, como el órgano con la accesibilidad más reducida. El contenido de CoQ en otros tejidos como el riñón y corazón incrementaba tras la suplementación de la dieta, aunque de manera más moderada.

Cuando en nuestro trabajo analizamos la relación de CoQ₉/CoQ₁₀ en el hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón observamos distintos acontecimientos reseñables. Es llamativa la heterogeneidad interindividual en los ratios CoQ₉/CoQ₁₀ del hígado y del músculo esquelético. Si estos tejidos acceden fácilmente a los componentes de la dieta, es posible que este efecto se deba a que a nivel individual cada homogenado varíe el balance entre el CoQ procedente de la propia dieta con el CoQ sintetizado endógenamente por la célula. Es probable por tanto que la fisiología celular en estos órganos se encuentra adaptada a las variaciones puntuales en la relación CoQ₉/CoQ₁₀ debido al aporte de la dieta, favoreciendo así la heterogeneidad entre individuos.

En el cerebro, por el contrario encontramos la relación CoQ₉/CoQ₁₀ más homogénea entre individuos. Estos resultados nos sugieren varias interpretaciones: Primero, la necesidad del organismo por mantener el cerebro aislado de condiciones externas que alteren la homeostasis mitocondrial, y en particular la homeostasis del coenzima Q, por su papel antioxidante y como componente esencial en la generación de energía. Segundo, que esa relación tan estrecha entre individuos indica que el contenido de Q en el cerebro es producto del balance entre la biosíntesis endógena y la degradación, y no del

CoQ incorporado exógenamente. Esto confirmaría su dificultad por acceder a este componente de la dieta.

Por otro lado la elevada concentración de CoQ₁₀ en este órgano hace que la relación con CoQ₉ sea la más baja detectada dentro de los cinco ratios estudiados. Esto presumiblemente podría relacionarse con la hipótesis, aún no consolidada, sobre los beneficios antioxidantes (relacionando posible acción contra daño oxidativo en el envejecimiento) del coenzima Q en función de la longitud de la cola isoprenoide (Olgun *et al.* 2003). La hidrofobicidad de la cola aumenta con el número de isoprenos de la molécula, lo cual inversamente disminuye su exposición a la superficie de la membrana (Lass *et al.* 1997). Una menor exposición al ambiente acuoso puede disminuir los efectos pro-oxidantes del CoQ. En este sentido, es bien conocido que, además de actuar como antioxidante (en su forma hidroquinona, totalmente reducida), cuando se encuentra en su forma semi-reducida (semiquinona) el CoQ puede dar lugar a la generación de superóxido, para lo cual es esencial su protonación y la exposición al ambiente acuoso (James *et al.* 2004; Turunen *et al.* 2004). Es razonable suponer que el cerebro sea particularmente susceptible al daño oxidativo debido a sus características postmitóticas, requiriendo probablemente de unos niveles antioxidantes más elevados para prevenir cualquier desequilibrio homeostático del metabolismo energético. En general, las variaciones observadas en los contenidos de CoQ₉ y CoQ₁₀, así como el ratio de ambos homólogos dentro de los diferentes tejidos del ratón, suscitan la pregunta de si cada homólogo del CoQ conlleva un significado fisiológico específico, particularmente si las diferentes proporciones de CoQ₉ y CoQ₁₀ afectan a las funciones mitocondriales.

Son numerosos los estudios realizados en roedores *in vivo* o sobre cultivos celulares *in vitro* que analizan el comportamiento del coenzima Q endógeno bajo distintas situaciones experimentales basadas en modificaciones del aporte calórico (Huertas *et al.* 1991a; Kamzalov and Sohal 2004), el ejercicio constante (Beyer *et al.* 1984; Sacconi *et al.* 2009), la respuesta ante inhibidores de los complejos de la cadena de transporte de electrones (Gonzalez-Aragon *et al.* 2005), o incluso sobre el efecto de los niveles de una dieta enriquecida con suplementos de CoQ (Kon *et al.* 2007; Mori *et al.* 2009),

con el objetivo de conocer de qué manera este antioxidante sintetizado endógenamente responde al estrés oxidativo generado en la célula.

La pregunta de cómo las enzimas de ruta de biosíntesis de Q son reguladas selectivamente bajo distintas situaciones de estrés, envejecimiento o alimentación se nos muestra aún como un interrogante. Mediante un estudio de RT-PCR cuantitativa pudimos cuantificar el número de copias de mensajeros de genes (*mSPS1*, *mDLP1*, *mCOQ2*, *mCOQ3*, *mCOQ7* y *mCOQ8*) que codifican enzimas responsables de la etapa final de biosíntesis de coenzima Q. Además, hemos estudiado el efecto de distintas intervenciones dietéticas sobre los niveles de estos mensajeros.

En primer lugar nos preguntamos si la expresión de los genes estaba condicionada por el tejido, al igual que los niveles de coenzima Q₉ y Q₁₀ eran distribuidos de manera dependiente de tejido en el animal. Por ello, este estudio de expresión se llevó a cabo en los ratones alimentados con una dieta *ad libitum* constituida con grasa mayoritariamente saturada procedente de ternera, completando así el estudio de distribución tisular de coenzima Q. Como era de esperar, nuestros resultados mostraron que cada tejido presentaba su propio perfil de expresión.

A continuación en la **figura 47** se muestran agrupados en el eje de ordenadas los niveles de expresión de todos los genes analizados en cada tejido en el capítulo **Características basales del contenido de coenzima Q y genes COQ**. Esta representación de datos en escala lineal facilita una visión global sobre la implicación de cada gen en la biosíntesis de coenzima Q. Encontramos que la expresión de *mCOQ2* es muy elevada en el riñón en comparación con el resto de tejidos. Estos valores coinciden también con una elevada presencia a nivel de proteína. Tratándose del órgano con mayor contenido de coenzima Q₉ y Q₁₀ (Lass et al. 1999a), esta distinguida expresión en riñón respecto al resto de tejidos apoyan la hipótesis de que la pHB-poliprenil difosfato transferasa (Coq2p) se trate de una enzima determinante en la vía de síntesis de CoQ. De acuerdo con esta idea, Coq2p participa en la ruta biosintética del CoQ condensando el anillo aromático a la cadena de isoprenos, formando así el primer intermediario de la biosíntesis estructuralmente similar al CoQ, el ácido 4-hidroxi-3-poliprenil benzoico (Ashby et al. 1992; Forsgren et al. 2004). Coq2p es por tanto la primera enzima que es específica de la ruta

biosintética del CoQ (Turunen *et al.* 2004). Es probable que, en condiciones basales (sin ninguna alteración dietética), el riñón requiera de unos niveles elevados del transcrito de *mCOQ2* para mantener el contenido tan elevado de coenzima Q que necesitan sus células y organelas intracelulares. Recientemente, se han publicado casos clínicos de pacientes con deficiencia primaria de Q que presentan mutaciones en el gen *mCOQ2* y cursan entre otras patologías nefrosis tempranas y severas con efectos terapéuticos beneficiosos después de la administración oral de coenzima Q₁₀ (Quinzii *et al.* 2006).

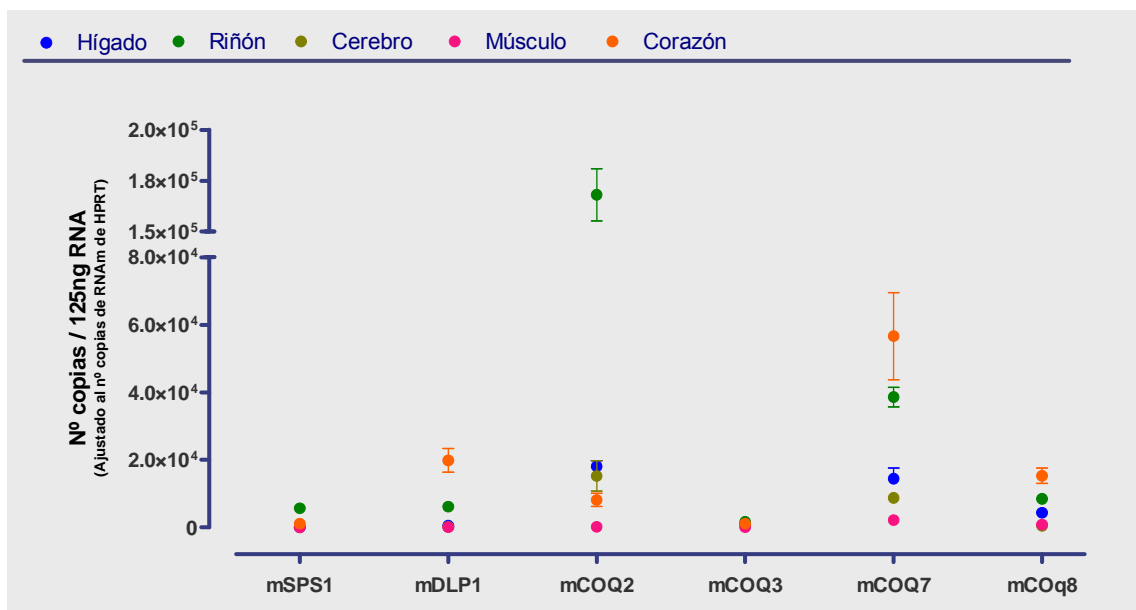


Figura 47. Número de copias totales de cDNA/125ng RNA de mSPS1, mDLP1, mCOQ2, mCOQ3, mCOQ7 y mCOQ8 en hígado, riñón, cerebro, músculo y corazón. Los valores son dados como media \pm error estándar de 18 roedores en condiciones *ad libitum*. ANOVA de un factor. Diferencias significativas *P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,001 respecto a hígado (a) y riñón (b).

El grado de variabilidad que existe en la expresión de genes entre tejidos es también llamativo. Aunque el estudio ANOVA de una vía encontraba cambios en la expresión de *mCOQ3* entre tejidos, estos cambios son mínimos en comparación con la heterogeneidad de expresión del resto de genes COQ analizados entre tejidos.

En la biosíntesis de CoQ, Coq3p cataliza dos etapas de O-metilación del anillo benzoquinona (Poon *et al.* 1999). Un aspecto particular de esta enzima es que una de estas dos reacciones da lugar a la formación completa de una

molécula de CoQ (Hsu *et al.* 1996; Poon *et al.* 1999). Esta observación, pudiera insinuar que los transcritos de *mCOQ3* en todos los tejidos deben tener unos niveles suficientes y constantes para que se complete la síntesis de CoQ. La falta de información sobre la regulación de la síntesis a este nivel no nos permite obtener conclusiones sólidas sobre su regulación. Sin embargo, en el siguiente capítulo de la discusión se observará que este enzima parece tener una respuesta consistente a aumentar en los tejidos donde la RC provoca una disminución del contenido de coenzima Q.

Desde una visión global, se distingue una cierta correlación entre el contenido de coenzima Q y los niveles de expresión de los genes *COQ* dentro de cada tejido. En condiciones basales el riñón y corazón son los dos órganos que presentan unos niveles de CoQ más elevados, lo cual se corresponde con los niveles de expresión más elevados en todos los genes *COQ*. La única excepción la encontramos en el caso de *mCOQ2*, cuyos niveles en el hígado superan significativamente los encontrados en corazón. Asimismo, el músculo esquelético posee los niveles de Q más bajos, lo cual se correlaciona con los niveles más pequeños de transcritos de los genes *COQ*.

2. ADAPTACIÓN METABÓLICA DE LA BIOSÍNTESIS DE COENZIMA Q CON LA RESTRICCIÓN CALÓRICA Y SU INTERACCIÓN CON EL COMPONENTE GRASO DE LA DIETA EN RATONES JÓVENES

El descubrimiento de las bases moleculares del envejecimiento en mamíferos progresa lentamente, en parte porque en la actualidad no se conocen biomarcadores que midan los procesos de envejecimiento (Weindruch *et al.* 2002; Park and Prolla 2005). Las curvas de supervivencia son útiles en ensayos de envejecimiento en organismos de vida corta compuestos mayoritariamente de células postmitóticas tales como *Drosophila* o *Caenorabditis elegans*, pero no resultan tan prácticas en organismos más complejos de vida larga para indicar la eficacia de una intervención, como la restricción calórica, que hasta ahora es la única intervención que de manera

consistente extiende la vida dentro de diversas especies incluyendo los mamíferos (Weindruch *et al.* 1988).

Debido a la cantidad de factores que intervienen en el proceso global de envejecimiento de un organismo, resulta llamativo que la restricción calórica retarde todos esos parámetros simultáneamente. Recientemente se están incorporando novedosas técnicas de microarrays que a nivel molecular permiten conocer el perfil de expresión en los procesos de envejecimiento en ratones de laboratorio, así como el efecto de distintas intervenciones, en particular la restricción calórica. Estudios en el músculo gastrocnemio, cerebro y corazón de ratones C57BL/6 de 5 a 30 meses de edad revelan que el envejecimiento se encuentra asociado con alteraciones a nivel de transcripción como cambios en la expresión de genes o estabilidad de ARNm entre otros (Lee *et al.* 1999a). Aunque los cambios a nivel de ARNm no siempre resultan en una alteración paralela con los cambios a nivel de proteína, la completa o parcial restauración de la mayoría de alteraciones del envejecimiento observadas a nivel de ARNm a través de la RC, sugieren que el perfil de expresión puede ser usado para evaluar la edad biológica de tejidos en mamíferos, siendo una herramienta útil para evaluar distintas intervenciones experimentales (Lee *et al.* 1999a).

Según los últimos resultados a nivel molecular, durante el envejecimiento existe una inducción de la repuesta al estrés como resultado del daño en proteínas y otras macromoléculas ocasionado por el declive energético celular y por el déficit en los sistemas de renovación de tales moléculas. En particular, existen alteraciones en los transcritos asociados con el metabolismo energético, y la función mitocondrial (Lee *et al.* 2004), que reflejan una disminución de la biogénesis de la mitocondria y una acumulación de especies reactivas de oxígeno, mayoritariamente en los tejidos postmitóticos.

Los efectos de la restricción calórica contrastan los provocados por el envejecimiento, aminorando los genes de respuesta al estrés. De hecho en el trabajo realizado por Lee y colaboradores (Lee *et al.* 2004) observaron que la RC, así como suplementos antioxidantes en la dieta (CoQ y ácido lipoico) presentan un patrón de expresión común reduciendo la expresión de chaperonas y otros genes de respuesta al estrés, reflejando que dichas intervenciones disminuyen el nivel basal de los oxidantes celulares. Pero

además se ha propuesto a la RC como un modelo que actúa a través de una reducción en la tasa metabólica, resultando en una baja producción de tóxicos procedentes del metabolismo (Sohal and Weindruch 1996; Anderson and Weindruch 2010). La RC media la reducción de genes implicados en la detoxificación metabólica, reparación de ADN, y respuesta a estrés oxidativo, posiblemente porque en esta situación la disponibilidad de sustratos para estos sistemas sea menor. Además la RC también dispara los genes de relacionados con un aumento en la biosíntesis y renovación de macromoléculas (Weindruch *et al.* 2001; Park and Prolla 2005).

En adición a estos resultados se publicó en 2007 una base de datos de expresión génica (AGEMAP: Atlas of Gene Expression in Mouse Aging Project) (Zahn *et al.* 2007) en la cual se encontró una relevante especificidad tisular en los cambios transcripcionales asociados a la edad. De esta forma, se distinguían grupos de tejidos que mostraban cambios en la expresión de genes asociados con el declive del organismo, mientras que otros apenas mostraban alteración en su expresión indicando fuertes niveles de homeostasis a lo largo de la vida.

En relación con los objetivos planteados en este presente trabajo, además de analizar el efecto de la restricción calórica en el metabolismo del CoQ, nos interesamos por el efecto añadido de los ácidos grasos de la dieta. Se ha demostrado que dietas enriquecidas con ácido grasos monoinsaturados, como el ácido oleico del aceite de oliva virgen, contribuyen a aumentar los niveles de este ácido en las membranas celulares. De la misma manera, dietas enriquecidas con ácido poliinsaturados mantenían unos niveles de ácido oleico más bajos en las membranas, encontrándose además un elevado índice de ácido araquidónico en las membranas (Huertas *et al.* 1994). En otro estudio, el grado de insaturación de la grasa de la dieta condujo a diferentes contenidos de CoQ₉ y CoQ₁₀ mitocondrial en ratones de laboratorio (Mataix *et al.* 1997). En 2003 (Bhattacharya *et al.* 2003) se publicó un estudio donde se combinaba el efecto del componente graso con el aporte calórico de la dieta sobre la actividad de enzimas antioxidantes en el hígado de ratones. Encontraron que los ácidos poliinsaturados n-6 y n-3, provenientes de aceite de pescado, junto con la RC tenían efectos beneficiosos en el tejido hepático cuando era inducido a estrés oxidativo. Sin embargo, curiosamente ambos ácidos grasos mostraban

una mayor susceptibilidad a la peroxidación lipídica respecto de otros ácidos poliinsaturados, que era contrarestanda por el efecto de la restricción calórica.

Este trabajo, realizado sin precedentes, analiza de manera cuantitativa mediante PCR-RT a tiempo real, los cambios de expresión de 6 genes COQ en 5 tejidos de 108 ratones de laboratorio (C57BL/6) sometidos a tres intervenciones dietéticas con diferente grado de insaturación en su componente lipídico, más la combinación del efecto que la restricción calórica tiene sobre la vía de síntesis del CoQ.

Comprobada la especificidad tisular en la expresión de los genes COQ en base a los requerimientos de CoQ en condiciones basales, y apoyados por las recientes publicaciones que confirman la existente heterogeneidad de respuesta génica de cada tejido a la restricción de calorías, presentamos el efecto que inducen las distintas intervenciones tejido por tejido.

Nuestra aportación en este trabajo sitúa la biosíntesis de CoQ como una vía por la que la RC altera el metabolismo energético de la célula para conseguir sus efectos. La regulación se intensifica en algunos tejidos con el porcentaje de ácidos grasos insaturados incorporados con la dieta. Estos cambios no se pueden explicar de manera unitaria para todo el organismo, de forma que tejidos que necesitan asegurar una homeostasis constante, es el caso de tejidos postmitóticos como el cerebro, a corto plazo no muestran alteraciones inducidas por el componente graso ni por la restricción calórica. Sin embargo, otros como el riñón o el hígado sí responden ante una intervención a corto plazo y a una edad adulta sin procesos de envejecimiento asociados.

A continuación estos cambios se explican de manera más específica para cada tejido u órgano analizado.

2.1. HÍGADO

Los resultados obtenidos en hígado revelan distintas respuestas metabólicas en función del aporte calórico o el tipo de grasa de la dieta ingerida, así como también dependiendo de si se trata de una isoforma u otra del CoQ.

Nuestros resultados mostraron que la restricción calórica disminuyó los niveles de CoQ₁₀ en el hígado de los ratones alimentados con la dieta

conteniendo aceite de pescado. Se ha propuesto que la RC disminuye el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana (Yu *et al.* 2002). De acuerdo con esto podría explicarse que, ante una intervención de RC, no fuera necesario un aporte elevado de coenzima Q que contrarreste la propensión a la peroxidación lipídica de las membranas al incorporar ácidos poliinsaturados de la dieta. Por otra parte, es posible que en el caso de las dietas más susceptibles de peroxidación (con un elevado porcentaje en ácidos grasos poliinsaturados) exista un mayor requerimiento y consumo de CoQ, de modo que al encontrarse en una situación de restricción calórica, donde el metabolismo basal se encuentra aminorado y por lo tanto con una producción de ATP más pequeña, los mecanismos de renovación de Q pueden estar más ralentizados, lo cual se manifiesta en unos niveles más bajos de coenzima Q en el hígado. Un estudio realizado por el Grupo de J. Mataix (Mataix *et al.* 1997) demostró que la adriamicina, una droga usada en terapia clínica y que induce estrés oxidativo, provocaba un descenso en los niveles de Q en el hígado de ratones jóvenes que habían sido alimentados durante dos meses con una dieta enriquecida con ácidos grasos poliinsaturados, sin encontrarse dicho descenso cuando los animales fueron alimentados con dietas cuyo contenido graso fue aceite de oliva, donde predominan ácidos monoinsaturados. De acuerdo con la interpretación de estos autores, la bajada en el contenido de Q se debería a una mayor degradación de CoQ ante una circunstancia de daño oxidativo, que es superior en las membranas mitocondriales insaturadas como resultado de la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados procedentes de la dieta.

Por otro lado el contenido graso de la dieta sin restricción calórica modificó el contenido de CoQ₉ cuando comparamos las tres intervenciones, siendo más elevados los niveles con la dieta que contenía aceite de soja. Curiosamente, en los resultados obtenidos por Mataix *et al.* (Mataix *et al.* 1997) el contenido de CoQ₉ en el hígado de los ratones alimentados con dietas control, sin daño oxidativo inducido por adriamicina, eran superiores cuando el grado de insaturación era mayor. Estos resultados estarían de acuerdo con el aumento de CoQ₉ en la dieta que contiene aceite de soja respecto a la dieta con grasa de ternera. Sin embargo, en el caso de la dieta con aceite de

pescado no encontramos cambios en los niveles de CoQ₉ respecto a la grasa de ternera.

Cuando observamos los niveles de expresión de los genes COQ, en condiciones basales (sin RC) resulta llamativo el hecho de que el hígado de los ratones alimentados con la dieta de pescado posee los niveles de expresión de todos los genes COQ significativamente superiores a los de la dieta de ternera, más saturada. Con la dieta de soja, existe una tendencia a aumentar sus niveles pero únicamente se hacen significativos en *mSPS1* y *mCOQ2*. Esto nos puede indicar que la incorporación de ácidos grasos más insaturados en las membranas lipídicas modula la expresión para sintetizar más enzimas de biosíntesis, con la finalidad de incrementar los niveles de CoQ. Así las membranas harían frente a la peroxidación lipídica provocada por el aumento de ácidos grasos poliinsaturados incorporados de la dieta. Son numerosos los casos en lo que se ha demostrado que los niveles de CoQ son modulados en función del estatus oxidante/antioxidante (Dallner and Sindelar 2000).

Actualmente no hay descritos estudios cuantitativos que puedan ayudarnos a entender de manera global los cambios de expresión en los genes COQ ante distintas intervenciones como la RC, pero siendo el hígado un tejido que tiene una mayor accesibilidad a los componentes de la dieta y por tanto a ser más susceptible de ser alterado su metabolismo energético en respuesta a ella, cabe esperar cambios en los genes responsables de la síntesis de CoQ. Nuestros resultados encuentran modificaciones en la expresión cuando los roedores se someten a RC, pero no permiten obtener datos concluyentes. En todo caso, sí podemos afirmar que la expresión de los genes COQ en RC en la dieta de aceite pescado no muestran una tendencia a aumentar sus transcritos. La propuesta sobre la reducción de la tasa metabólica mediada por la RC respaldaría estos datos, y apoyaría de nuevo la bajada de CoQ₁₀ en RC con aceite de pescado. Sin embargo, la dieta de aceite de soja (que también está compuesta por un contenido elevado de ácidos poliinsaturados) no disminuye el contenido de CoQ en restricción calórica, y significativamente aumenta la expresión de al menos cuatro genes COQ (*mCOQ2*, *mCOQ3*, *mCOQ7* y *mCOQ8*). Esta diferencia se explicaría por la diferente composición de ambas dietas poliinsaturadas, predominando los ácidos grasos omega-3 en la dieta de pescado y en la dieta de soja los ácidos grasos omega-6, que como se explica

más adelante (en el apartado 2.5 de corazón) presentan distinta susceptibilidad a la peroxidación lipídica debido a la posición del doble enlace que determina su mayor o menor oxidación (Mesa *et al.* 2004).

Para finalizar, es necesario tener en cuenta que, aunque el estudio de expresión génica nos da información completa sobre la mayoría de los genes COQ, son las proteínas codificadas quienes desarrollan la función. En nuestro estudio de inmunodetección de Coq2p curiosamente encontramos un incremento significativo en las dietas de grasa de ternera, siendo además muy elevado en la dieta de aceite de pescado, lo cual nos indica que esta enzima podría ser una diana de la RC a nivel postranscripcional, sensible a los niveles de CoQ, ya que los niveles de ARNm no muestran cambios con la RC.

2.2. RIÑÓN

En el riñón, la RC regula tanto el contenido de CoQ como la relación Q_9/Q_{10} . Además este efecto es dependiente del tipo de grasa ingerida con la dieta.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio se pueden analizar desde distintas perspectivas. En primer lugar, observamos que bajo una dieta conteniendo aceite de pescado en RC, al igual que en el hígado, disminuyen destacadamente los niveles de coenzima Q_{10} . Además, en el riñón también descienden significativamente los niveles de CoQ_9 . Es probable que en el riñón, el efecto de la RC sea más pronunciado al tratarse de un órgano con un contenido en CoQ más elevado (ver anteriormente). Ambos órganos tienen un acceso más directo a la dieta y quizá por ello se observe esta respuesta en un tiempo relativamente corto de ingesta.

Además, los efectos de la RC se ven influenciados por el componente graso de la dieta, de forma que cuando el entorno es más poliinsaturado se detectan unos niveles de CoQ_9 y CoQ_{10} más pequeños que con la dieta de grasa de ternera.

De acuerdo con la hipótesis planteada anteriormente para el caso del hígado, los resultados obtenidos en riñón de nuevo reafirman la hipótesis de que el contenido de CoQ disminuye en las dietas poliinsaturadas en respuesta a un requerimiento mayor de CoQ para hacer frente a una membrana más susceptible a la oxidación y debido a una bajada del metabolismo energético

provocado por la RC que retardaría la renovación de enzimas para sintetizar CoQ. Otra posibilidad que explica esta bajada de CoQ sea una adaptación a la mayor insaturación de la membrana debido al posible papel pro-oxidante del coenzima Q, el cual se haría más patente a concentraciones mayores (como ocurriría sobre todo en riñón). A este respecto, los estudios de silenciamiento de genes COQ llevados a cabo por el Grupo de P. Navas en *C. elegans* (Asencio *et al.* 2003; Rodríguez-Aguilera *et al.* 2005) indican que unos niveles menores de CoQ pueden dar lugar a un funcionamiento más optimizado de la cadena de transporte mitocondrial y a la generación de menos ROS. Esto sería beneficioso en un entorno enriquecido en ácidos grasos poliinsaturados.

Si observamos la relación CoQ₉/CoQ₁₀, comprobamos que la RC altera la relación entre las dos isoformas, de forma que aunque ambas disminuyen en RC, el CoQ₁₀ lo hace en proporciones mayores en las tres intervenciones. Si además observamos los ratios CoQ₉/CoQ₁₀ para las tres condiciones *ad libitum*, este valor aumenta progresivamente de una dieta saturada a las más insaturadas. Este resultado contrasta con el posible papel más antioxidante del CoQ₁₀ en comparación con el CoQ₉, ya que la relación Q₉/Q₁₀ aumenta progresivamente de una dieta saturada a la más insaturada.

Como hemos indicado anteriormente, no se conoce con certeza que la existencia de un isopreno más en la cola hidrofóbica de CoQ le confiera mayor poder antioxidante al CoQ₁₀, y que ante un entorno más prooxidante la célula utilice más CoQ₁₀ que CoQ₉, alterando la relación CoQ₉/CoQ₁₀. Sin embargo, en un trabajo realizado por Sohal 2007 (Sohal and Forster 2007) se realizaron varios análisis de correlación entre los homólogos del CoQ y la generación de superóxido en la mitocondria, comprobándose que la generación de superóxido era mayor en especies menos longevas que sintetizaban mayoritariamente CoQ₉ en vez de CoQ₁₀. Finalmente estas asociaciones no pudieron establecer una relación de causa-efecto. Para confirmar la posible diferencia antioxidante del CoQ₉ y el CoQ₁₀ deberían ser requeridas manipulaciones que modifiquen las relativas concentraciones de ambos homólogos *in vivo*. En todo caso, de acuerdo con nuestros resultados, queda claramente establecido que el riñón tiene unos requerimientos específicos de una u otra isoforma del CoQ, siendo modulados por el aporte calórico y el grado de insaturación de la grasa de la dieta.

Si prestamos atención a los niveles de expresión de los genes *COQ* en las distintas intervenciones encontramos que, al igual que en el hígado, en el riñón los niveles de expresión de todos los genes *COQ* en los animales alimentados con la dieta de aceite de pescado son superiores a los encontrados en las dietas de soja y ternera, a excepción de *mCOQ3*, que es mayor en ternera. De nuevo estos resultados confirman nuestra hipótesis sobre la manifiesta regulación de la grasa de la dieta en la activación de la expresión de genes *COQ* para activar el metabolismo del CoQ y compensar un posible déficit de esta molécula.

Por otro lado, la RC también tiene un efecto muy pronunciado en la expresión de los genes *COQ*. La dieta de aceite de pescado en RC es la que más afecta a los niveles de CoQ y la que mayores niveles de transcritos presenta en condiciones AL. Con la RC todos los genes *COQ* estudiados en este trabajo (a excepción de *COQ7* que no varía) disminuyen muy significativamente. En contraste, en la inmunodetección de Coq3p en la dieta de pescado se observan unos niveles de proteína 29 veces superiores a los encontrados en AL. En la dieta de grasa de ternera no se afecta la expresión de *mCOQ3*, pero de nuevo se encuentran elevados los niveles de proteína, aunque sólo aumentan 3,1 veces por encima de los de AL. También debemos tener en cuenta que en esta dieta los niveles de expresión en condiciones AL y RC de *mCOQ3* son tan elevados como en pescado.

Estos resultados sugieren que la RC puede actuar sobre distintos niveles siendo en este enzima más evidentes a nivel de traducción. En un estudio similar, se midió el impacto de la RC a corto plazo sobre una proteína implicada en el metabolismo de la urea (CpsI) en el hígado y en el intestino de ratones de laboratorio. En ambos tejidos comprobaron que la actividad específica aumentaba con la RC, en cambio únicamente se incrementaban los transcritos en el hígado, sugiriendo que la RC regula de manera dependiente de tejido tanto la transcripción y/o la traducción y/o la actividad específica de la proteína. Además, los cambios en el metabolismo responsables de la inducción de genes pueden ser relativamente rápidos (Tillman *et al.* 1996).

Nuestros resultados también sugieren a Coq3p como una enzima clave reguladora de la síntesis, pues ante una bajada de coenzima Q aumenta sus niveles. Ello no es sorprendente si tenemos en consideración que, como hemos

indicado anteriormente, Coq3p cataliza dos pasos de O-metilación, el segundo de los cuales origina el producto final de la ruta biosintética.

Debido a la falta de información sobre los niveles de proteína del resto de enzimas, no se puede obtener una conclusión final, si bien podemos decir que efectivamente, ya a nivel de expresión génica existe una fuerte regulación de la restricción calórica sobre la capacidad del tejido por activar la expresión de genes COQ.

2.3. CEREBRO

El cerebro tiene un comportamiento particular respecto del resto de órganos cuando es sometido a una RC y al consumo de dietas con distintos contenidos grasos. Según nuestros resultados la RC a corto plazo no altera el contenido de CoQ (CoQ₉ y CoQ₁₀), y prácticamente no tiene ningún efecto sobre la expresión de los genes COQ aún variando el contenido graso.

Aunque es muy amplia la información sobre la influencia de la RC en el daño oxidativo en tejidos periféricos durante el envejecimiento, los mecanismos de acción en el cerebro no está aún bien documentados. Se supone que las propiedades de la RC ante el envejecimiento están mediadas por dos mecanismos: una mejora en la energía metabólica bajo una reducción de especies reactivas de oxígeno generadas (Lopez-Lluch *et al.* 2006) y un incremento en la resistencia al estrés (Koubova and Guarente 2003; Rattan 2008). La dieta es un factor medioambiental que especialmente afecta a los procesos de envejecimiento en el cerebro. Ésta puede tener unos efectos beneficiosos como por ejemplo la inducción de la neurogénesis mediada por la RC en ratones jóvenes (Gillette-Guyonnet and Vellas 2008) e incluso potenciar la plasticidad sináptica en ratones longevos, aumentando así la capacidad cerebral para resistir contra el envejecimiento y restaurar funciones después del daño.

Por otro lado, fallos en la biosíntesis de CoQ así como un desequilibrio en los requerimientos esenciales de este lípido en la mitocondria pueden llegar a causar la muerte en humanos. Es evidente que los sistemas que demandan más energía como el cerebro o el sistema muscular sean los más afectados por el déficit de coenzima Q₁₀. Dentro de las enfermedades de deficiencia primaria de coenzima Q se encuentran patologías como: encefalomiopatía

caracterizada por mioglobinuria recurrente e implicación cerebral (Ogasahara *et al.* 1989; Sobreira *et al.* 1997; Boitier *et al.* 1998; Di Giovanni *et al.* 2001), enfermedad infantil multisistémica severa (Rotig *et al.* 2000; Rahman *et al.* 2001; Salviati *et al.* 2005), ataxia cerebelosa (Musumeci *et al.* 2001; Gironi *et al.* 2004) y Síndrome de Leigh (Van Maldergem *et al.* 2002). Recientemente se han publicado (Lopez *et al.* 2006; Quinzii *et al.* 2006; Mollet *et al.* 2007) mutaciones en al menos 3 genes (*PDSS1*, *PDSS2* y *COQ2*) de los 9 genes de la biosíntesis de Q asociadas con la deficiencia primaria de Q. Las investigaciones sobre los efectos de la ingesta de CoQ exógeno son necesarias desde que se ha observado que algunos de los pacientes pueden ser ayudados o incluso curados con una administración a largo plazo con elevadas dosis de CoQ₁₀. Resulta llamativo que, a diferencia de otros tejidos como el hígado, el corazón, el músculo esquelético, o incluso el plasma, el cerebro no incorpore de manera eficiente CoQ de la dieta (Sohal and Forster 2007). No existen evidencias claras sobre la influencia del CoQ en el envejecimiento del cerebro o funciones cerebrales en el cerebro sano, pero sí se ha encontrado que los efectos de la dieta juegan un papel importante en el riesgo a padecer desordenes neurológicos (Lee *et al.* 2004; Groneberg *et al.* 2005), aunque aún deben estudiarse muy en detalle los distintos componentes de las dietas.

En relación con el papel esencial del coenzima Q en el cerebro y su respuesta a la dieta, nuestros resultados no hallan una relación con el efecto de una dieta hipocalórica. El contenido de CoQ se mantiene constante y el patrón de expresión de genes *COQ* no manifiesta una regulación a nivel transcripcional. Esto no significa que la RC no tenga un efecto sobre la biosíntesis de CoQ. Más bien podría estar relacionado con la necesidad de este órgano a mantener una homeostasis equilibrada que asegure un buen funcionamiento del metabolismo energético de la mitocondria. De hecho se han publicado otros estudios (Beyer 1962; Beyer *et al.* 1962) donde se observa que el cerebro mantiene estables las concentraciones de CoQ bajo distintas situaciones. Por ejemplo ante un ejercicio de resistencia en ratas durante 6 meses aumentaron los niveles de CoQ en el corazón y músculo gastrocnemio, sin tener efectos en el cerebro (Beyer *et al.* 1984).

Es importante tener en cuenta que este trabajo lo realizamos en ratones jóvenes (1 mes), y que los ratones alimentados durante 8 y 20 meses con las mismas dietas y en RC, cuyo estudio está previsto en el Proyecto Principal en el cual se ha enmarcado este trabajo, probablemente manifiesten alteraciones en el metabolismo y contenido de CoQ por la RC y la grasa de la dieta, ya que se habrán desencadenado los procesos metabólicos asociados al envejecimiento, y por consiguiente acumulen especies reactivas de oxígeno, que bajo una RC quizá puedan reducir aumentando sus sistemas antioxidantes.

Por otro lado, es muy sugerente que ni la RC ni el componente graso de la dieta varíe la relación Q_9/Q_{10} ; es más, a nivel interindividual la relación se mantiene extremadamente homogénea en las seis situaciones (3 poblaciones AL y 3 poblaciones RC) en los 108 roedores analizados. ¿Qué significado tiene esta observación? Una alteración en la concentración de CoQ en la membrana mitocondrial, que no sea producto de una patología o el envejecimiento en sí (al tratarse de animales jóvenes), debería estar causada por un cambio de la capacidad funcional de la membrana. Que no exista alteración debe significar que el cerebro requiere una mayor regulación homeostática ante la cantidad y variabilidad de ácidos grasos ingeridos en la dieta, manteniendo el metabolismo energético de este órgano constante sin provocar un desequilibrio de la homeostasis de CoQ. De hecho, los resultados obtenidos en función del componente de la dieta sí muestran una tendencia en cuanto al contenido de CoQ en las dietas *ad libitum*, aunque de muy poco alcance en comparación con los cambios encontrados en riñón e hígado. En la dieta de aceite de pescado, encontramos al igual que en el hígado y riñón los niveles de CoQ_{10} más pequeños en comparación a las dietas de grasa ternera y aceite soja en RC. Estos cambios, aunque estadísticamente significativos, son mucho menos acentuados que los observados en los tejidos anteriormente mencionados.

Es llamativo que, pese a que no se producen cambios importantes en cuanto al contenido de CoQ, sigue manifestándose (al igual que en riñón e hígado) una elevada expresión de los genes *COQ* en la dieta de aceite de pescado frente a las otras dietas. Los cambios de comportamiento inducidos por la dieta con ácidos grasos n-3 (dietas de pescado, sobre todo pescado azul) y de n-6 (aceites vegetales, girasol, soja) están asociados con cambios

en la composición lipídica y apariencia microscópica de las células neuronales (densidad de vesícula sinápticas) (Yoshida *et al.* 1997) y la expresión de genes en el cerebro.

Dentro de los ácidos grasos omega-3 (aceites esenciales que son únicamente ingeridos en la dieta) el ácido docosahexaenoico (DHA) precursor del ALA (ácido linolenico) es muy importante en la estructura de la membrana de fosfolípidos y absolutamente necesario para la función neuronal (Bourre 2006). La dieta con ácidos omega-3 está implicada en la prevención de algunas enfermedades cardiovasculares, y en algunos desórdenes neuropsiquiátricos, particularmente la depresión, así como también el Alzheimer y demencias vasculares. Además, se ha publicado recientemente que la supervivencia de los ratones de laboratorio es mayor cuando se alimentaban con dietas enriquecidas con aceites omega-3, que con aceites omega-6, de forma que las dietas que favorecen ratios n-6/n-3 más pequeños muestran efectos beneficiosos en cuanto al riesgo a padecer infarto en ratas hipertensas (Okuyama *et al.* 2007). Sin embargo, en cultivos de células de cerebro se ha demostrado que, aparte de estos lípidos, la membrana también requiere de ácidos grasos poliinsaturados omega-6, manteniendo un equilibrio en el balance del ratio. Ambos ácidos son esenciales porque contribuyen a la fluidez, flexibilidad y permeabilidad de la membrana (Muskiet *et al.* 2004).

Teniendo en cuenta que las membranas del cerebro necesitan de unos niveles elevados de ácidos poliinsaturados, y en concreto n-3, parece tener una correlación con que haya una rápida respuesta de este órgano a aumentar los niveles de expresión de los enzimas responsables de sintetizar más CoQ cuando la dieta está enriquecida con aceites de pescado, con alto contenido en omega-3. En relación con lo mencionado en la introducción, el DHA (omega-3) aumenta la fuga de protones e inversamente el ácido linoleico (omega-6) la disminuye. El DHA es la especie lipídica más estrechamente asociada con la permeabilidad de la membrana y una mayor actividad de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (responsable del 10-30% del gasto energético en reposo) (Ramsey *et al.* 2000; Turner *et al.* 2003). El CoQ, por el contrario, compensaría esta situación, ya que se ha propuesto como inhibidor de la fuga de protones al acumularse en el centro de las bicapas lipídicas, previniendo que los encadenamientos de agua cargados crucen la membrana y por consiguiente el movimiento del Na^+ entre

las dos caras de la bicapa (Haines 2001). Podría ser que el CoQ₁₀ desempeñe mejor esta función en la membrana debido a que su estructura físico-química le aporta propiedades más hidrofóbicas que su homólogo de nueve isoprenos. De esta manera se explicaría porqué, de acuerdo con nuestros resultados, el contenido de CoQ₁₀ se mantiene tan elevado en comparación con el homólogo CoQ₉.

2.4. MÚSCULO ESQUELÉTICO

Para examinar la respuesta transcripcional en el músculo esquelético, elegimos el músculo gastrocnemio. El objetivo del Proyecto principal en el que se enmarca este trabajo es estudiar el efecto de la dieta a lo largo del envejecimiento en ratones. El músculo esquelético está principalmente compuesto por células postmitóticas de larga vida caracterizadas por un consumo elevado de oxígeno, una característica compartida con otros tejidos postmitóticos como el cerebro y corazón. A nivel histológico el músculo gastrocnemio en ratones envejecidos está caracterizado por una atrofia de las células musculares, variaciones en la fibra muscular, y anomalías mitocondriales, entre otras modificaciones (Ludatscher *et al.* 1983).

La deficiencia de CoQ se manifiesta en pacientes con distintas enfermedades, haciendo necesario agrupar dichas patologías en cuatro grandes fenotipos: miopatías aisladas, síndrome de Leigh, ataxia cerebelosa y la enfermedad infantil multisistémica severa. En resumen, enfermedades que afectan principalmente a tejidos postmitóticos. Muy recientemente la identificación de los genes implicados en la biosíntesis de CoQ ha permitido diferenciar entre la deficiencia primaria y secundaria. La deficiencia primaria incluye todas las alteraciones relacionadas con la vía de síntesis de CoQ. Se han encontrado mutaciones en cuatro genes de humanos (COQ1, COQ2, ADCK3-COQ8 de humanos- y COQ9). La segunda deficiencia incluye a las enfermedades humanas relacionadas con mutaciones en los genes no involucrados en la síntesis. Los mecanismos que conducen a una deficiencia de CoQ son aún desconocidos debido a la escasa información que tenemos sobre el metabolismo de CoQ y su vía de síntesis en humanos. En la práctica clínica suplementos con CoQ₁₀ en pacientes con deficiencia primaria mejoran las deficiencias de CoQ₁₀ en el tejido, pero en la secundaria se han obtenido

resultados contradictorios. Es posible que la respuesta clínica a la suplementación con CoQ se deba de alguna manera a los niveles de coenzima CoQ₁₀ en el músculo previos a la terapia. En roedores, se ha estudiado el efecto del suplemento de CoQ y potencialmente se observa que reduce el daño oxidativo provocado en el músculo por un ejercicio extenuante (Kon *et al.* 2007). Es más, en pacientes con fibromialgia se altera la homeostasis del CoQ, detectándose niveles elevados de CoQ₁₀ en el plasma, pero una bajada en el músculo y células mononucleares de la sangre. Estos resultados se asociarían con fallos en la distribución de CoQ₁₀ (Cordero *et al.* 2009).

Una de las funciones más conocidas del CoQ es la de potenciar la actividad mitocondrial relacionada con la síntesis de ATP, así como su papel inhibiendo la peroxidación lipídica generada por ROS (Kagan *et al.* 1990; Ernster and Dallner 1995; Forsmark-Andree *et al.* 1995; Lass and Sohal 1998). Dada la necesidad de mantener una homeostasis de CoQ adecuada en el músculo para mejorar su defensa antioxidante y que estudios de expresión en músculo gastrocnemio de roedores de laboratorio demuestran que la RC previene parcialmente la respuesta al estrés generado por el envejecimiento modificando el metabolismo, renovando las proteínas y reduciendo el daño macromolecular; nos planteamos estudiar el músculo gastrocnemio de roedores sanos y observamos que la RC induce cambios en la biosíntesis de Q así como en el contenido de Q en un tiempo relativamente corto.

Además, estos cambios son muy distintos en función de componente graso de la dieta. Mientras que en la dieta de aceite de pescado, no se aprecia una diferencia de CoQ en RC, en la dieta de grasa ternera disminuyen ambos homólogos en RC. Con la dieta de aceite de soja, tanto CoQ₉ como CoQ₁₀ aumentan en los animales sometidos a RC. La dieta estándar que se utiliza en los estudios de roedores se constituye normalmente con aceites vegetales. El ejercicio con RC aumenta los niveles de CoQ (Kamzalov and Sohal 2004), lo cual coincide con la subida de CoQ₉ y CoQ₁₀ observada en nuestro estudio para el caso de las muestras de músculo de animales alimentados en RC con dietas con aceite de soja. En cambio, nuestros resultados también demostraron un descenso muy significativo en RC para el caso de los animales alimentados con la dieta de grasa de ternera. Estas diferencias nos hacen cuestionarnos si verdaderamente la subida de CoQ bajo ejercicio físico en RC pudiera estar

influenciada por el contenido graso ingerido con la dieta. Un estudio interesante sería comparar el rendimiento físico con RC con dietas más o menos saturadas.

Una diferencia que también encontramos entre la dieta de aceite de soja y la de grasa de ternera es que, aunque el ratio $\text{CoQ}_9/\text{CoQ}_{10}$ no cambia entre AL y RC, si existe un aumento del cociente en la dieta de aceite de soja respecto a las otras dos dietas. Este efecto es debido a un aumento muy llamativo del CoQ_9 frente al CoQ_{10} en el caso de la dieta de aceite de soja. De alguna manera, el músculo necesita aumentar la relación $\text{CoQ}_9/\text{CoQ}_{10}$ ante una dieta más susceptible a la peroxidación lipídica. Sin embargo estos cambios no se repiten con la dieta de pescado también más poliinsaturada. Puede que este efecto esté más bien relacionado con algún componente específico del aceite utilizado que con el grado de insaturación.

Por otra parte, hemos comprobado cómo el aceite de pescado desciende los niveles de CoQ en distintos órganos, posiblemente para evitar reacciones prooxidantes. Según los resultados obtenidos por el Grupo de J. Ramsey (aún no publicados y que completan uno de los objetivos de investigación sujetos al Proyecto Principal al que este trabajo también pertenece), los ratones *fat-1* (que expresan el gen *fat-1* de *C.elegans* que convierte los ácidos grasos omega-6 en omega-3) generan menos especies reactivas en el complejo I de la mitocondria. Estos resultados podrían corresponderse con una adaptación metabólica a la mayor susceptibilidad a la oxidación de las membranas, y podría ir acompañado con una disminución del CoQ, bien porque no sea tan necesario al disminuir la generación endógena de ROS mitocondriales, o incluso para evitar reacciones prooxidantes en este nuevo entorno lipídico.

En este tejido no podemos obtener unos datos coherentes en la expresión de genes *COQ* que expliquen las diferencias en el contenido de CoQ bajo la RC. Sin embargo sí nos llama la atención que los niveles de proteína Coq3p aumentan significativamente en músculo de los animales alimentados con la dieta de grasa de ternera. Si recopilamos el efecto de la RC sobre los niveles de Coq3p en el resto de tejidos, podemos comprobar como ante un descenso muy significativo de CoQ por la RC esta enzima responde aumentando sus niveles proteicos, como ocurre en el riñón con la dieta de

aceite de pescado y de grasa de ternera. Existe la posibilidad de que la proteína Coq3p actúe como un sensor de los niveles de CoQ y responda aumentando su presencia. Así, podemos comprobar por ejemplo cómo cuando el contenido muscular de CoQ aumenta (en el caso de la dieta de aceite de soja), o cuando simplemente no se altera (en el caso de la dieta de aceite de pescado), los niveles de Coq3p no se modifican.

Esperamos encontrar una gran diferencia en los niveles de expresión entre ratones adultos y animales viejos, aunque la comparación de dietas y la RC a corto plazo ya muestran cambios significativos en los individuos jóvenes, al menos a nivel de CoQ, siendo estos cambios muy distintos según el componente graso de la dieta.

2.5. CORAZÓN

La RC a corto plazo no produce cambios significativos en el contenido de CoQ de las células cardíacas, pero sí observamos una tendencia en las dietas poliinsaturadas a disminuir los niveles de este antioxidante. Además, la relación de los homólogos CoQ₉ y CoQ₁₀ se ve afectada cuando la dieta contiene aceite de soja.

Aunque tanto el gastrocnemio como el corazón están compuestos por células musculares, su histología y fisiología son totalmente diferentes. De acuerdo con esto, en nuestro estudio las distintas intervenciones dietéticas produjeron un efecto distinto en cuanto al contenido de CoQ. En cambio, si comparamos los resultados obtenidos en corazón con aquellos observados para el riñón encontramos varias coincidencias llamativas. Por un lado, ambos órganos contienen los niveles de CoQ más elevados, y aunque en corazón no se hallen cambios significativos, si se aprecia que la RC tiende a reducir el contenido de Q (CoQ₉ y CoQ₁₀) en las dietas poliinsaturadas con aceite de soja y aceite de pescado, al igual que ocurre en riñón. Es posible que esta bajada se observe estadísticamente significativa tras un tiempo más prolongado de exposición a la RC, lo cual confirmaría nuestra hipótesis planteada anteriormente en el caso del hígado y del riñón.

De nuevo, un efecto llamativo que se repite a lo largo de nuestro estudio es el incremento de Coq3p cuando los niveles de CoQ disminuyen en condiciones de RC. Este efecto es particularmente evidente en riñón: los

niveles de Coq3p aumentaron con la dieta de pescado hasta 29 veces, a la vez que se observó una disminución de CoQ₉ y CoQ₁₀ con un valor $P < 0,001$. En el corazón, la proteína Coq3p aumentó 4 veces en RC respecto de la correspondiente situación AL y los niveles de coenzima Q (CoQ₉ y CoQ₁₀) disminuyeron bajo RC en la dieta de aceite de pescado. Que este efecto se manifieste en todos los casos donde la RC disminuye el contenido de coenzima Q (también se observa en el músculo con la dieta de ternera) nos reafirma la hipótesis planteada anteriormente sobre el papel de Coq3p como sensor de los niveles disminuidos de CoQ. Esta afirmación resulta razonable si tenemos en cuenta que la proteína Coq3p cataliza dos pasos de O-metilación en la ruta biosintética, uno de los cuales origina el producto final (Poon *et al.* 1999).

Cuando observamos la relación entre los dos homólogos, curiosamente encontramos una bajada significativa de la relación CoQ₉ / CoQ₁₀ en el corazón de los ratones sometidos a RC, lo cual se debe en este caso a que el CoQ₉ disminuye bajo RC más rápido que el CoQ₁₀. Por primera vez observamos que el CoQ₁₀ mantiene sus niveles en RC. Teniendo en cuenta que este estudio se está continuando con ratones de 8 y 20 meses, con el objetivo de determinar los efectos de la RC a largo plazo y el grado de insaturación en la homeostasis del coenzima Q endógeno y en la longevidad, cabría esperar que este resultado fuera un primer indicio de la respuesta del corazón para mantener sus defensas antioxidantes bajo RC en dietas con mayor susceptibilidad a la peroxidación, como es el caso de la dietas poliinsaturada de aceite de soja.

Los niveles de expresión de los genes COQ en corazón de los animales alimentados AL fueron significativamente mayores en la dieta de aceite de pescado frente a la dieta de aceite de soja y de grasa de ternera. Solo en alguno de los genes como en *mDLP1*, *mCOQ2* y *mCOQ7*, los niveles de la dieta de grasa de ternera alcanzaron los de aceite de pescado.

Para los distintos tejidos estudiados, hemos observado la influencia del tipo de ácido graso que compone la dieta sobre los niveles de expresión de genes COQ. El grado de insaturación del componente graso de la dieta de aceite de pescado, enriquecida con ácidos grasos omega-3, es significativamente superior no solo a la dieta más saturada (de grasa de ternera) sino también a la dieta de soja que es rica en ácidos poliinsaturados omega-6. Cabría esperar que el grado de insaturación de las dietas se

manifestara en el incremento de expresión de los genes *COQ* desde la dieta más saturada a la más insaturada, o al menos que ambas dietas poliinsaturadas se diferenciaron de los niveles observados en la más saturada. En cambio los niveles de expresión observados para la dieta de soja fueron muy variables.

Ante la necesidad de encontrar una dieta que aporte mayores beneficios para hacer frente al riesgo cardiovascular, la comunidad científica ha centrado sus investigaciones en discernir cual de los dos ácidos grasos poliinsaturados (omega-6 u omega-3) presenta mejores efectos en la salud. Ambos ácidos grasos son componentes esenciales en la dieta de mamíferos, pues carecemos de las enzimas desaturasas que insertan el doble enlace en las posiciones 6 y 3 en la cadena hidrocarbonada (Moyad 2005). Ambos ácidos grasos presentan también características protectoras frente al riesgo cardiovascular; sin embargo la distinta susceptibilidad a la peroxidación lipídica hace evidente que la posición del doble enlace determina su mayor o menor oxidación (Mesa *et al.* 2004).

Los numerosos cambios biológicos producidos en el corazón durante el envejecimiento reducen la capacidad celular a tolerar y adaptarse al estrés isquémico (Hansford 1983; Olivetti *et al.* 1991; Lakatta 1992; Walker *et al.* 1993; Lakatta 2003; Lakatta and Levy 2003b, 2003a). Uno de los factores que cambian con la edad es la relación n-3/n-6, que disminuye en las membranas mitocondriales, así como una reducción en los fosfolípidos mitocondriales y cardiolipina en el corazón de ratas (Demaison *et al.* 1994). La homeostasis del Ca^{+} también se ve alterada, la cadena de transporte de electrones se desequilibra y aparece una superproducción de ROS (por la incapacidad a eliminar el exceso) y productos tóxicos producidos por la peroxidación lipídica (Sohal *et al.* 1990; Papa and Skulachev 1997; Lucas and Szweda 1998; Jahangir *et al.* 2001; Droge 2002a, 2002b).

Una dieta rica en omega-3 incrementa el ratio n-3/n-6 en las membranas celulares y es considerada como una potente estrategia para atenuar los cambios asociados a la edad que se dan en las membranas (Okuyama *et al.* 2007). La importancia de mantener una determinada proporción en el ratio omega n-3/n6 para evitar los problemas cardiovasculares nos dan una idea de por qué en los genes de *COQ* no se producen los mismos cambios en las dietas de aceite de soja o de aceite de pescado con la RC.

Un tratamiento con ácidos grasos omega-3 de aceite de pescado en pocas semanas puede alterar los efectos de una dieta enriquecida con omega n-6 en ratones jóvenes y viejos, incrementando en la membrana cardiaca los niveles de omega-3 y recuperando la homeostasis del calcio y la eficiencia de consumo de O₂ (McLennan *et al.* 1989). Además, la susceptibilidad a la peroxidación de uno u otro ácido graso puede hacer que el balance de las defensas antioxidantes con la formación de ROS se altere, produciendo efectos distintos por una u otra dieta.

Las dietas de RC se han empleado en numerosos estudios con ratones sanos de distintas edades. En general los resultados demuestran que la RC podría retardar el envejecimiento del corazón induciendo una fuerte reprogramación a nivel transcripcional (Lee *et al.* 2002). Respecto a los genes de biosíntesis de CoQ, se observaron unos cambios que se mantuvieron en las tres dietas con la RC. Curiosamente, *mCOQ2* disminuyó su expresión en las dos dietas más insaturadas y esto coincidió con una bajada en los niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀. Esta enzima podría ser una diana de la RC en el metabolismo energético modulando la biosíntesis de CoQ en el corazón. Como se indicó anteriormente en el caso de riñón, unos niveles superiores de CoQ van acompañados de una elevada expresión de los transcritos de este gen. Además, deficiencias primarias de CoQ debidas a mutaciones en el gen *mCOQ2*, se manifiestan principalmente por desórdenes renales (Lopez *et al.* 2006).

Otro resultado llamativo, es la consistente disminución de los transcritos de *mCOQ8* en las tres dietas ante la RC. Recientes investigaciones (Lamperti *et al.* 2003; Lagier-Tourenne *et al.* 2008) han identificado mutaciones en el gen *mCOQ8* de humanos (ADCK3) de pacientes que cursan con deficiencias de CoQ, sugiriendo que este gen está implicado en la biosíntesis de CoQ. Este gen guarda homología funcional con *COQ8* en levaduras y *UbiB* en bacterias (Poon *et al.* 1997). En *C.elegans* una mutación en *COQ8* reduce al 7% los niveles de CoQ con respecto al tipo silvestre. En estas consiciones se produce además un desarrollo anómalo de las gónadas y de la hipodermis, mostrando los animales una reducida fertilidad y un acortamiento en la esperanza de vida. Estos defectos son recuperados con suplementos de CoQ exógeno (Asencio *et al.* 2009).

Debido a que el gen *ADCK* pertenece a una superfamilia de kinasas, y que los mutantes *coq8* de levaduras muestran una recuperación más lenta respecto de los mutantes *coq2* y *coq7* en los niveles de CoQ ante un suplemento de Q exógeno, se sugiere que este enzima juega un papel regulador en la síntesis de CoQ e incluso regulando otras vías adicionales. Puesto que CoQ tiene un papel determinante en la producción de ATP, se ha especulado que las ADCKs podrían regular la síntesis de CoQ a través de la fosforilación de sustratos (proteínas u otras moléculas no proteicas) como parte de un “bucle de retroalimentación” que controla los niveles de ATP producidos (Lagier-Tourenne *et al.* 2008). Además, todos los mutantes *coq* muestran una bajada en los niveles génicos del resto de genes COQ (*COQ3*, *COQ4*, *COQ6*, *COQ7* y *COQ9*) sugiriendo la existencia de un complejo multienzimático. Sin embargo, no se ha encontrado una relación con los niveles de *COQ8*, excluyéndolo de su participación en el complejo aunque este sí afecte a su estabilidad (Hsu *et al.* 2000; Hsieh *et al.* 2007).

De acuerdo con los resultados en *C.elegans* que apuntan a *ADCK3* como un gen esencial para el correcto desarrollo y esperanza de vida del organismo; y su supuesto papel regulador en la síntesis de CoQ, consideramos que la reducción consistente de los transcritos de *mCOQ8* observada en el corazón de los ratones alimentados con una dieta reducida en calorías (independiente del contenido graso) es una vía por la cual la RC podría ejercer sus efectos saludables regulando la biosíntesis de CoQ y por consiguiente el metabolismo energético.

1. ¿EXISTE RELACIÓN ENTRE LA DIETA, LA RELACIÓN *mSP1/mDLP1* Y LA LONGITUD DE LA CADENA DE ISOPRENOS?

Las variaciones observadas en las cantidades de CoQ y en la relación de $\text{CoQ}_9/\text{CoQ}_{10}$ dentro de los diferentes tejidos nos hizo plantearnos si estos cambios tenían un significado biológico (por ejemplo en cuanto a la necesidad de cada tejido a mantener más concentrado uno de los homólogos por sus

propiedades antioxidantes), y que particularmente se pudiera explicar con un alteración en los niveles de expresión de los dos genes (*mSPS1*, *mDLP1*) que configuran en mamíferos la enzima (Coq1p) responsable de determinar la longitud de la cola isoprenoide. Si además, las distintas intervenciones alteraban el contenido y biosíntesis de Q resultaba interesante estudiar la posible correlación entre ratios bajo estas manipulaciones no genéticas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en un estudio realizado en 2007 por el Grupo de R. Sohal se comprobó que la generación de superóxido era mayor en especies menos longevas que sintetizaban mayoritariamente CoQ₉ en vez de CoQ₁₀, aunque finalmente estas asociaciones no pudieron establecer una relación de causa-efecto (Sohal and Forster 2007).

A la inversa de lo que pudiera esperarse, no encontramos correlación alguna entre los ratios *mSPS1/mDLP1* y CoQ₉/CoQ₁₀. Sin embargo, sí se observaron cambios en cada uno de los ratios en respuesta a las distintas intervenciones, que además fueron dependientes de tejido.

Los cambios más significativos se produjeron en el riñón y en hígado. Nos llamó la atención que la relación *mSPS1/mDLP1* aumentara significativamente en el hígado y disminuyera significativamente en el riñón en las tres intervenciones dietéticas cuando los animales se encontraron bajo RC. Además, estos efectos se debieron a una bajada más pronunciada de los niveles de expresión de *mDLP1* en el hígado y a una subida de *mDLP1* en al menos la dieta de ternera y soja en riñón. En un estudio realizado por Saiki y colaboradores (Saiki *et al.* 2005) se comprobó que aunque ambos componentes de *COQ1* son necesarios para determinar la cadena lateral del CoQ, *mSPS1* (*hDPS1* en humanos) parece tener un efecto más decisivo. Nuestro estudio deja abierta una interesante investigación para estudiar los efectos de la variación de las concentraciones de *mSPS1* y *mDLP1* *in vivo* mediante manipulaciones genéticas, ya que según nuestros resultados intervenciones no genéticas sí modulan la expresión de los transcritos de estos genes de manera constante en el hígado y riñón, dos tejidos caracterizados por una mayor accesibilidad a los componentes de la dieta. Estas investigaciones podrían aproximarnos más al entendimiento de las enfermedades genéticas causadas por deficiencias de CoQ en humanos.

Discusión

Por otro lado, en el cerebro no se alteró la relación de *mSPS1/mDLP1* tras el consumo de una dieta hipocalórica o de dietas con un mayor o menor grado de instauración en sus ácidos grasos. De nuevo, confirmamos la necesidad de este tejido a mantener una homeostasis de CoQ equilibrada que asegure un buen funcionamiento del metabolismo energético de la mitocondria.

En resumen, en nuestro estudio hemos demostrado que la dieta produce una regulación de la biosíntesis de CoQ, aunque ésta es compleja desde el punto de vista molecular y también por la diversidad de respuesta entre tejidos. Es evidente que las distintas variaciones observadas en el contenido de CoQ y de la expresión de los genes de su biosíntesis, así como los niveles de algunas de las proteínas codificadas por ellos se presentan como un mecanismo por el cual la dieta ejerce sus efectos sobre el organismo. Estos cambios nos pueden ayudar a ampliar el conocimiento sobre el estado metabólico de los distintos órganos y tejidos y sobre los sitios de regulación de la vía de síntesis de CoQ, permitiéndonos evaluar la respuesta a la RC dependiente de tejido en un tiempo relativamente corto. Es muy interesante completar el estudio en ratones de 8 y 20 meses (como se describe en el Proyecto Principal), en los cuales se hayan manifestado de manera patente las alteraciones relacionadas con los procesos asociados al envejecimiento. De esta manera nos aproximamos a entender en qué momento de la vida y de qué manera cada uno de los órganos y tejidos comienzan a adaptar su metabolismo energético a la RC con las distintas intervenciones dietéticas, particularmente en lo concerniente a la homeostasis redox del coenzima Q, y paliar así los efectos asociados con la edad.

Conclusiones

- 1. La heterogénea distribución del coenzima Q se encuentra asociada a un perfil de expresión de los genes COQ, cuyos niveles de transcritos son mayores en aquellos órganos que contienen más coenzima Q.*
- 2. La dieta enriquecida con ácidos poliinsaturados omega-3 de pescado induce la expresión de los genes COQ en todos los tejidos.*
- 3. La restricción calórica a corto utiliza la vía de síntesis del coenzima Q para alterar el metabolismo energético, aunque la adaptación a nivel transcripcional es específica de tejido.*
- 4. La proteína Coq3p aumenta en aquellos tejidos donde la RC disminuye consistentemente el contenido de CoQ₉ y CoQ₁₀.*
- 5. El riñón es el órgano que más responde a la restricción calórica y al efecto añadido del componente graso de la dieta. En restricción calórica desciende el contenido de coenzima Q y las grasas más insaturadas acentúan este efecto. La expresión de los genes COQ muestra una tendencia general a disminuir en el riñón ante un entorno calórico reducido, predominantemente cuando la dieta se encuentra enriquecida con grasas más susceptibles de peroxidación.*
- 6. El sistema de coenzima Q (niveles totales y ratio de las dos isoformas) muestra una menor homogeneidad a nivel interindividual en órganos que presentan una mayor accesibilidad a los componentes de la dieta, como es el caso del hígado. En el extremo opuesto, la gran homogeneidad interindividual del cerebro en cuanto a las variaciones del contenido de coenzima Q y de la relación CoQ₉/CoQ₁₀, así como la falta de respuesta a la dieta, apoyan la necesidad de mantener un rango homeostático muy estrecho del sistema del coenzima Q.*
- 7. Los cambios provocados por la restricción calórica en la relación CoQ₉/CoQ₁₀ no se explican con el efecto que ejerce esta manipulación de la dieta sobre la expresión de los genes COQ1 (mSPS1, mDLP1), responsables de determinar la longitud de la cola isoprenoide.*

Bibliografía

- Aberg F, Appelkvist EL, Dallner G, Ernster L (1992) Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Archives of biochemistry and biophysics* 295(2): 230-234.
- Aberg F, Zhang Y, Teclebrhan H, Appelkvist EL, Dallner G (1996) Increases in tissue levels of ubiquinone in association with peroxisome proliferation. *Chemico-biological interactions* 99(1-3): 205-218.
- Adachi A, Shinjyo N, Fujita D, Miyoshi H, Amino H *et al.* (2003) Complementation of *Escherichia coli* ubiF mutation by *Caenorhabditis elegans* CLK-1, a product of the longevity gene of the nematode worm. *FEBS letters* 543(1-3): 174-178.
- Aithal HN, Joshi VC, Ramasarma T (1968) Effect of cold exposure on the metabolism of ubiquinone in the rat. *Biochimica et biophysica acta* 162(1): 66-72.
- Alam SS, Nambudiri AM, Rudney H (1975) J-Hydroxybenzoate: polyprenyl transferase and the prenylation of 4-aminobenzoate in mammalian tissues. *Archives of biochemistry and biophysics* 171(1): 183-190.
- Anderson RM, Weindruch R (2010) Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21(3): 134-141.
- Armeni T, Principato G, Quiles JL, Pieri C, Bompadre S *et al.* (2003) Mitochondrial dysfunctions during aging: vitamin E deficiency or caloric restriction--two different ways of modulating stress. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 35(2): 181-191.
- Asencio C, Rodriguez-Aguilera JC, Ruiz-Ferrer M, Vela J, Navas P (2003) Silencing of ubiquinone biosynthesis genes extends life span in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb J* 17(9): 1135-1137.
- Asencio C, Navas P, Cabello J, Schnabel R, Cypser JR *et al.* (2009) Coenzyme Q supports distinct developmental processes in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of ageing and development* 130(3): 145-153.
- Ashby MN, Edwards PA (1990) Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *The Journal of biological chemistry* 265(22): 13157-13164.
- Ashby MN, Kutsunai SY, Ackerman S, Tzagoloff A, Edwards PA (1992) COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 267(6): 4128-4136.
- Avelange-Macherel MH, Joyard J (1998) Cloning and functional expression of AtCOQ3, the Arabidopsis homologue of the yeast COQ3 gene, encoding a methyltransferase from plant mitochondria involved in ubiquinone biosynthesis. *Plant J* 14(2): 203-213.
- Baba SW, Belogrudov GI, Lee JC, Lee PT, Strahan J *et al.* (2004) Yeast Coq5 C-methyltransferase is required for stability of other polypeptides involved in coenzyme Q biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 279(11): 10052-10059.
- Bakewell L, Burdge GC, Calder PC (2006) Polyunsaturated fatty acid concentrations in young men and women consuming their habitual diets. *The British journal of nutrition* 96(1): 93-99.
- Barkovich RJ, Shtanko A, Shepherd JA, Lee PT, Myles DC *et al.* (1997) Characterization of the COQ5 gene from *Saccharomyces cerevisiae*.

- Evidence for a C-methyltransferase in ubiquinone biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 272(14): 9182-9188.
- Barros MH, Johnson A, Gin P, Marbois BN, Clarke CF *et al.* (2005) The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *The Journal of biological chemistry* 280(52): 42627-42635.
- Basselin M, Hunt SM, Abdala-Valencia H, Kaneshiro ES (2005) Ubiquinone synthesis in mitochondrial and microsomal subcellular fractions of *Pneumocystis* spp.: differential sensitivities to atovaquone. *Eukaryotic cell* 4(8): 1483-1492.
- Battino M, Quiles JL, Huertas JR, Ramirez-Tortosa MC, Cassinello M *et al.* (2002a) Feeding fried oil changes antioxidant and fatty acid pattern of rat and affects rat liver mitochondrial respiratory chain components. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 34(2): 127-134.
- Battino M, Ferreira MS, Littarru G, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC *et al.* (2002b) Structural damage induced by peroxidation may account for functional impairment of heavy synaptic mitochondria. *Free radical research* 36(4): 479-484.
- Belogrudov GI, Lee PT, Jonassen T, Hsu AY, Gin P *et al.* (2001) Yeast COQ4 encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* 392(1): 48-58.
- Bentinger M, Turunen M, Zhang XX, Wan YJ, Dallner G (2003) Involvement of retinoid X receptor alpha in coenzyme Q metabolism. *Journal of molecular biology* 326(3): 795-803.
- Berthold DA, Stenmark P (2003) Membrane-bound diiron carboxylate proteins. *Annual review of plant biology* 54: 497-517.
- Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME (2004) Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *American journal of physiology* 286(5): E852-861.
- Beyer RE (1962) The effect of ultraviolet light on mitochondria. VI. Inactivation and protection of mitochondrial adeno-sinetriphosphatases during far-ultraviolet irradiation. *Biochimica et biophysica acta* 65: 289-296.
- Beyer RE (1994) The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 26(4): 349-358.
- Beyer RE, Noble WM, Hirschfeld TJ (1962) Coenzyme Q (ubiquinone) levels of tissues of rats during acclimation to cold. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 40: 511-518.
- Beyer RE, Morales-Corral PG, Ramp BJ, Kreitman KR, Falzon MJ *et al.* (1984) Elevation of tissue coenzyme Q (ubiquinone) and cytochrome c concentrations by endurance exercise in the rat. *Archives of biochemistry and biophysics* 234(2): 323-329.
- Beyer RE, Burnett BA, Cartwright KJ, Edington DW, Falzon MJ *et al.* (1985) Tissue coenzyme Q (ubiquinone) and protein concentrations over the life span of the laboratory rat. *Mechanisms of ageing and development* 32(2-3): 267-281.
- Bhattacharya A, Lawrence RA, Krishnan A, Zaman K, Sun D *et al.* (2003) Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclophosphamide

- treated autoimmune-prone NZB/W female mice. *Journal of the American College of Nutrition* 22(5): 388-399.
- Boitier E, Degoul F, Desguerre I, Charpentier C, Francois D *et al.* (1998) A case of mitochondrial encephalomyopathy associated with a muscle coenzyme Q10 deficiency. *Journal of the neurological sciences* 156(1): 41-46.
- Bourre JM (2006) Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 2 : macronutrients. *The journal of nutrition, health & aging* 10(5): 386-399.
- Bousquet I, Dujardin G, Slonimski PP (1991) ABC1, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: it suppresses a cytochrome b mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the bc 1 complex. *The EMBO journal* 10(8): 2023-2031.
- Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical journal* 134(3): 707-716.
- Brand MD, Couture P, Hulbert AJ (1994) Liposomes from mammalian liver mitochondria are more polyunsaturated and leakier to protons than those from reptiles. *Comparative biochemistry and physiology* 108(2): 181-188.
- Brasseur G, Tron G, Dujardin G, Slonimski PP, Brivet-Chevillotte P (1997) The nuclear ABC1 gene is essential for the correct conformation and functioning of the cytochrome bc1 complex and the neighbouring complexes II and IV in the mitochondrial respiratory chain. *European journal of biochemistry / FEBS* 246(1): 103-111.
- Braun BS, Benbow U, Lloyd-Williams P, Bruce JM, Dutton PL (1986) Determination of partition coefficients of quinones by high-performance liquid chromatography. *Methods in enzymology* 125: 119-129.
- Brea-Calvo G, Rodriguez-Hernandez A, Fernandez-Ayala DJ, Navas P, Sanchez-Alcazar JA (2006) Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q10 levels in cancer cell lines. *Free radical biology & medicine* 40(8): 1293-1302.
- Brea-Calvo G, Siendones E, Sanchez-Alcazar JA, de Cabo R, Navas P (2009) Cell survival from chemotherapy depends on NF-kappaB transcriptional up-regulation of coenzyme Q biosynthesis. *PLoS one* 4(4): e5301.
- Brookes PS, Buckingham JA, Tenreiro AM, Hulbert AJ, Brand MD (1998) The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 119(2): 325-334.
- Cadenas E, Hochstein P, Ernster L (1992) Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 65: 97-146.
- Calder PC (2004) n-3 fatty acids, inflammation, and immunity--relevance to postsurgical and critically ill patients. *Lipids* 39(12): 1147-1161.
- Clarke CF, Williams W, Teruya JH (1991) Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and sequence of COQ3, the 3,4-dihydroxy-5-hexaprenylbenzoate methyltransferase gene. *The Journal of biological chemistry* 266(25): 16636-16644.

Bibliografia

- Connor WE (2000) Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *The American journal of clinical nutrition* 71(1 Suppl): 171S-175S.
- Cordero MD, Moreno-Fernandez AM, deMiguel M, Bonal P, Campa F *et al.* (2009) Coenzyme Q10 distribution in blood is altered in patients with fibromyalgia. *Clinical biochemistry* 42(7-8): 732-735.
- Cornell BA, Keniry MA, Post A, Robertson RN, Weir LE *et al.* (1987) Location and activity of ubiquinone 10 and ubiquinone analogues in model and biological membranes. *Biochemistry* 26(24): 7702-7707.
- Correll CC, Ng L, Edwards PA (1994) Identification of farnesol as the non-sterol derivative of mevalonic acid required for the accelerated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *The Journal of biological chemistry* 269(26): 17390-17393.
- Crane FL, Navas P (1997) The diversity of coenzyme Q function. *Molecular aspects of medicine* 18 Suppl: S1-6.
- Crane FL, Hatefi Y, Lester RL, Widmer C (1957) Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 25(1): 220-221.
- Crane FL, Sun IL, Crowe RA, Alcain FJ, Low H (1994) Coenzyme Q10, plasma membrane oxidase and growth control. *Molecular aspects of medicine* 15 Suppl: s1-11.
- Chalon S (2006) Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 75(4-5): 259-269.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews* 59(3): 527-605.
- Cheatham CL, Colombo J, Carlson SE (2006) N-3 fatty acids and cognitive and visual acuity development: methodologic and conceptual considerations. *The American journal of clinical nutrition* 83(6 Suppl): 1458S-1466S.
- Dallner G, Sindelar PJ (2000) Regulation of ubiquinone metabolism. *Free radical biology & medicine* 29(3-4): 285-294.
- De Cabo R, Cabello R, Rios M, Lopez-Lluch G, Ingram DK *et al.* (2004) Calorie restriction attenuates age-related alterations in the plasma membrane antioxidant system in rat liver. *Experimental gerontology* 39(3): 297-304.
- del Castillo-Olivares A, Nunez de Castro I, Medina MA (2000) Dual role of plasma membrane electron transport systems in defense. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 35(3): 197-220.
- Demaison L, Sergiel JP, Moreau D, Grynberg A (1994) Influence of the phospholipid n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on the mitochondrial oxidative metabolism before and after myocardial ischemia. *Biochimica et biophysica acta* 1227(1-2): 53-59.
- DePierre JW, Sohlenius AK, Cai Y, Eriksson AM, Andersson K *et al.* (1995) Peroxisome proliferation in response to xenobiotics. *Biochemical Society transactions* 23(2): 425-429.
- Di Giovanni S, Mirabella M, Spinazzola A, Crociani P, Silvestri G *et al.* (2001) Coenzyme Q10 reverses pathological phenotype and reduces apoptosis in familial CoQ10 deficiency. *Neurology* 57(3): 515-518.
- Dibrov E, Robinson KM, Lemire BD (1997) The COQ5 gene encodes a yeast mitochondrial protein necessary for ubiquinone biosynthesis and the assembly of the respiratory chain. *The Journal of biological chemistry* 272(14): 9175-9181.
- DiMauro S, Quinzii CM, Hirano M (2007) Mutations in coenzyme Q10 biosynthetic genes. *The Journal of clinical investigation* 117(3): 587-589.

- Do TQ, Hsu AY, Jonassen T, Lee PT, Clarke CF (2001) A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* abc1 mutants. *The Journal of biological chemistry* 276(21): 18161-18168.
- Droge W (2002a) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 82(1): 47-95.
- Droge W (2002b) Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Experimental gerontology* 37(12): 1333-1345.
- Echtay KS, Winkler E, Klingenberg M (2000) Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature* 408(6812): 609-613.
- Echtay KS, Winkler E, Frischmuth K, Klingenberg M (2001) Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(4): 1416-1421.
- Edlund C, Holmberg K, Dallner G, Norrby E, Kristensson K (1994) Ubiquinone-10 protects neurons from virus-induced degeneration. *Journal of neurochemistry* 63(2): 634-639.
- Eggink G, Engel H, Vriend G, Terpstra P, Witholt B (1990) Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *Journal of molecular biology* 212(1): 135-142.
- Elmberger PG, Kalen A, Lund E, Reihner E, Eriksson M *et al.* (1991) Effects of pravastatin and cholestyramine on products of the mevalonate pathway in familial hypercholesterolemia. *Journal of lipid research* 32(6): 935-940.
- Else PL, Wu BJ, Storlien LH, Hulbert AJ (2003) Molecular activity of Na⁺,K⁺-ATPase relates to the packing of membrane lipids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 986: 525-526.
- Eppink MH, Schreuder HA, Van Berkel WJ (1997) Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD(P)H binding. *Protein Sci* 6(11): 2454-2458.
- Ericsson J, Thelin A, Chojnacki T, Dallner G (1992) Substrate specificity of cis-prenyltransferase in rat liver microsomes. *The Journal of biological chemistry* 267(27): 19730-19735.
- Ernster L, Dallner G (1995) Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et biophysica acta* 1271(1): 195-204.
- Ewbank JJ, Barnes TM, Lakowski B, Lussier M, Bussey H *et al.* (1997) Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science (New York, NY)* 275(5302): 980-983.
- Faust JR, Brown MS, Goldstein JL (1980) Synthesis of delta 2-isopentenyl tRNA from mevalonate in cultured human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 255(14): 6546-6548.
- Fernandes G, Lawrence R, Sun D (2003) Protective role of n-3 lipids and soy protein in osteoporosis. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 68(6): 361-372.
- Fernandez-Ayala DJ, Brea-Calvo G, Lopez-Lluch G, Navas P (2005) Coenzyme Q distribution in HL-60 human cells depends on the endomembrane system. *Biochimica et biophysica acta* 1713(2): 129-137.

Bibliografia

- Festenstein GN, Heaton FW, Lowe JS, Morton RA (1955) A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids (λ max. 272 m μ). *The Biochemical journal* 59(4): 558-566.
- Fontaine E, Ichas F, Bernardi P (1998) A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of biological chemistry* 273(40): 25734-25740.
- Forsgren M, Attersand A, Lake S, Grunler J, Swiezewska E *et al.* (2004) Isolation and functional expression of human COQ2, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ. *The Biochemical journal* 382(Pt 2): 519-526.
- Forsmark-Andree P, Dallner G, Ernster L (1995) Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. *Free radical biology & medicine* 19(6): 749-757.
- Forsmark-Andree P, Lee CP, Dallner G, Ernster L (1997) Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles. *Free radical biology & medicine* 22(3): 391-400.
- Forsmark-Andree P, Persson B, Radi R, Dallner G, Ernster L (1996) Oxidative modification of nicotinamide nucleotide transhydrogenase in submitochondrial particles: effect of endogenous ubiquinol. *Archives of biochemistry and biophysics* 336(1): 113-120.
- Freemantle E, Vandal M, Tremblay-Mercier J, Tremblay S, Blachere JC *et al.* (2006) Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 75(3): 213-220.
- Frei B, Kim MC, Ames BN (1990) Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(12): 4879-4883.
- Frerman FE (1988) Acyl-CoA dehydrogenases, electron transfer flavoprotein and electron transfer flavoprotein dehydrogenase. *Biochemical Society transactions* 16(3): 416-418.
- Fry M, Green DE (1980) Cardiolipin requirement by cytochrome oxidase and the catalytic role of phospholipid. *Biochemical and biophysical research communications* 93(4): 1238-1246.
- Fry M, Green DE (1981) Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *The Journal of biological chemistry* 256(4): 1874-1880.
- Gancedo JM (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(2): 334-361.
- Ghirlanda G, Oradei A, Manto A, Lippa S, Uccioli L *et al.* (1993) Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study. *Journal of clinical pharmacology* 33(3): 226-229.
- Gillette-Guyonnet S, Vellas B (2008) Caloric restriction and brain function. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 11(6): 686-692.
- Gin P, Clarke CF (2005) Genetic evidence for a multi-subunit complex in coenzyme Q biosynthesis in yeast and the role of the Coq1 hexaprenyl

- diphosphate synthase. *The Journal of biological chemistry* 280(4): 2676-2681.
- Gin P, Hsu AY, Rothman SC, Jonassen T, Lee PT *et al.* (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* COQ6 gene encodes a mitochondrial flavin-dependent monooxygenase required for coenzyme Q biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 278(28): 25308-25316.
- Gironi M, Lamperti C, Nemni R, Moggio M, Comi G *et al.* (2004) Late-onset cerebellar ataxia with hypogonadism and muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 62(5): 818-820.
- Gohil K, Rothfuss L, Lang J, Packer L (1987) Effect of exercise training on tissue vitamin E and ubiquinone content. *J Appl Physiol* 63(4): 1638-1641.
- Gomez-Diaz C, Villalba JM, Perez-Vicente R, Crane FL, Navas P (1997) Ascorbate stabilization is stimulated in rho(0)HL-60 cells by CoQ10 increase at the plasma membrane. *Biochemical and biophysical research communications* 234(1): 79-81.
- Gonzalez-Aragon D, Buron MI, Lopez-Lluch G, Herman MD, Gomez-Diaz C *et al.* (2005) Coenzyme Q and the regulation of intracellular steady-state levels of superoxide in HL-60 cells. *BioFactors (Oxford, England)* 25(1-4): 31-41.
- Gordon PA, Stewart PR (1969) Ubiquinone formation in wild-type and petite yeast: the effect of catabolite repression. *Biochimica et biophysica acta* 177(2): 358-360.
- Green DE, Wharton DC (1963) Stoichiometry of the Fixed Oxidation-Reduction Components of the Electron Transfer Chain of Beef Heart Mitochondria. *Biochemische Zeitschrift* 338: 335-348.
- Groneberg DA, Kindermann B, Althammer M, Klapper M, Vormann J *et al.* (2005) Coenzyme Q10 affects expression of genes involved in cell signalling, metabolism and transport in human CaCo-2 cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37(6): 1208-1218.
- Grune T, Reinheckel T, Davies KJ (1997) Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *Faseb J* 11(7): 526-534.
- Grunler J, Ericsson J, Dallner G (1994) Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1212(3): 259-277.
- Hagerman RA, Willis RA (2002) The yeast gene COQ5 is differentially regulated by Mig1p, Rtg3p and Hap2p. *Biochimica et biophysica acta* 1578(1-3): 51-58.
- Hagerman RA, Trotter PJ, Willis RA (2002) The regulation of COQ5 gene expression by energy source. *Free radical research* 36(4): 485-490.
- Hagopian K, Harper ME, Ram JJ, Humble SJ, Weindruch R *et al.* (2005) Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria. *American journal of physiology* 288(4): E674-684.
- Haines TH (2001) Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Progress in lipid research* 40(4): 299-324.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal* 219(1): 1-14.
- Hansford RG (1983) Bioenergetics in aging. *Biochimica et biophysica acta* 726(1): 41-80.

Bibliografia

- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11(3): 298-300.
- Hartl FU, Pfanner N, Nicholson DW, Neupert W (1989) Mitochondrial protein import. *Biochimica et biophysica acta* 988(1): 1-45.
- Heilbronn LK, Ravussin E (2003) Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *The American journal of clinical nutrition* 78(3): 361-369.
- Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA (2003) Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics* 111(1): e39-44.
- Hendrick JP, Hodges PE, Rosenberg LE (1989) Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(11): 4056-4060.
- Hirano M, Quinzii CM, Dimauro S (2006) Restoring balance to ataxia with coenzyme Q10 deficiency. *Journal of the neurological sciences* 246(1-2): 11-12.
- Hoch FL (1992) Cardiolipins and biomembrane function. *Biochimica et biophysica acta* 1113(1): 71-133.
- Holmgren A, Bjornstedt M (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in enzymology* 252: 199-208.
- Hooper L, Thompson RL, Harrison RA, Summerbell CD, Ness AR *et al.* (2006) Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. *BMJ (Clinical research ed)* 332(7544): 752-760.
- Hsiang YH, Liu LF (1988) Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer research* 48(7): 1722-1726.
- Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *The Journal of biological chemistry* 260(27): 14873-14878.
- Hsieh EJ, Gin P, Gulmezian M, Tran UC, Saiki R *et al.* (2007) *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Archives of biochemistry and biophysics* 463(1): 19-26.
- Hsu AY, Do TQ, Lee PT, Clarke CF (2000) Genetic evidence for a multi-subunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta* 1484(2-3): 287-297.
- Hsu AY, Poon WW, Shepherd JA, Myles DC, Clarke CF (1996) Complementation of coq3 mutant yeast by mitochondrial targeting of the *Escherichia coli* UbiG polypeptide: evidence that UbiG catalyzes both O-methylation steps in ubiquinone biosynthesis. *Biochemistry* 35(30): 9797-9806.
- Huertas JR, Battino M, Lenaz G, Mataix FJ (1991a) Changes in mitochondrial and microsomal rat liver coenzyme Q9 and Q10 content induced by dietary fat and endogenous lipid peroxidation. *FEBS letters* 287(1-2): 89-92.

- Huertas JR, Battino M, Mataix FJ, Lenaz G (1991b) Cytochrome oxidase induction after oxidative stress induced by adriamycin in liver of rats fed with dietary olive oil. *Biochemical and biophysical research communications* 181(1): 375-382.
- Huertas JR, Mataix FJ, Manas M, Bargossi AM, Battino M (1994) Dietary polyunsaturated fatty acids and peroxidative risks in sport practice. *Alternatives. The Journal of sports medicine and physical fitness* 34(2): 101-108.
- Hulbert AJ (2003) Life, death and membrane bilayers. *The Journal of experimental biology* 206(Pt 14): 2303-2311.
- Hulbert AJ, Else PL (1999) Membranes as possible pacemakers of metabolism. *Journal of theoretical biology* 199(3): 257-274.
- Hulbert AJ, Else PL (2000) Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Annual review of physiology* 62: 207-235.
- Ikenoya S, Takada M, Yuzuriha T, Abe K, Katayama K (1981) Studies on reduced and oxidized ubiquinones. I. Simultaneous determination of reduced and oxidized ubiquinones in tissues and mitochondria by high performance liquid chromatography. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 29(1): 158-164.
- Innis SM (2005) Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta* 26 Suppl A: S70-75.
- Iuchi S, Lin EC (1991) Adaptation of *Escherichia coli* to respiratory conditions: regulation of gene expression. *Cell* 66(1): 5-7.
- Jahangir A, Ozcan C, Holmuhamedov EL, Terzic A (2001) Increased calcium vulnerability of senescent cardiac mitochondria: protective role for a mitochondrial potassium channel opener. *Mechanisms of ageing and development* 122(10): 1073-1086.
- James AM, Smith RA, Murphy MP (2004) Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Archives of biochemistry and biophysics* 423(1): 47-56.
- Jiang N, Levavasseur F, McCright B, Shoubridge EA, Hekimi S (2001) Mouse CLK-1 is imported into mitochondria by an unusual process that requires a leader sequence but no membrane potential. *The Journal of biological chemistry* 276(31): 29218-29225.
- Johnson A, Gin P, Marbois BN, Hsieh EJ, Wu M *et al.* (2005) COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 280(36): 31397-31404.
- Jonassen T, Larsen PL, Clarke CF (2001) A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived *Caenorhabditis elegans* clk-1 mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(2): 421-426.
- Jonassen T, Marbois BN, Kim L, Chin A, Xia YR *et al.* (1996) Isolation and sequencing of the rat Coq7 gene and the mapping of mouse Coq7 to chromosome 7. *Archives of biochemistry and biophysics* 330(2): 285-289.
- Jonassen T, Proft M, Randez-Gil F, Schultz JR, Marbois BN *et al.* (1998) Yeast Clk-1 homologue (Coq7/Cat5) is a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis. *The Journal of biological chemistry* 273(6): 3351-3357.
- Jonassen TaC, C. F. (2000) "Genetic Analysis of Coenzyme Q Biosynthesis." in *Coenzyme Q: From Molecular Mechanisms to Nutrition and Health*, (Eds.

Bibliografia

- Valerian E. Kagan and Peter J. Quinn) CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 185-208.
- Jones ME (1980) Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annual review of biochemistry* 49: 253-279.
- Jun L, Saiki R, Tatsumi K, Nakagawa T, Kawamukai M (2004) Identification and subcellular localization of two solanesyl diphosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology* 45(12): 1882-1888.
- Kagan RM, Clarke S (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Archives of biochemistry and biophysics* 310(2): 417-427.
- Kagan V, Serbinova E, Packer L (1990) Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochemical and biophysical research communications* 169(3): 851-857.
- Kalen A, Norling B, Appelkvist EL, Dallner G (1987) Ubiquinone biosynthesis by the microsomal fraction from rat liver. *Biochimica et biophysica acta* 926(1): 70-78.
- Kamzalov S, Sohal RS (2004) Effect of age and caloric restriction on coenzyme Q and alpha-tocopherol levels in the rat. *Experimental gerontology* 39(8): 1199-1205.
- Kaneko T, Tahara S, Matsuo M (1997) Retarding effect of dietary restriction on the accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in organs of Fischer 344 rats during aging. *Free radical biology & medicine* 23(1): 76-81.
- Katz JE, Dlakic M, Clarke S (2003) Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Mol Cell Proteomics* 2(8): 525-540.
- Kawamukai M (2002) Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *Journal of bioscience and bioengineering* 94(6): 511-517.
- Khorasanizadeh S, Rastinejad F (2001) Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends in biochemical sciences* 26(6): 384-390.
- Kim JD, Yu BP, McCarter RJ, Lee SY, Herlihy JT (1996) Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. *Free radical biology & medicine* 20(1): 83-88.
- Kon M, Kimura F, Akimoto T, Tanabe K, Murase Y *et al.* (2007) Effect of Coenzyme Q10 supplementation on exercise-induced muscular injury of rats. *Exercise immunology review* 13: 76-88.
- Koubova J, Guarente L (2003) How does calorie restriction work? *Genes & development* 17(3): 313-321.
- Kovacs WJ, Olivier LM, Krisans SK (2002) Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Progress in lipid research* 41(5): 369-391.
- Kristal BS, Yu BP (1992) An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. *Journal of gerontology* 47(4): B107-114.
- Laganiere S, Yu BP (1989) Effect of chronic food restriction in aging rats. I. Liver subcellular membranes. *Mechanisms of ageing and development* 48(3): 207-219.
- Laganiere S, Fernandes G (1991) Study on the lipid composition of aging Fischer-344 rat lymphoid cells: effect of long-term calorie restriction. *Lipids* 26(6): 472-478.

- Laganieri S, Yu BP (1993) Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction. *Gerontology* 39(1): 7-18.
- Lagier-Tourenne C, Tazir M, Lopez LC, Quinzii CM, Assoum M *et al.* (2008) ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *American journal of human genetics* 82(3): 661-672.
- Lakatta EG (1992) Functional implications of spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in the heart. *Cardiovascular research* 26(3): 193-214.
- Lakatta EG (2003) Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation* 107(3): 490-497.
- Lakatta EG, Levy D (2003a) Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation* 107(1): 139-146.
- Lakatta EG, Levy D (2003b) Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation* 107(2): 346-354.
- Lamperti C, Naini A, Hirano M, De Vivo DC, Bertini E *et al.* (2003) Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 60(7): 1206-1208.
- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A (2004) Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *The American journal of clinical nutrition* 79(6): 935-945.
- Lass A, Sohal RS (1998) Electron transport-linked ubiquinone-dependent recycling of alpha-tocopherol inhibits autooxidation of mitochondrial membranes. *Archives of biochemistry and biophysics* 352(2): 229-236.
- Lass A, Sohal RS (2000) Effect of coenzyme Q(10) and alpha-tocopherol content of mitochondria on the production of superoxide anion radicals. *Faseb J* 14(1): 87-94.
- Lass A, Agarwal S, Sohal RS (1997) Mitochondrial ubiquinone homologues, superoxide radical generation, and longevity in different mammalian species. *The Journal of biological chemistry* 272(31): 19199-19204.
- Lass A, Kwong L, Sohal RS (1999a) Mitochondrial coenzyme Q content and aging. *BioFactors* (Oxford, England) 9(2-4): 199-205.
- Lass A, Forster MJ, Sohal RS (1999b) Effects of coenzyme Q10 and alpha-tocopherol administration on their tissue levels in the mouse: elevation of mitochondrial alpha-tocopherol by coenzyme Q10. *Free radical biology & medicine* 26(11-12): 1375-1382.
- Lass A, Sohal BH, Weindruch R, Forster MJ, Sohal RS (1998) Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria. *Free radical biology & medicine* 25(9): 1089-1097.
- Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA (1999a) Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* (New York, NY) 285(5432): 1390-1393.
- Lee CK, Allison DB, Brand J, Weindruch R, Prolla TA (2002) Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(23): 14988-14993.

Bibliografía

- Lee CK, Pugh TD, Klopp RG, Edwards J, Allison DB *et al.* (2004) The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme Q10 and caloric restriction on life span and gene expression patterns in mice. *Free radical biology & medicine* 36(8): 1043-1057.
- Lee J, Yu BP, Herlihy JT (1999b) Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. *Free radical biology & medicine* 26(3-4): 260-265.
- Lee PT, Hsu AY, Ha HT, Clarke CF (1997) A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: isolation and identification of the *Escherichia coli* ubiE gene. *Journal of bacteriology* 179(5): 1748-1754.
- Leonard CJ, Aravind L, Koonin EV (1998) Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome research* 8(10): 1038-1047.
- Lester RL, Crane FL (1959) The natural occurrence of coenzyme Q and related compounds. *The Journal of biological chemistry* 234(8): 2169-2175.
- Leuenberger D, Bally NA, Schatz G, Koehler CM (1999) Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *The EMBO journal* 18(17): 4816-4822.
- Li R, Bianchet MA, Talalay P, Amzel LM (1995) The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(19): 8846-8850.
- Logan AC (2004) Omega-3 fatty acids and major depression: a primer for the mental health professional. *Lipids in health and disease* 3: 25.
- Lopez-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H *et al.* (2006) Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(6): 1768-1773.
- Lopez-Moratalla N, Segovia JL, Santiago E (1973) Specificity of association between linoleylcardiolipins and mitochondrial ATPase. *Revista española de fisiología* 29(4): 329-334.
- Lopez LC, Schuelke M, Quinzii CM, Kanki T, Rodenburg RJ *et al.* (2006) Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *American journal of human genetics* 79(6): 1125-1129.
- Lucas DT, Szweda LI (1998) Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(2): 510-514.
- Ludatscher R, Silbermann M, Gershon D, Reznick A (1983) The effects of enforced running on the gastrocnemius muscle in aging mice: an ultrastructural study. *Experimental gerontology* 18(2): 113-123.
- MacLean CH, Newberry SJ, Mojica WA, Khanna P, Issa AM *et al.* (2006) Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *Jama* 295(4): 403-415.
- MacLean CH, Mojica WA, Morton SC, Pencharz J, Hasenfeld Garland R *et al.* (2004) Effects of omega-3 fatty acids on lipids and glycemic control in type II diabetes and the metabolic syndrome and on inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, renal disease, systemic lupus

- erythematosus, and osteoporosis. Evidence report/technology assessment (Summary)(89): 1-4.
- Machida K, Tanaka T (1999) Farnesol-induced generation of reactive oxygen species dependent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by F(0)F(1)-ATPase in yeast. *FEBS letters* 462(1-2): 108-112.
- Machida K, Tanaka T, Yano Y, Otani S, Taniguchi M (1999) Farnesol-induced growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* by a cell cycle mechanism. *Microbiology (Reading, England)* 145 (Pt 2): 293-299.
- Marbois B, Gin P, Faull KF, Poon WW, Lee PT *et al.* (2005) Coq3 and Coq4 define a polypeptide complex in yeast mitochondria for the biosynthesis of coenzyme Q. *The Journal of biological chemistry* 280(21): 20231-20238.
- Marbois BN, Clarke CF (1996) The COQ7 gene encodes a protein in *saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 271(6): 2995-3004.
- Marbois BN, Hsu A, Pillai R, Colicelli J, Clarke CF (1994) Cloning of a rat cDNA encoding dihydroxypolyprenylbenzoate methyltransferase by functional complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in ubiquinone biosynthesis. *Gene* 138(1-2): 213-217.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY *et al.* (2005) CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic acids research* 33(Database issue): D192-196.
- Martin SF, Gomez-Diaz C, Navas P, Villalba JM (2002) Ubiquinol inhibition of neutral sphingomyelinase in liver plasma membrane: specific inhibition of the Mg(2+)-dependent enzyme and role of isoprenoid chain. *Biochemical and biophysical research communications* 297(3): 581-586.
- Martin SF, Navarro F, Forthoffer N, Navas P, Villalba JM (2001) Neutral magnesium-dependent sphingomyelinase from liver plasma membrane: purification and inhibition by ubiquinol. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 33(2): 143-153.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G *et al.* (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *The Journal of experimental medicine* 187(8): 1261-1271.
- Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Manas M (1998) Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free radical biology & medicine* 24(4): 511-521.
- Mataix J, Manas M, Quiles J, Battino M, Cassinello M *et al.* (1997) Coenzyme Q content depends upon oxidative stress and dietary fat unsaturation. *Molecular aspects of medicine* 18 Suppl: S129-135.
- Matsura T, Yamada K, Kawasaki T (1991) Changes in the content and intracellular distribution of coenzyme Q homologs in rabbit liver during growth. *Biochimica et biophysica acta* 1083(3): 277-282.
- May JM, Qu ZC (1999) Ascorbate-dependent electron transfer across the human erythrocyte membrane. *Biochimica et biophysica acta* 1421(1): 19-31.
- McLennan PL, Abeywardena MY, Charnock JS (1989) The influence of age and dietary fat in an animal model of sudden cardiac death. *Australian and New Zealand journal of medicine* 19(1): 1-5.

Bibliografía

- McNamara RK, Carlson SE (2006) Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 75(4-5): 329-349.
- Meganathan R (2001) Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS microbiology letters* 203(2): 131-139.
- Meganathan R, C NF (1996)) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ed Neidhardt F C (Am Soc Microbiol Washington, DC), 1, pp 642–656
- Menke T, Niklowitz P, Adam S, Weber M, Schluter B *et al.* (2000) Simultaneous detection of ubiquinol-10, ubiquinone-10, and tocopherols in human plasma microsamples and macrosamples as a marker of oxidative damage in neonates and infants. *Analytical biochemistry* 282(2): 209-217.
- Mesa MD, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P (2004) Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the oxidizability and thrombogenicity of low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 175(2): 333-343.
- Mitchell P (1975) Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS letters* 56(1): 1-6.
- Mollet J, Giurgea I, Schlemmer D, Dallner G, Chretien D *et al.* (2007) Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *The Journal of clinical investigation* 117(3): 765-772.
- Mollinedo F, Schneider DL (1984) Subcellular localization of cytochrome b and ubiquinone in a tertiary granule of resting human neutrophils and evidence for a proton pump ATPase. *The Journal of biological chemistry* 259(11): 7143-7150.
- Momose K, Rudney H (1972) 3-Polyprenyl-4-hydroxybenzoate synthesis in the inner membrane of mitochondria from p-hydroxybenzoate and isopentenylpyrophosphate. A demonstration of isoprenoid synthesis in rat liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 247(12): 3930-3940.
- Montero R, Pineda M, Aracil A, Vilaseca MA, Briones P *et al.* (2007) Clinical, biochemical and molecular aspects of cerebellar ataxia and Coenzyme Q10 deficiency. *Cerebellum* (London, England) 6(2): 118-122.
- Mori TA, Burke V, Puddey I, Irish A, Cowpland CA *et al.* (2009) The effects of [omega]3 fatty acids and coenzyme Q10 on blood pressure and heart rate in chronic kidney disease: a randomized controlled trial. *Journal of hypertension* 27(9): 1863-1872.
- Moyad MA (2005) An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention: part I. *Urologic oncology* 23(1): 28-35.
- Muskiet FA, Fokkema MR, Schaafsma A, Boersma ER, Crawford MA (2004) Is docosahexaenoic acid (DHA) essential? Lessons from DHA status regulation, our ancient diet, epidemiology and randomized controlled trials. *The Journal of nutrition* 134(1): 183-186.

- Musumeci O, Naini A, Slonim AE, Skavin N, Hadjigeorgiou GL *et al.* (2001) Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 56(7): 849-855.
- Nagy K, Pasti G, Bene L, Nagy I (1995) Involvement of Fenton reaction products in differentiation induction of K562 human leukemia cells. *Leukemia research* 19(3): 203-212.
- Nagy M, Lacroute F, Thomas D (1992) Divergent evolution of pyrimidine biosynthesis between anaerobic and aerobic yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(19): 8966-8970.
- Nakamura M, Hayashi T (1994) One- and two-electron reduction of quinones by rat liver subcellular fractions. *Journal of biochemistry* 115(6): 1141-1147.
- Nakamura MT, Nara TY (2003) Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 68(2): 145-150.
- Navarro F, Villalba JM, Crane FL, Mackellar WC, Navas P (1995) A phospholipid-dependent NADH-coenzyme Q reductase from liver plasma membrane. *Biochemical and biophysical research communications* 212(1): 138-143.
- Navarro F, Navas P, Burgess JR, Bello RI, De Cabo R *et al.* (1998) Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinone-dependent antioxidant system at the plasma membrane. *Faseb J* 12(15): 1665-1673.
- Navarro F, Arroyo A, Martin SF, Bello RI, de Cabo R *et al.* (1999) Protective role of ubiquinone in vitamin E and selenium-deficient plasma membranes. *BioFactors (Oxford, England)* 9(2-4): 163-170.
- Navas P, Manuel Villalba J (2004) Regulation of ceramide signaling by plasma membrane coenzyme Q reductases. *Methods in enzymology* 378: 200-206.
- Navas P, Fernandez-Ayala DM, Martin SF, Lopez-Lluch G, De Cabo R *et al.* (2002) Ceramide-dependent caspase 3 activation is prevented by coenzyme Q from plasma membrane in serum-deprived cells. *Free radical research* 36(4): 369-374.
- Nelson JF, Karelus K, Bergman MD, Felicio LS (1995) Neuroendocrine involvement in aging: evidence from studies of reproductive aging and caloric restriction. *Neurobiology of aging* 16(5): 837-843; discussion 855-836.
- Neupert W (1997) Protein import into mitochondria. *Annual review of biochemistry* 66: 863-917.
- Niewmierzycka A, Clarke S (1999) S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 274(2): 814-824.
- O'Donnell VB, Azzi A (1996) High rates of extracellular superoxide generation by cultured human fibroblasts: involvement of a lipid-metabolizing enzyme. *The Biochemical journal* 318 (Pt 3): 805-812.
- Ochoa-Herrera JJ, Huertas JR, Quiles JL, Mataix J (2001) Dietary oils high in oleic acid, but with different non-glyceride contents, have different effects on lipid profiles and peroxidation in rabbit hepatic mitochondria. *The Journal of nutritional biochemistry* 12(6): 357-364.

Bibliografía

- Ochoa JJ, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Mataix J, Huertas JR (2002) Dietary oils high in oleic acid but with different unsaponifiable fraction contents have different effects in fatty acid composition and peroxidation in rabbit LDL. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif 18(1): 60-65.
- Ogasahara S, Engel AG, Frens D, Mack D (1989) Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(7): 2379-2382.
- Ogura K, Koyama T (1998) Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chemical reviews* 98(4): 1263-1276.
- Ohara K, Yamamoto K, Hamamoto M, Sasaki K, Yazaki K (2006) Functional characterization of OsPPT1, which encodes p-hydroxybenzoate polyprenyltransferase involved in ubiquinone biosynthesis in *Oryza sativa*. *Plant & cell physiology* 47(5): 581-590.
- Okada K, Kamiya Y, Zhu X, Suzuki K, Tanaka K *et al.* (1997) Cloning of the *sdsA* gene encoding solanesyl diphosphate synthase from *Rhodobacter capsulatus* and its functional expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 179(19): 5992-5998.
- Okada K, Ohara K, Yazaki K, Nozaki K, Uchida N *et al.* (2004) The AtPPT1 gene encoding 4-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase in ubiquinone biosynthesis is required for embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* 55(4): 567-577.
- Okada K, Suzuki K, Kamiya Y, Zhu X, Fujisaki S *et al.* (1996) Polyprenyl diphosphate synthase essentially defines the length of the side chain of ubiquinone. *Biochimica et biophysica acta* 1302(3): 217-223.
- Oken E, Kleinman KP, Olsen SF, Rich-Edwards JW, Gillman MW (2004) Associations of seafood and elongated n-3 fatty acid intake with fetal growth and length of gestation: results from a US pregnancy cohort. *American journal of epidemiology* 160(8): 774-783.
- Oken E, Wright RO, Kleinman KP, Bellinger D, Amarasingiwardena CJ *et al.* (2005) Maternal fish consumption, hair mercury, and infant cognition in a U.S. Cohort. *Environmental health perspectives* 113(10): 1376-1380.
- Okuyama H, Yamada K, Miyazawa D, Yasui Y, Ohara N (2007) Dietary lipids impacts on healthy ageing. *Lipids* 42(9): 821-825.
- Olgun A, Akman S, Tezcan S, Kutluay T (2003) The effect of isoprenoid side chain length of ubiquinone on life span. *Medical hypotheses* 60(3): 325-327.
- Olivetti G, Melissari M, Capasso JM, Anversa P (1991) Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circulation research* 68(6): 1560-1568.
- Olson RE, Rudney H (1983) Biosynthesis of ubiquinone. *Vitamins and hormones* 40: 1-43.
- Ozawa T (1997) Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiological reviews* 77(2): 425-464.
- Padilla S, Tran UC, Jimenez-Hidalgo M, Lopez-Martin JM, Martin-Montalvo A *et al.* (2009) Hydroxylation of demethoxy-Q6 constitutes a control point in yeast coenzyme Q6 biosynthesis. *Cell Mol Life Sci* 66(1): 173-186.
- Padilla S, Jonassen T, Jimenez-Hidalgo MA, Fernandez-Ayala DJ, Lopez-Lluch G *et al.* (2004) Demethoxy-Q, an intermediate of coenzyme Q biosynthesis, fails to support respiration in *Saccharomyces cerevisiae*

- and lacks antioxidant activity. *The Journal of biological chemistry* 279(25): 25995-26004.
- Pamplona R, Barja G, Portero-Otin M (2002) Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? *Annals of the New York Academy of Sciences* 959: 475-490.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Requena JR, Thorpe SR, Herrero A *et al.* (1999a) A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mechanisms of ageing and development* 106(3): 283-296.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Ruiz C, Prat J *et al.* (1998) Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *Journal of lipid research* 39(10): 1989-1994.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Ledo F, Gredilla R *et al.* (1999b) Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the canary and the parakeet than in the mouse. *Aging (Milan, Italy)* 11(1): 44-49.
- Papa S, Skulachev VP (1997) Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Molecular and cellular biochemistry* 174(1-2): 305-319.
- Park SK, Prolla TA (2005) Lessons learned from gene expression profile studies of aging and caloric restriction. *Ageing research reviews* 4(1): 55-65.
- Pearl R (1928) *The rate of living*. New York: Knopf.
- Pennock JF (1983) The biosynthesis of chloroplastidic terpenoid quinones and chromanols. *Biochemical Society transactions* 11(5): 504-510.
- Pennock JF TD (1983) Biosynthesis of Ubiquinone and Related Compounds. In: Porter JW, Spurgeon SL, editors. *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. New York: John Wiley & Sons; . .
- Pommier Y (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature reviews* 6(10): 789-802.
- Poon *et al.* WWP, T.Q. Do, B.N. Marbois and C.F. Clarke, (1997) Sensitivity to treatment with polyunsaturated fatty acids is a general characteristic of the ubiquinone-deficient yeast coq mutants, *Mol. Aspects Med.* 18 (1997), pp. s121–s127.
- Poon WW, Marbois BN, Faull KF, Clarke CF (1995) 3-Hexaprenyl-4-hydroxybenzoic acid forms a predominant intermediate pool in ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of biochemistry and biophysics* 320(2): 305-314.
- Poon WW, Davis DE, Ha HT, Jonassen T, Rather PN *et al.* (2000) Identification of *Escherichia coli* ubiB, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis. *Journal of bacteriology* 182(18): 5139-5146.
- Poon WW, Barkovich RJ, Hsu AY, Frankel A, Lee PT *et al.* (1999) Yeast and rat Coq3 and *Escherichia coli* UbiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 274(31): 21665-21672.

Bibliografía

- Porter RK, Hulbert AJ, Brand MD (1996) Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *The American journal of physiology* 271(6 Pt 2): R1550-1560.
- Prescott SL, Calder PC (2004) N-3 polyunsaturated fatty acids and allergic disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 7(2): 123-129.
- Proft M, Kotter P, Hedges D, Bojunga N, Entian KD (1995) CAT5, a new gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 14(24): 6116-6126.
- Quiles JL, Huertas JR, Manas M, Ochoa JJ, Battino M *et al.* (2001) Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 33(2): 127-134.
- Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Ibanez S, Alfonso Gonzalez J, Duthie GG *et al.* (1999a) Vitamin E supplementation increases the stability and the in vivo antioxidant capacity of refined olive oil. *Free radical research* 31 Suppl: S129-135.
- Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Huertas JR, Ibanez S, Gomez JA *et al.* (1999b) Olive oil supplemented with vitamin E affects mitochondrial coenzyme Q levels in liver of rats after an oxidative stress induced by adriamycin. *BioFactors (Oxford, England)* 9(2-4): 331-336.
- Quiles JL, Huertas JR, Manas M, Battino M, Cassinello M *et al.* (1994) Peroxidative extent and coenzyme Q levels in the rat: influence of physical training and dietary fats. *Molecular aspects of medicine* 15 Suppl: s89-95.
- Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Ramirez-Tortosa MC, Cassinello M *et al.* (2002) The intake of fried virgin olive or sunflower oils differentially induces oxidative stress in rat liver microsomes. *The British journal of nutrition* 88(1): 57-65.
- Quinzii C, Naini A, Salviati L, Trevisson E, Navas P *et al.* (2006) A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *American journal of human genetics* 78(2): 345-349.
- Quinzii CM, DiMauro S, Hirano M (2007) Human coenzyme Q10 deficiency. *Neurochemical research* 32(4-5): 723-727.
- Quinzii CM, Lopez LC, Von-Moltke J, Naini A, Krishna S *et al.* (2008) Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *Faseb J* 22(6): 1874-1885.
- Rahman S, Hargreaves I, Clayton P, Heales S (2001) Neonatal presentation of coenzyme Q10 deficiency. *The Journal of pediatrics* 139(3): 456-458.
- Ramirez-Tortosa C, Lopez-Pedrosa JM, Suarez A, Ros E, Mataix J *et al.* (1999) Olive oil- and fish oil-enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. *The British journal of nutrition* 82(1): 31-39.
- Ramsey JJ, Harper ME, Weindruch R (2000) Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging. *Free radical biology & medicine* 29(10): 946-968.
- Rastinejad F (2001) Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Current opinion in structural biology* 11(1): 33-38.

- Rattan SI (2008) Hormesis in aging. *Ageing research reviews* 7(1): 63-78.
- Reddy JK, Chu R (1996) Peroxisome proliferator-induced pleiotropic responses: pursuit of a phenomenon. *Annals of the New York Academy of Sciences* 804: 176-201.
- Reiss Y, Brown MS, Goldstein JL (1992) Divalent cation and prenyl pyrophosphate specificities of the protein farnesyltransferase from rat brain, a zinc metalloenzyme. *The Journal of biological chemistry* 267(9): 6403-6408.
- Rennie KL, Hughes J, Lang R, Jebb SA (2003) Nutritional management of rheumatoid arthritis: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet* 16(2): 97-109.
- Robinson NC, Zborowski J, Talbert LH (1990) Cardiolipin-depleted bovine heart cytochrome c oxidase: binding stoichiometry and affinity for cardiolipin derivatives. *Biochemistry* 29(38): 8962-8969.
- Roche HM (1999) Unsaturated fatty acids. *The Proceedings of the Nutrition Society* 58(2): 397-401.
- Rodel G (1986) Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated COB leader. *Current genetics* 11(1): 41-45.
- Rodriguez-Aguilera JC, Gavilan A, Asencio C, Navas P (2005) The role of ubiquinone in *Caenorhabditis elegans* longevity. *Ageing research reviews* 4(1): 41-53.
- Rolfe DF, Brown GC (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological reviews* 77(3): 731-758.
- Rompala RE, Johnson DE, Rumpler WV, Phetteplace HW, Parker CF (1987) Level of alimentation and line of breeding on oxygen uptake by ovine jejunal mucosa. *The American journal of physiology* 252(2 Pt 2): R398-401.
- Rotig A, Appelkvist EL, Geromel V, Chretien D, Kadhom N *et al.* (2000) Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet* 356(9227): 391-395.
- Rousseau G, Varin F (1998) Determination of ubiquinone-9 and 10 levels in rat tissues and blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of chromatographic science* 36(5): 247-252.
- Sacconi S, Trevisson E, Salviati L, Ayme S, Rigal O *et al.* (2009) Coenzyme Q10 is frequently reduced in muscle of patients with mitochondrial myopathy. *Neuromuscul Disord* 20(1): 44-48.
- Sacks FM, Campos H (2006) Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and cardiovascular disease: time to widen our view of the mechanisms. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91(2): 398-400.
- Saiki R, Nagata A, Kainou T, Matsuda H, Kawamukai M (2005) Characterization of solanesyl and decaprenyl diphosphate synthases in mice and humans. *The FEBS journal* 272(21): 5606-5622.
- Saiki R, Nagata A, Uchida N, Kainou T, Matsuda H *et al.* (2003) Fission yeast decaprenyl diphosphate synthase consists of Dps1 and the newly characterized Dlp1 protein in a novel heterotetrameric structure. *European journal of biochemistry / FEBS* 270(20): 4113-4121.
- Saiki R, Lunceford AL, Shi Y, Marbois B, King R *et al.* (2008) Coenzyme Q10 supplementation rescues renal disease in *Pdss2kd/kd* mice with

Bibliografia

- mutations in prenyl diphosphate synthase subunit 2. *Am J Physiol Renal Physiol* 295(5): F1535-1544.
- Saito Y, Fukuhara A, Nishio K, Hayakawa M, Ogawa Y *et al.* (2009) Characterization of cellular uptake and distribution of coenzyme Q10 and vitamin E in PC12 cells. *The Journal of nutritional biochemistry* 20(5): 350-357.
- Salviati L, Sacconi S, Murer L, Zacchello G, Franceschini L *et al.* (2005) Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ10 deficiency: a CoQ10-responsive condition. *Neurology* 65(4): 606-608.
- SanGiovanni JP, Chew EY (2005) The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Progress in retinal and eye research* 24(1): 87-138.
- Santos-Ocana C, Cordoba F, Crane FL, Clarke CF, Navas P (1998a) Coenzyme Q6 and iron reduction are responsible for the extracellular ascorbate stabilization at the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 273(14): 8099-8105.
- Santos-Ocana C, Villalba JM, Cordoba F, Padilla S, Crane FL *et al.* (1998b) Genetic evidence for coenzyme Q requirement in plasma membrane electron transport. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 30(5): 465-475.
- Schick BA, Laaksonen R, Frohlich JJ, Paiva H, Lehtimaki T *et al.* (2007) Decreased skeletal muscle mitochondrial DNA in patients treated with high-dose simvastatin. *Clinical pharmacology and therapeutics* 81(5): 650-653.
- Segal AW, Abo A (1993) The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends in biochemical sciences* 18(2): 43-47.
- Sippel CJ, Goewert RR, Slachman FN, Olson RE (1983) The regulation of ubiquinone-6 biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 258(2): 1057-1061.
- Skulachev VP (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta* 1363(2): 100-124.
- Smit EN, Muskiet FA, Boersma ER (2004) The possible role of essential fatty acids in the pathophysiology of malnutrition: a review. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 71(4): 241-250.
- Smith BK, Sun GY, Donahue OM, Thomas TR (2004) Exercise plus n-3 fatty acids: additive effect on postprandial lipemia. *Metabolism: clinical and experimental* 53(10): 1365-1371.
- Sobreira C, Hirano M, Shanske S, Keller RK, Haller RG *et al.* (1997) Mitochondrial encephalomyopathy with coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 48(5): 1238-1243.
- Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science (New York, NY)* 273(5271): 59-63.
- Sohal RS, Forster MJ (2007) Coenzyme Q, oxidative stress and aging. *Mitochondrion* 7 Suppl: S103-111.
- Sohal RS, Arnold LA, Sohal BH (1990) Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free radical biology & medicine* 9(6): 495-500.
- Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H (1994a) Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging

- and in response to food restriction in the mouse. *Mechanisms of ageing and development* 74(1-2): 121-133.
- Sohal RS, Agarwal S, Candas M, Forster MJ, Lal H (1994b) Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mechanisms of ageing and development* 76(2-3): 215-224.
- Sohal RS, Kamzalov S, Sumien N, Ferguson M, Rebrin I *et al.* (2006) Effect of coenzyme Q10 intake on endogenous coenzyme Q content, mitochondrial electron transport chain, antioxidative defenses, and life span of mice. *Free radical biology & medicine* 40(3): 480-487.
- Sohlenius-Sternbeck AK, Appelkvist EL, DePierre JW (2000) Effects of vitamin A deficiency on selected xenobiotic-metabolizing enzymes and defenses against oxidative stress in mouse liver. *Biochemical pharmacology* 59(4): 377-383.
- Stadtman ER (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free radical biology & medicine* 9(4): 315-325.
- Stadtman ER, Berlett BS (1991) Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *The Journal of biological chemistry* 266(26): 17201-17211.
- Stenmark P, Grunler J, Mattsson J, Sindelar PJ, Nordlund P *et al.* (2001) A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 276(36): 33297-33300.
- Stessl M, Noe CR, Lachmann B (2009) Influence of image-analysis software on quantitation of two-dimensional gel electrophoresis data. *Electrophoresis* 30(2): 325-328.
- Stocker R, Bowry VW, Frei B (1991) Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(5): 1646-1650.
- Sun IL, Sun EE, Crane FL, Morre DJ, Lindgren A *et al.* (1992) Requirement for coenzyme Q in plasma membrane electron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(23): 11126-11130.
- Svensson M, Malm C, Tonkonogi M, Ekblom B, Sjodin B *et al.* (1999) Effect of Q10 supplementation on tissue Q10 levels and adenine nucleotide catabolism during high-intensity exercise. *International journal of sport nutrition* 9(2): 166-180.
- Tacconi MT, Lligona L, Salmons M, Pitsikas N, Algeri S (1991) Aging and food restriction: effect on lipids of cerebral cortex. *Neurobiology of aging* 12(1): 55-59.
- Takahashi T, Okamoto T, Mori K, Sayo H, Kishi T (1993) Distribution of ubiquinone and ubiquinol homologues in rat tissues and subcellular fractions. *Lipids* 28(9): 803-809.
- Tarim O, Chasalow FI, Murphy J, Rising R, Carrillo A *et al.* (1997) Evaluation of differential effects of carbohydrate and fat intake on weight gain, serum IGF-1 and erythrocyte Na⁺K⁺ATPase activity in suboptimal nutrition in rats. *Journal of the American College of Nutrition* 16(2): 159-165.
- Tauche A, Krause-Buchholz U, Rodel G (2008) Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the molecular organization of O-methylase

Bibliografia

- Coq3p depends on Abc1p/Coq8p. *FEMS yeast research* 8(8): 1263-1275.
- Teclebrhan H, Olsson J, Swiezewska E, Dallner G (1993) Biosynthesis of the side chain of ubiquinone:trans-prenyltransferase in rat liver microsomes. *The Journal of biological chemistry* 268(31): 23081-23086.
- Teclebrhan H, Jakobsson-Borin A, Brunk U, Dallner G (1995) Relationship between the endoplasmic reticulum-Golgi membrane system and ubiquinone biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta* 1256(2): 157-165.
- Tekle M, Bentinger M, Nordman T, Appelkvist EL, Chojnacki T *et al.* (2002) Ubiquinone biosynthesis in rat liver peroxisomes. *Biochemical and biophysical research communications* 291(5): 1128-1133.
- Thomas SR, Neuzil J, Stocker R (1996) Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of alpha-tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 16(5): 687-696.
- Tillman JB, Dhahbi JM, Mote PL, Walford RL, Spindler SR (1996) Dietary calorie restriction in mice induces carbamyl phosphate synthetase I gene transcription tissue specifically. *The Journal of biological chemistry* 271(7): 3500-3506.
- Tomasetti M, Littarru GP, Stocker R, Alleva R (1999) Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free radical biology & medicine* 27(9-10): 1027-1032.
- Tomasetti M, Alleva R, Borghi B, Collins AR (2001) In vivo supplementation with coenzyme Q10 enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage. *Faseb J* 15(8): 1425-1427.
- Tran UC, Marbois B, Gin P, Gulmezian M, Jonassen T *et al.* (2006) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* coq7 mutants by mitochondrial targeting of the *Escherichia coli* UbiF polypeptide: two functions of yeast Coq7 polypeptide in coenzyme Q biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 281(24): 16401-16409.
- Trumpower BL (1990) The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. *The Journal of biological chemistry* 265(20): 11409-11412.
- Turner N, Else PL, Hulbert AJ (2003) Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: implications for disease states and metabolism. *Die Naturwissenschaften* 90(11): 521-523.
- Turunen M, Dallner G (1998) Elevation of ubiquinone content by peroxisomal inducers in rat liver during aging. *Chemico-biological interactions* 116(1-2): 79-91.
- Turunen M, Olsson J, Dallner G (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et biophysica acta* 1660(1-2): 171-199.
- Turunen M, Peters JM, Gonzalez FJ, Schedin S, Dallner G (2000) Influence of peroxisome proliferator-activated receptor alpha on ubiquinone biosynthesis. *Journal of molecular biology* 297(3): 607-614.
- Tzagoloff A, Dieckmann CL (1990) PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* 54(3): 211-225.
- Tzagoloff A, Akai A, Needleman RB (1975a) Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of nuclear mutants of

- Saccharomyces cerevisiae* with defects in mitochondrial ATPase and respiratory enzymes. *The Journal of biological chemistry* 250(20): 8228-8235.
- Tzagoloff A, Akai A, Needleman RB, Zulch G (1975b) Assembly of the mitochondrial membrane system. Cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with lesions in enzymes of the respiratory chain and in the mitochondrial ATPase. *The Journal of biological chemistry* 250(20): 8236-8242.
- Uchida N, Suzuki K, Saiki R, Kainou T, Tanaka K *et al.* (2000) Phenotypes of fission yeast defective in ubiquinone production due to disruption of the gene for p-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase. *Journal of bacteriology* 182(24): 6933-6939.
- Ullrich O, Reinheckel T, Sitte N, Hass R, Grune T *et al.* (1999) Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(11): 6223-6228.
- Vajo Z, King LM, Jonassen T, Wilkin DJ, Ho N *et al.* (1999) Conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1* from yeast to human: a gene required for ubiquinone biosynthesis with potential implications for aging. *Mamm Genome* 10(10): 1000-1004.
- Van Maldergem L, Trijbels F, DiMauro S, Sindelar PJ, Musumeci O *et al.* (2002) Coenzyme Q-responsive Leigh's encephalopathy in two sisters. *Annals of neurology* 52(6): 750-754.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N *et al.* (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3(7): RESEARCH0034.
- Venkatraman J, Fernandes G (1992) Modulation of age-related alterations in membrane composition and receptor-associated immune functions by food restriction in Fischer 344 rats. *Mechanisms of ageing and development* 63(1): 27-44.
- Vidgren *et al.* JV, M. Ovaska, J. Tenhunen, C. Tilgmann, T. Lotta and P.T. Mannisto In: X. Cheng and R.M. Blumenthal, Editors, (1999) S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases: Structures and Functions, World Scientific Publishing, River Edge, NJ
- Villalba J, G. López-Lluch, C. Santos-Ocaña, J. Rodríguez-Aguilera and P. Navas, (2000) Extramitochondrial functions of coenzyme Q. In: V.E. Kagan and P.J. Quinn, Editors, Coenzyme Q: Molecular Mechanisms in Health and Disease, CRC Press, Boca Raton, USA (), pp. 83–98.
- Villalba JM, Parrado C, Santos-Gonzalez M, Alcain FJ (2010) Therapeutic use of coenzyme Q(10) and coenzyme Q(10)-related compounds and formulations. *Expert opinion on investigational drugs* 19(4): 535-554.
- Villalba JM, Navarro F, Cordoba F, Serrano A, Arroyo A *et al.* (1995) Coenzyme Q reductase from liver plasma membrane: purification and role in transplasma-membrane electron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(11): 4887-4891.
- Villalba JM AA, Navarro F, Rodríguez-Aguilera JC, Navas P: (2001.) Insights in cellular protection against oxidative stress: The necessity for extramitochondrial coenzyme Q. In: Mitochondrial Ubiquinone

Bibliografia

- (Coenzyme Q10): Biochemical, Functional, Medical, and Therapeutic Aspects in Human Health and Diseases Vol 2 (Eds. Ebadi M, Marwah J, Chopra RK). Prominent Press, Scottsdale, AZ, 89-120, .
- Vincent AM, Olzmann JA, Brownlee M, Sivitz WI, Russell JW (2004) Uncoupling proteins prevent glucose-induced neuronal oxidative stress and programmed cell death. *Diabetes* 53(3): 726-734.
- Walford RL, Spindler SR (1997) The response to calorie restriction in mammals shows features also common to hibernation: a cross-adaptation hypothesis. *The journals of gerontology* 52(4): B179-183.
- Walker KE, Lakatta EG, Houser SR (1993) Age associated changes in membrane currents in rat ventricular myocytes. *Cardiovascular research* 27(11): 1968-1977.
- Walter L, Miyoshi H, Leverage X, Bernard P, Fontaine E (2002) Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by ubiquinone analogs. A progress report. *Free radical research* 36(4): 405-412.
- Wang KC, Ohnuma S (2000) Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochimica et biophysica acta* 1529(1-3): 33-48.
- Warncke K, Gunner MR, Braun BS, Gu L, Yu CA *et al.* (1994) Influence of hydrocarbon tail structure on quinone binding and electron-transfer performance at the QA and QB sites of the photosynthetic reaction center protein. *Biochemistry* 33(25): 7830-7841.
- Weindruch R, Sohal RS (1997) Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *The New England journal of medicine* 337(14): 986-994.
- Weindruch R, Naylor PH, Goldstein AL, Walford RL (1988) Influences of aging and dietary restriction on serum thymosin alpha 1 levels in mice. *Journal of gerontology* 43(2): B40-42.
- Weindruch R, Kayo T, Lee CK, Prolla TA (2001) Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *The Journal of nutrition* 131(3): 918S-923S.
- Weindruch R, Kayo T, Lee CK, Prolla TA (2002) Gene expression profiling of aging using DNA microarrays. *Mechanisms of ageing and development* 123(2-3): 177-193.
- Wierenga RK, Terpstra P, Hol WG (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *Journal of molecular biology* 187(1): 101-107.
- Willis RA, Folkers K, Tucker JL, Ye CQ, Xia LJ *et al.* (1990) Lovastatin decreases coenzyme Q levels in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(22): 8928-8930.
- Wolf DE, C.H. Hoffman, N.R. Trenner, B.H. Arison, C.H. Shunk, B.O. Linn, J.F. McPherson and K. Folkers, Coenzyme Q. Structure studies on the coenzyme Q group, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (), pp. 4750–4752. (1958) Coenzyme Q. Structure studies on the coenzyme Q group, .
- Wood RD (1996) DNA repair in eukaryotes. *Annual review of biochemistry* 65: 135-167.
- Wood ZA, Poole LB, Karplus PA (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science (New York, NY)* 300(5619): 650-653.

- Wu BJ, Else PL, Storlien LH, Hulbert AJ (2001) Molecular activity of Na(+)/K(+)-ATPase from different sources is related to the packing of membrane lipids. *The Journal of experimental biology* 204(Pt 24): 4271-4280.
- Xia E, Rao G, Van Remmen H, Heydari AR, Richardson A (1995) Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *The Journal of nutrition* 125(2): 195-201.
- Yoshida S, Yasuda A, Kawazato H, Sakai K, Shimada T *et al.* (1997) Synaptic vesicle ultrastructural changes in the rat hippocampus induced by a combination of alpha-linolenate deficiency and a learning task. *Journal of neurochemistry* 68(3): 1261-1268.
- Yu BP, Lim BO, Sugano M (2002) Dietary restriction downregulates free radical and lipid peroxide production: plausible mechanism for elongation of life span. *Journal of nutritional science and vitaminology* 48(4): 257-264.
- Zahn JM, Poosala S, Owen AB, Ingram DK, Lustig A *et al.* (2007) AGEMAP: a gene expression database for aging in mice. *PLoS genetics* 3(11): e201.
- Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O *et al.* (2001) Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105(6): 745-755.
- Zhang Y, Appelkvist EL, Kristensson K, Dallner G (1996) The lipid compositions of different regions of rat brain during development and aging. *Neurobiology of aging* 17(6): 869-875.

Anexos

ANEXO I: Soluciones utilizadas en la metodología

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
1. Tampón E	Tris-Cl, 10 mM pH 7.5 EDTA 1 mM
2. Tampón RIPA	Tris-HCl 50 mM, pH 8 NaCl 150 mM Deoxicolato 0'5 % SDS 0'1 % DTT 1 mM Tritón X-100 1 % 20 µg/µl de cada uno de los inhibidores de proteasas: quimostatina, leupeptina, antipaina y pepstatina A (CLAP) PMSF 100 mM
3. Tampón de carga (5X)	Tris-HCl 0'3 M, pH 6'8, Sacarosa 50% (Panreac) EDTA 2 mM SDS 7'5 % Ditiotreitol 0'1 M Azul de bromofenol 0'5 mg/ml
4. Gel concentrador	4% de acrilamida/bisacrilamida (BioRad) Tris-HCl 375 mM, pH=6,8 SDS 0'1% (peso/volumen) (Sigma) TEMED 0'1% (volumen/volumen) (BioRad) Persulfato amónico 0'1% (peso/volumen) (Panreac)
5. Gel separador	Acrilamida/bisacrilamida 10 a 12% de (BioRad) Tris-HCl 375 mM, pH=6,8 SDS 0'1% (peso/volumen) (Sigma) TEMED 0'1% (volumen/volumen) (BioRad) Persulfato amónico 0'1% (peso/volumen) (Panreac)
6. Tampón de electrodos (5X)	Tris 0'1 M Glicina 0'96 M SDS 0'5 %
7. Tampón de transferencia	Glicina 14'4 g/l Tris 25 mM SDS 0'02 % (peso/volumen) (Sigma) Metanol 20 % (volumen/volumen)
8. Rojo Ponceau's	El colorante Ponceau's (Analema) se preparó a una concentración del 0'1 % en 1 % de ácido acético.
9. Solución de desteñido	Una dilución de ácido acético al 1 % en H ₂ O se usó para eliminar el exceso de colorante (Ponceau's)
10. Tampón TTBSL	Tris-HCl 50mM, pH 7'6, NaCl 0'85 % (Panreac) Tween 20 0'05 % (Merck) Leche descremada en polvo 5 % (Bio-Rad Laboratories)
11. Tampón TTBS	Tris-HCl 50 mM, pH 7'6 NaCl 0'85 % Tween 20 0'05 %
12. Tampón TBS	Tris-HCl 50 mM, pH 7'6 NaCl 0'85 %

ANEXO II: Análisis post hoc del contenido de CoQ₉, CoQ₁₀ y ratio CoQ₉/CoQ₁₀

Post Hoc en CoQ₉

Tukey HSD test; variable hígado Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00779, df = 88,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,23488	,25065	,28015	,25916	,18235	,20181
1	ternera	al		0,995311	0,669903	0,969141	0,514815	0,906889
2	ternera	rc	0,995311		0,933548	0,999826	0,253664	0,676663
3	soja	al	0,669903	0,933548		0,985667	0,027575	0,175880
4	soja	rc	0,969141	0,999826	0,985667		0,160429	0,526073
5	pescado	al	0,514815	0,253664	0,027575	0,160429		0,991498
6	pescado	rc	0,906889	0,676663	0,175880	0,526073	0,991498	

Duncan test; variable riñón (3 dietas graficos hplc statbb) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,12932, df = 83,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			1,1599	1,4777	1,0053	1,0934	1,3086	,32883
1	ternera	al		0,026879	0,283936	0,622629	0,272400	0,000049
2	ternera	rc	0,026879		0,001616	0,009187	0,212269	0,000025
3	soja	al	0,283936	0,001616		0,514733	0,040853	0,000117
4	soja	rc	0,622629	0,009187	0,514733		0,134993	0,000054
5	pescado	al	0,272400	0,212269	0,040853	0,134993		0,000030
6	pescado	rc	0,000049	0,000025	0,000117	0,000054	0,000030	

Tukey HSD test; variable cerebro (3 dietas graficos hplc statbb) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00225, df = 76,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,15785	,15999	,13316	,10151	,12239	,10178
1	ternera	al		0,999995	0,810489	0,060023	0,327597	0,013505
2	ternera	rc	0,999995		0,742723	0,041797	0,250828	0,007764
3	soja	al	0,810489	0,742723		0,717178	0,994762	0,597282
4	soja	rc	0,060023	0,041797	0,717178		0,906148	1,000000
5	pescado	al	0,327597	0,250828	0,994762	0,906148		0,833281
6	pescado	rc	0,013505	0,007764	0,597282	1,000000	0,833281	

Tukey HSD test; variable musculo (3 dietas graficos hplc statbb)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = ,00094, df = 87,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,07559	,02620	,04292	,07921	,07138	,07178
1	ternera	al		0,000554	0,085020	0,999519	0,998993	0,999447
2	ternera	rc	0,000554		0,712153	0,000157	0,000926	0,001007
3	soja	al	0,085020	0,712153		0,025048	0,148789	0,148039
4	soja	rc	0,999519	0,000157	0,025048		0,974532	0,981082
5	pescado	al	0,998993	0,000926	0,148789	0,974532		1,000000
6	pescado	rc	0,999447	0,001007	0,148039	0,981082	1,000000	

Tukey HSD test; variable corazon (3 dietas graficos hplc statbb)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = ,06917, df = 95,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,47081	,59190	,65932	,43086	,69697	,51135
1	ternera	al		0,749757	0,301543	0,997993	0,122381	0,998015
2	ternera	rc	0,749757		0,973804	0,482125	0,836600	0,951389
3	soja	al	0,301543	0,973804		0,136339	0,998271	0,608301
4	soja	rc	0,997993	0,482125	0,136339		0,045514	0,956815
5	pescado	al	0,122381	0,836600	0,998271	0,045514		0,339704
6	pescado	rc	0,998015	0,951389	0,608301	0,956815	0,339704	

Post Hoc en CoQ₁₀

Duncan test; variable hígado (3 dietas graficos hplc q10)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = ,00004, df = 88,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,01571	,01530	,01619	,01275	,01583	,00670
1	ternera	al		0,858921	0,841902	0,225367	0,956128	0,000322
2	ternera	rc	0,858921		0,725616	0,265829	0,828044	0,000456
3	soja	al	0,841902	0,725616		0,184132	0,873857	0,000212
4	soja	rc	0,225367	0,265829	0,184132		0,223415	0,009322
5	pescado	al	0,956128	0,828044	0,873857	0,223415		0,000311
6	pescado	rc	0,000322	0,000456	0,000212	0,009322	0,000311	

Duncan test; variable riñón (3 dietas graficos hplc q10)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = ,00780, df = 101,00								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,26977	,20676	,22369	,16486	,24067	,06381
1	ternera	al		0,053061	0,145079	0,001351	0,327792	0,000024
2	ternera	rc	0,053061		0,568437	0,160018	0,284682	0,000058
3	soja	al	0,145079	0,568437		0,062153	0,567662	0,000047
4	soja	rc	0,001351	0,160018	0,062153		0,019306	0,001036
5	pescado	al	0,327792	0,284682	0,567662	0,019306		0,000029
6	pescado	rc	0,000024	0,000058	0,000047	0,001036	0,000029	

Anexos

Tukey HSD test; variable cerebro (3 dietas graficos hplc q10)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = ,00036, df = 76,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,06134	,05909	,04911	,04000	,04771	,04102
1	ternera	al		0,999431	0,633912	0,086462	0,371739	0,033221
2	ternera	rc	0,999431		0,796045	0,154446	0,559537	0,071826
3	soja	al	0,633912	0,796045		0,909912	0,999980	0,904544
4	soja	rc	0,086462	0,154446	0,909912		0,931143	0,999995
5	pescado	al	0,371739	0,559537	0,999980	0,931143		0,923501
6	pescado	rc	0,033221	0,071826	0,904544	0,999995	0,923501	

Duncan test; variable músculo (3 dietas graficos hplc q10)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = ,00001, df = 85,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,01157	,00544	,00253	,00584	,01116	,01281
1	ternera	al		0,000061	0,000030	0,000089	0,747778	0,340003
2	ternera	rc	0,000061		0,026543	0,753186	0,000090	0,000030
3	soja	al	0,000030	0,026543		0,015810	0,000048	0,000025
4	soja	rc	0,000089	0,753186	0,015810		0,000196	0,000049
5	pescado	al	0,747778	0,000090	0,000048	0,000196		0,231195
6	pescado	rc	0,340003	0,000030	0,000025	0,000049	0,231195	

Tukey HSD test; variable corazón (3 dietas graficos hplc q10)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = ,00077, df = 95,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,04864	,06065	,07418	,05774	,08043	,06039
1	ternera	al		0,793852	0,087194	0,933939	0,012615	0,836704
2	ternera	rc	0,793852		0,700276	0,999672	0,274848	1,000000
3	soja	al	0,087194	0,700276		0,533188	0,985074	0,724177
4	soja	rc	0,933939	0,999672	0,533188		0,172463	0,999833
5	pescado	al	0,012615	0,274848	0,985074	0,172463		0,312203
6	pescado	rc	0,836704	1,000000	0,724177	0,999833	0,312203	

Post Hoc en el Ratio CoQ₉/CoQ₁₀

Tukey HSD test; variable hígado (3 dietas graficos hplc statn ratios)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = 64,983, df = 79,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			15,475	17,546	17,308	20,322	13,449	22,833
1	ternera	al		0,975008	0,994841	0,691174	0,975874	0,104417
2	ternera	rc	0,975008		1,000000	0,960002	0,663582	0,420347
3	soja	al	0,994841	1,000000		0,971871	0,868986	0,612214
4	soja	rc	0,691174	0,960002	0,971871		0,303946	0,975257
5	pescado	al	0,975874	0,663582	0,868986	0,303946		0,013663
6	pescado	rc	0,104417	0,420347	0,612214	0,975257	0,013663	

Tukey HSD test; variable riñón (3 dietas graficos hplc statn ratios)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = 1,2231, df = 100,00								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			4,4133	6,8012	4,5882	6,0722	6,0678	9,3689
1	ternera	al		0,000121	0,997191	0,000378	0,000390	0,000121
2	ternera	rc	0,000121		0,000122	0,379180	0,372246	0,000121
3	soja	al	0,997191	0,000122		0,001959	0,002037	0,000121
4	soja	rc	0,000378	0,379180	0,001959		1,000000	0,000121
5	pescado	al	0,000390	0,372246	0,002037	1,000000		0,000121
6	pescado	rc	0,000121	0,000121	0,000121	0,000121	0,000121	

Tukey HSD test; variable cerebro (3 dietas graficos hplc statn ratios)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = ,06336, df = 75,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			2,5975	2,6800	2,7156	2,5789	2,6021	2,4919
1	ternera	al		0,934517	0,869258	0,999977	1,000000	0,841789
2	ternera	rc	0,934517		0,999402	0,924680	0,955412	0,275779
3	soja	al	0,869258	0,999402		0,857872	0,897542	0,282141
4	soja	rc	0,999977	0,924680	0,857872		0,999939	0,961111
5	pescado	al	1,000000	0,955412	0,897542	0,999939		0,836971
6	pescado	rc	0,841789	0,275779	0,282141	0,961111	0,836971	

Tukey HSD test; variable músculo (3 dietas graficos hplc statn ratios)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = 12,537, df = 96,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			6,1650	4,5206	15,126	13,737	5,9444	6,1235
1	ternera	al		0,755410	0,000122	0,000122	0,999971	1,000000
2	ternera	rc	0,755410		0,000122	0,000122	0,849846	0,784585
3	soja	al	0,000122	0,000122		0,871215	0,000122	0,000122
4	soja	rc	0,000122	0,000122	0,871215		0,000122	0,000122
5	pescado	al	0,999971	0,849846	0,000122	0,000122		0,999990
6	pescado	rc	1,000000	0,784585	0,000122	0,000122	0,999990	

Tukey HSD test; variable corazón (3 dietas graficos hplc statn ratios)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = ,91445, df = 94,000								
Cell No.	grasa	calorías	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			9,7388	9,7767	8,6667	7,2656	8,9175	8,2673
1	ternera	al		0,999997	0,016057	0,000122	0,145106	0,000606
2	ternera	rc	0,999997		0,009675	0,000122	0,103847	0,000378
3	soja	al	0,016057	0,009675		0,000771	0,972968	0,838515
4	soja	rc	0,000122	0,000122	0,000771		0,000175	0,049416
5	pescado	al	0,145106	0,103847	0,972968	0,000175		0,413709
6	pescado	rc	0,000606	0,000378	0,838515	0,049416	0,413709	

